

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**DÉBORA ANDRADE SILVA**

**Abordagens experimentais em proteômica e  
glicômica aplicadas à caracterização do veneno  
de *Bothrops alcatraz***

Versão corrigida da Dissertação

São Paulo

Data do Depósito na SPG

**09/12/2015**

DÉBORA ANDRADE SILVA

**Abordagens experimentais em proteômica e  
glicômica aplicadas à caracterização do veneno de  
*Bothrops alcatraz***

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química  
da Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).*

Orientadora: Dra. Solange Maria de Toledo Serrano

São Paulo

2015

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Débora Andrade

S586a Abordagens experimentais em proteômica e glicômica aplicadas  
à caracterização do veneno de *Bothrops alcatraz* / Débora Andrade  
Silva. -- São Paulo, 2015.  
178p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de  
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Serrano, Solange Maria de Toledo

1. Proteína : Bioquímica 2. Espectrometria de massas  
3. Venenos de origem animal 4. Glicoproteínas 5. Peptídeos I. T.  
II. Serrano, Solange Maria de Toledo, orientador.

574.19245

CDD





COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505  
ceuaib@butantan.gov.br

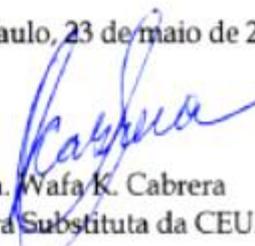
## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Abordagens experimentais em proteômica e glicômica aplicadas à caracterização do veneno de *Bothrops alcatraz*", protocolo nº 1220/14, sob a responsabilidade de Solange Maria de Toledo Serrano e Débora Andrade Silva - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como 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 21/5/2014.

This is to certify that the proposal "Experimental approaches in proteomics and glycomics applied to the characterization of the venom of *Bothrops alcatraz*", protocol nº 1220/14, under the responsibility of Solange Maria de Toledo Serrano and Débora Andrade Silva, - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 5/21/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

<b>Vigência do Projeto:</b> 05/2014 - 02/2015 Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada	<b>Nº de animais/espécie</b>  6 <i>Bothrops alcatraz</i> 100-500g (ambos) – procedentes do Plantel de serpentes para pesquisa, Museu Biológico do Instituto Butantan
---	--

São Paulo, 23 de maio de 2014

  
Dra. Wafa K. Cabrera  
Coordenadora Substituta da CEUAIB



**Autorização de Acesso e de Remessa de  
Componente do Patrimônio Genético**

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.

Brasília, 21 de Janeiro de 2014

Raquel de Andrade Lima Coelho  
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde  
PO 161/2010

Processo: 010002/2014-6

Validade: 21/01/2014 a 20/01/2017

Instituição: INSTITUTO BUTANTAN

CNPJ: 618.213.440/0001-56

Pesquisador: Solange Maria de Toledo Serrano

CPF: 101.128.238-07

RG: 92830079 - SSP / SP

*Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 8691221335926441 para recuperá-la do banco de dados do CNPq*



## AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO n° 010002/2014-6

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN n° 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq n° 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

**Instituição:** INSTITUTO BUTANTAN - IBU

**CNPJ:** 616.213.443/0001-56

**Representante Legal:** JORGE ELIAS KALIL FILHO

**Cargo/Função:** Diretor

**CPF:** 177.516.590-68 **RG:** 8004961771

**Projeto:** Análises proteômica, peptidômica, glicoproteômica e glicômica de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e estudos sobre a relação entre estrutura e função de metaloproteínas, serinoproteínas, fosfolipases A2 e lectinas desses venenos

**Coordenador do Projeto:** Solange Maria de Toledo Serrano

**CPF:** 101.128.238-07 **RG:** 92830079 - SSP / SP

**Finalidade do projeto:** O projeto visa a caracterização dos proteomas, peptidomas, glicoproteomas e glicomas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, incluindo o isolamento e caracterização de toxinas (metaloproteínas, serinoproteínas, fosfolipases A2 e lectinas) bem como estudos sobre a relação entre a estrutura química e função biológica de toxinas.

**Amostras a serem acessadas:**

Grupos Taxonômicos: *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops fonsecai*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops atrox*, *Bothrops insularis*, e *Bothrops alcastraz*.

Tipo de material/quantidade de amostras: Veneno de cada espécie (5 mg a 500 mg, dependendo do objetivos do experimento) e glândulas de venenos (eventualmente, quando for o caso, 1 par de glândulas de cada espécie).

**Local de depósito de subamostra:** INSTITUTO BUTANTAN

**Equipe do projeto:** SOLANGE MARIA DE TOLEDO SERRANO / CPF 101.128.238-07

SAVIO STEFANINI SANT'ANNA / CPF 130.023.398-22

MILENE CRISTINA MENEZES DOS SANTOS / CPF 305.958.228-94

EDUARDO SHIGUEO KITANO / CPF 316.002.318-45

DEBORA ANDRADE SILVA / CPF 365.585.398-02

ANA KARINA DE OLIVEIRA / CPF 283.232.388-61

LUCIANA BERTHOLIM NASCIBEN / CPF 316.787.318-38

EDSON TAKESHI YAMASHIRO / CPF 323.306.328-86

ANDRE ZELANIS PALITOT PEREIRA / CPF 033.039.919-52

INACIO DE LOIOLA MEIRELLES JUNQUEIRA DE AZEVEDO / CPF 271.177.508-98

**Validade da Autorização:** 21/01/2014 a 20/01/2017

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto n° 4.946/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio

eletrônico, para o endereço [apg@cnpq.br](mailto:apg@cnpq.br) e, preferencialmente, em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010002/2014-6. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço [apg@cnpq.br](mailto:apg@cnpq.br), preferencialmente em formato .pdf. Ainda, para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, especialmente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 21 de Janeiro de 2014

Raquel de Andrade Lima Coelho

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

*Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 4737120226369981 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.*

## TERMO DE RESPONSABILIDADE PARA TRANSPORTE DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

**Exclusivo para amostra usada em projeto de pesquisa sem potencial de uso econômico, que não requeira depósito definitivo da amostra ou parte da mesma na instituição onde será realizada a pesquisa**

O Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético foi instituído para controlar o transporte de amostras de patrimônio genético, existente em condição *in situ*, no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, mantidas em condição *ex situ*, destinadas a instituições de pesquisa nacionais e de outros países, com base nas seguintes premissas:

- o reconhecimento de que o intercâmbio do patrimônio genético realizado entre instituições de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, sediadas no Brasil e no exterior, é fundamental para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade brasileira; e
- a necessidade de garantir o cumprimento do disposto na Convenção sobre a Diversidade Biológica – CDB, em especial, a soberania nacional sobre a biodiversidade, o consentimento prévio fundamentado e a repartição de benefícios decorrentes do uso do patrimônio genético.

### Instituição responsável pela amostra

Nome: Instituto Butantan  
Sigla: IBu  
CNPJ: 618.213.440/0001-56

### Representante Legal

Nome: Jorge Elias Kalil  
CPF: 177.516.590-68  
Identidade (nº e órgão emissor): 8004961771  
Cargo: Diretor  
Ato que delega competência: DOESP V. 121 N. 15 21/01/2011

### Projeto de Pesquisa

Pesquisador responsável pelo projeto e pelas amostras a serem utilizadas no projeto: Solange Maria de Toledo Serrano

Título do projeto de pesquisa: Análises proteômica, peptidômica, glicoproteômica e glicômica de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e estudos sobre a relação entre estrutura e função de metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases A2 e lectinas desses venenos.

A instituição remetente e o pesquisador responsável pelo desenvolvimento do projeto acima especificado, considerando o disposto na Convenção sobre a Diversidade Biológica, na Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, no Decreto nº 3.945, de 28 de setembro de 2001, alterado pelo Decreto nº 4.946, de 31 de dezembro de 2003, e na Resolução nº 15, de 27 de maio de 2004, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, comprometem-se a utilizar as amostras de patrimônio genético a serem acessadas no projeto de acordo com as seguintes condições:

1. O material transportado deverá ser utilizado para o desenvolvimento de pesquisas sem potencial de uso econômico, em estrita observância ao exposto no projeto acima especificado.
2. Caso seja identificado potencial de uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado de amostra de componente do patrimônio genético remetido com base neste Termo, a instituição responsável pela amostra obriga-se a comunicar o fato ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético ou a instituição por este credenciada nos termos do art. 11, inciso IV, alínea "e", da Medida Provisória nº 2.186-16, de 2001, sendo vedado o prosseguimento da atividade correspondente relativa ao potencial identificado sem a observância ao disposto na legislação, em especial, a formalização do Contrato de Utilização do Patrimônio Genético e de

Repartição de Benefícios.

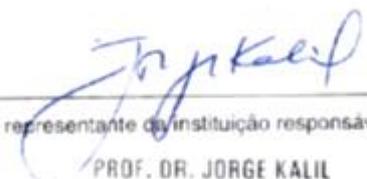
3. Qualquer publicação advinda de utilização ou de estudo de amostra de componente do patrimônio genético a ser transportada deverá reconhecer expressamente a origem do material e conter créditos à instituição remetente, devendo, ainda, ser enviado exemplar da referida publicação à instituição responsável.
4. O pesquisador responsável pela pesquisa compromete-se a não transferir as amostras transportadas a terceiros e, ao término da pesquisa, destruir ou devolver o material que não tenha sido completamente utilizado no desenvolvimento do projeto.
5. O pesquisador responsável pela pesquisa compromete-se a avisar à instituição onde será processada ou analisada a amostra que eventuais subamostras e seus derivados que, inadvertidamente, permaneçam na instituição deverão ser destruídos.

Por concordarem com todas as condições acima expostas, assinam o presente Termo em 3 (três) vias, de igual teor e forma, para um só efeito legal, o pesquisador responsável pelo desenvolvimento do projeto de pesquisa, o representante da instituição responsável pela amostra, assim como o curador responsável pela coleção científica, quando for o caso.

Brasil, São Paulo, 14 de março de 2014

Pais, cidade e data

  
\_\_\_\_\_  
assinatura do pesquisador responsável pela pesquisa

  
\_\_\_\_\_  
assinatura do representante da instituição responsável pelas amostras

PROF. DR. JORGE KALIL  
DIRETOR DO INSTITUTO BUTANTAN

\_\_\_\_\_  
assinatura do curador responsável pela coleção científica  
(quando for caso)

1ª via: CNPq (remeter pela Plataforma Carlos Chagas, preferencialmente em .pdf)

2ª via: pesquisador responsável

3ª via: instituição à qual o pesquisador está vinculado

1ª Via (CNPq) - 2ª Via (pesquisador responsável) - 3ª Via (instituição à qual o pesquisador está vinculado)



Ofício COAPG nº 96/2014

Brasília, 11 de julho de 2014.

Ilma. Sra.  
**Dra. Solange Maria de Toledo Serrano**  
Instituto Butantan  
Secretaria da Saúde  
Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada.  
Av. Vital Brasil, 1500  
Butantã  
05503900 - São Paulo, SP

**Ref.:** Autorização nº 010002/2014-6

**Ass.:** Solicitação para transporte de amostra de componente do patrimônio genético para o exterior.

**Projeto:** "Análises proteômica, peptidômica, glicoproteômica e glicômica de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e estudos sobre a relação entre estrutura e função de metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases A2 e lectinas desses venenos".

Prezada Senhora,

Levamos ao seu conhecimento que a solicitação acima referenciada emitida em nome de **Débora Andrade Silva** foi autorizada por este Conselho, em decorrência do cumprimento da Resolução CGEN nº 15/2004, que trata do transporte de amostras do patrimônio genético.

Atenciosamente,



**CARLOS ALBERTO PITTALUGA NIEDERAUER**  
Coordenador do Sistema de Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético  
PO 128/2013

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico  
Coordenação do Sistema de Autorização de Acesso  
ao Patrimônio Genético - COAPG  
SIIIS Quadra 01 Conjunto B - Bloco A - 2º andar  
Edifício Santos Dumont  
Lago Sul, Brasília - DF  
CEP: 71605-160

Telefone +55 61 3211 4024  
Fax +55 61 3211 4035  
e-mail: coapg@cnpq.br



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA  
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE  
 E DOS RECURSOS NATURAIS  
 RENATUBRA  
 Rua Tupyatã, 2 - São Paulo - Caixa Postal nº 65070 - CEP 05713-900 - Brasília-DF



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE  
 E DOS RECURSOS NATURAIS RENATUBRA - IBAMA

1) Pág. Nº 1/1  
 2) Data Emissão/Issuing Date: 06/08/2014  
 3) Válido Até/Valid Until: 08/03/2015

4) Licença n°/Permit n°: <b>14BR014554/DF</b>	6) Selo n°/Stamp n°: *****	8) Controle/Check n°: SV7HMTRR4ME SE9SZ
5) Licença de/Permit for <b>Exportação/Export</b>	7) Selo/Stamp  *****	9) Autoridade Adm. Emittent/Issuing Authority   Assinatura/Signature

10) Importador/Importer Vernon Reinhold Universidade de New Hampshire - Rudman Hall, 46 College Road Durham - New Hampshire - 03824 Fone: - Estados Unidos da América - US	11) Exportador/Re-exportador/Exporter/Re-exporter SOLANGE MARR DE TOLEDO SERRANO AVENIDA VITAL BRASIL SAO PAULO - 05503000 Fone: 01126279731 - solange.serrano@butantan.gov.br Brasil - BR
12) País Importador/Country of Import Estados Unidos da América - US	13) País Exportador/Re-exportador/Country of Export/Re-export Brasil - BR

14) Objeto da Operação/Purpose of the transaction  
S - Scientific/For conditions

15) Condições Especiais/Special Conditions  
For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and Preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations

O EXPORTADOR APRESENTOU AO SETOR EMISSOR DESTA LICENÇA CÓPIA DA AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E REMESSA DE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO CNFP NÚMERO 0100622014-E.

16) Dados do Transporte/Transportation Date  
Local/Place: ALF/Alfão Paulo  
Data Provável/Probable Date: 15/09/2014

ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/  
THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT

17) Item	18) Produto/Product	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name	21) Anexo/Origem Appendix/Source	22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark
23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Parent-Data	24) Cód. País do reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Data	
20) 1. <i>Bostrychia spp</i>	21) NC   F	22) veneno/posson 0,02 G -
		19) -- 0,02 G --
		23) - -
		24) - -

----- Fim dos Itens/Items End -----

"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécimes vegetal, fungos, microrganismos ou animais, ou substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, excetados em condições de sítio, inclusive domésticas, de material em coleções de sítio, desde que coletadas em condições de sítio, no território nacional, no plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividades exploratórias para identificar componentes do patrimônio genético e informações sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"  
 "This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, according to site conditions, including domestic ones, or least in the site conditions, if obtained in site conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge with potential commercial use"

25) Endosso de Aduana/Customs Endorsement

Item	Qtd./Qty														
------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------	------	----------

\_\_\_\_\_  
 ASSINATURA/SIGNATURE

\* Verificar/Verify: <http://brma.gov.br/brma/verificar> E-mail: [atm\\_sete@brma.gov.br](mailto:atm_sete@brma.gov.br)  
 1ª Via - Original - Importador / Exportador - Brasil / Importer / Exporter - Brazil  
 2ª Via - Exportador / Importador - Estrangeiro / Exporter / Importer - Other Country  
 3ª Via - Aduana / Customs  
 4ª Via - IBAMA

**Aos meus pais, Maria Rita e Osvaldo**

**Ao Amor da minha vida, Marcelo**

## Agradecimentos

A Deus, pela vida e pelas oportunidades.

Aos meus pais, Maria Rita e Osvaldo, que sempre fizeram de tudo por mim. Obrigada por todo apoio (em todos os sentidos), incentivo e amor. Vocês são a melhor referência que uma pessoa poderia ter, meus amores, minha força. Sem vocês eu jamais teria conseguido seguir o caminho que eu escolhi. Eu amo muito vocês! Tenho muito orgulho de ser filha de vocês!

Ao amor da minha vida, Marcelo. Minha vida, você é o homem, ser humano e cientista mais espetacular do Universo. Minha admiração por você é imensa. Poder caminhar ao seu lado é o maior privilégio que existe. Você me inspira, me dá forças e faz de mim uma pessoa muito melhor. Amo você cada dia mais e mais! Meu One Piece, Koishiteru ♥.

À Dona Rai! Sempre tão fofa e amorosa! Saiba que é amada e muito querida por mim!

Aos meus anjinhos de 4 patas (em ordem alfabética) Dengo, Denguinha, Docinho, Lindinha (e seus filhotinhos), Mini, Nina, Pandorinha e Solzinha. Obrigada por todo carinho, ternura e por sempre me recordar que o melhor presente que podemos dar a quem amamos é o nosso tempo e companhia.

À Dra. Solange Maria de Toledo Serrano, pela orientação, pelos ensinamentos, amizade, paciência e grande generosidade. Muito obrigada por compartilhar seu conhecimento e me ajudar a amadurecer.

Aos colaboradores deste projeto Dr. André Zelanis e Dra. Aline Soriano Lopes. Muito obrigada pelas ideias, pelos ensinamentos, discussões, inúmeras contribuições e amizade.

À Dra. Milene Menezes dos Santos, pela amizade, pelas discussões, pelos ensinamentos, generosidade e auxílio.

Ao Eduardo Shigueo Kitano, muito obrigada por sua generosidade, sempre disponível para discutir e ajudar no trabalho. Agradeço também por toda ajuda na análise dos dados e na elaboração dos experimentos.

À Dra. Ana Karina de Oliveira, Dra. Ana Helena Pagotto, Dr. Leo Iwai, Dr. Eric Green, Ms. Luciana Nasciben, Dyonis Matias, Daniele Henrique e Carolina Brás. Obrigada pelas amizades, conversas e convívio. Vocês fazem do nosso laboratório um lugar muito mais alegre e enriquecedor.

À Pollyanna Fernandes, pela ajuda na formatação da dissertação.

Ao Prof. Dr. Vernon Reinhold, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por ter me mostrado o quão maravilhoso e complexo é o mundo dos hidratos de carbono.

Ao Dr. David Ashline por partilhar um pouquinho da sua imensa sabedoria a respeito da fragmentação de glicanos e análise por espectrometria de massas.

Ao Dr Hailong Zang, por me ajudar a me estabelecer em Durham e pelas valiosas dicas sobre análise de glicosiltransferases.

À Dra. Thuy Tran, pela sua amizade e generosidade em me ensinar a prática laboratorial dos N-glicanos. Conhecer-te aqueceu meu coração.

Ao Prof. Dr. Hugo Armelin, coordenador do Center of Toxins, Immune-response and Cell Signaling-CEPID-FAPESP, pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Tashima pela ajuda na análise do Peptidoma.

À Dra. Sílvia Travaglia Cardoso por ceder os venenos de *B. alcatraz* para este estudo.

Ao Ismael Lima por toda ajuda e suporte nas análises por espectrometria de massas. Muito obrigada!

Ao Dr. Milton Yutaka Nishiyama Junior, pelos esclarecimentos sobre quantificação de proteínas.

Ao Dr. Inácio Junqueira de Azevedo por ceder o Banco de transcritos de *B. jararaca*.

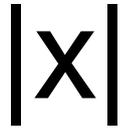
À Leila Hashimoto, Isaias Franca, Lídia Alves Silva, Maria José Silva e Aparecida Peixoto. Muito obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento (processos 2013/14651-3 e 2014/12245-0).

A todos os pesquisadores, estagiários, pós-graduandos e funcionários do LETA.

Ao Dr. Giuseppe Palmisano e à Dra. Maria Teresa Machini pelas importantes contribuições e sugestões.

.



“Determinação herdada...

O destino desta Era e os sonhos das pessoas...

Enquanto as pessoas continuarem buscando o sentido da liberdade,

Tudo isso jamais deixará de existir!”.

Gol D. Roger- O Rei dos Piratas

***Eiichiro Oda - One Piece***

## RESUMO

Silva, D.A. **Abordagens experimentais em proteômica e glicômica aplicadas à caracterização do veneno de *Bothrops alcatraz***. 2015. 178p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O gênero *Bothrops* apresenta ampla distribuição pelo território brasileiro, sendo a espécie *B. jararaca* seu representante de maior importância médica na região sudeste. Análises genéticas e filogeográficas descrevem a existência de um grupo monofilético, denominado grupo Jararaca, que inclui, além da espécie *B. jararaca*, as espécies insulares *B. alcatraz* e *B. insularis*. A proximidade evolutiva entre estas espécies, cujo desenvolvimento se iniciou no Pleistoceno, e suas diferenças quanto à dieta, levantam subsídios para o entendimento de seus venenos e suas atividades biológicas. O objetivo deste estudo foi a caracterização dos componentes do veneno de *B. alcatraz* por diferentes metodologias analíticas com a finalidade de aprofundar o conhecimento sobre os venenos do gênero *Bothrops* e sobre a evolução dos venenos das espécies do grupo Jararaca. As abordagens analíticas utilizadas foram a avaliação do proteoma dos venenos do grupo Jararaca por eletroforese e identificação de proteínas por digestão com tripsina e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), análise do N-terminoma e do peptidoma do veneno de *B. alcatraz* por LC-MS/MS e análise da glicosilação dos venenos do grupo Jararaca pelo tratamento com glicosidases, cromatografia de afinidade à lectinas (*concanavalin A*, ConA; *wheat germ agglutinin*, WGA; *peanut agglutinin*, PNA) e caracterização do N-glicoma por MS<sup>n</sup>. Os perfis eletroforéticos unidimensionais, obtidos com e sem redução das proteínas, mostraram que o veneno de *B. alcatraz* difere dos venenos de *B. jararaca* (adultos e filhotes) e do veneno de *B. insularis* (adultos). O perfil eletroforético bidimensional do veneno de *B. alcatraz* corroborou estas diferenças e revelou que a coleta do veneno na presença ou ausência de inibidores de proteinases tem influência no número de spots visualizados. Os resultados da análise dos proteomas dos venenos do grupo Jararaca mostraram que não há diferenças qualitativas significantes entre eles, e que os três apresentam um padrão similar de distribuição das classes de toxinas. A análise quantitativa *label free* dos proteomas revelou algumas diferenças, indicando que o veneno de *B. alcatraz* apresenta maior conteúdo de metaloproteínas e fosfolipases A2, que os venenos de *B. jararaca* e *B. insularis*. A identificação do

peptidoma do veneno de *B. alcatraz* mostrou diversas formas de peptídeos potenciadores de bradicinina, além de produtos de degradação de diferentes classes de toxinas. A avaliação da glicosilação das proteínas dos três venenos revelou que após a remoção das cadeias de *N*-glicanos e *O*-glicanos os perfis eletroforéticos se mostram mais parecidos. A identificação das proteínas do veneno de *B. alcatraz* que mostraram afinidade pelas lectinas revelou que a ConA interagiu com um número maior de componentes, seguida por WGA e PNA. As análises qualitativa e quantitativa do *N*-glicoma dos venenos do grupo Jararaca mostrou que os três venenos compartilham as mesmas estruturas de *N*-glicanos e em abundância relativa similar. Em conjunto, os resultados deste estudo indicaram que no grupo Jararaca, os proteomas dos venenos das espécies *B. jararaca* e *B. insularis* apresentam similaridade entre si, e se diferem do veneno de *B. alcatraz*, principalmente com relação ao grau de glicosilação de suas proteínas.

**Palavras-chave:** proteômica, espectrometria de massas, glicosilação, *Bothrops*, veneno de serpente, peptidômica.

## ABSTRACT

Silva, D.A. **Experimental approaches in proteomics and glycomics applied to the characterization of snake venom *Bothrops alcatraz***. 2015. 178 p. Master's Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The *Bothrops* genus is largely distributed on the Brazilian territory, and *B. jararaca* is the species of most medical importance in the Southeastern region. Genetic and phylogeographic analyses describe the existence of a monophyletic group, named Jararaca group, which is composed of *B. jararaca* and of the insular species *B. alcatraz* and *B. insularis*. The close evolutionary relationship between these species, which started in the Pleistocene era, and their diet-related differences, are important aspects for the understanding of their venoms and biological activities. The aim of this study was to characterize the venom of *B. alcatraz* by different analytical methodologies, in order to advance the knowledge on the venoms of *Bothrops* genus and on the evolution of the venoms of species of the Jararaca group. The analytical approaches used in this study included the characterization of the proteomes of the venoms of the Jararaca group by electrophoresis and protein identification by trypsin digestion and analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), N-terminomic and peptidomic analyses of the venom of *B. alcatraz* by LC-MS/MS and glycosylation analyses of the venoms of the Jararaca group by treatment with glycosidases, affinity chromatography to lectins (concanavalin A, Con A; wheat germ agglutinin, WGA; peanut agglutinin, PNA) and characterization of the N-glycans by MSn. The one-dimensional electrophoretic profiles were evaluated under reducing and non-reducing conditions and showed that the venom of *B. alcatraz* differs from *B. jararaca* (newborn and adult) and *B. insularis* (adult) venoms. The two-dimensional electrophoretic profile of *B. alcatraz* venom corroborated these differences and revealed that the milking of the venom in the presence or in the absence of proteinase inhibitors influences the number of spots visualized on the gel. The results of the analysis of venom proteomes of the Jararaca group showed no significant qualitative differences between them; moreover, the three venoms showed a similar pattern of distribution of toxins classes. However, the label free quantitative analysis of these proteomes revealed some differences, and indicated that the venom of *B. alcatraz* has a higher content metalloproteinases and phospholipase A2 than *B. jararaca* and *B. insularis* venoms. The identification of *B. alcatraz* venom peptidome showed various forms of bradykinin-potentiating peptides, as well as products of the degradation of different toxins classes. The assessment of the glycosylation level of proteins of the three venoms showed that after removal of N-glycan and O-glycan chains their electrophoretic profiles become more similar. The identification of *B. alcatraz* venom proteins that showed affinity for lectins indicated that ConA interacted with a larger number of components, followed by WGA and PNA. The qualitative and quantitative analysis of the N-glycan of the venoms of the Jararaca group showed that they share the same N-glycan structures, which were also found in similar relative abundance. Taken together, the results of this study indicate that in the Jararaca group, the venom proteomes of *B. jararaca* and *B. insularis* show similarity to each other and differ from the venom of *B. alcatraz*, especially with respect to the degree of protein glycosylation.

**Keywords:** proteomics, mass spectrometry, glycosylation, *Bothrops*, snake venom, peptidomics.

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema do processo de especiação envolvido no desenvolvimento do Grupo Jararaca. ...33	
<b>Figura 2.</b> Espécimes adultos de <i>B. alcatraz</i> , <i>B. jararaca</i> e <i>B. insularis</i> . ..... 35	
<b>Figura 3.</b> Processo de N-glicosilação em células animais e classificação de N-glicanos. .... 42	
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do método TAILS utilizado para análise do N-terminoma do veneno de <i>B. alcatraz</i> . ..... 52	
<b>Figura 5.</b> Esquema da reação de dimetilação redutiva de aminas primárias utilizando formaldeído como fonte dos grupos metilas ..... 54	
<b>Figura 6.</b> Perfil eletroforético (SDS-poliacrilamida 12%) dos venenos de <i>B. alcatraz</i> . ..... 72	
<b>Figura 7.</b> Perfil eletroforético (12% SDS-poliacrilamida) dos venenos individuais de <i>B. alcatraz</i> ..... 73	
<b>Figura 8.</b> Perfil eletroforético (12% SDS-poliacrilamida) dos venenos de <i>B. alcatraz</i> e <i>B. jararaca</i> ..... 74	
<b>Figura 9.</b> Perfil eletroforético (12%-SDS-poliacrilamida) dos venenos de <i>B. alcatraz</i> , <i>B. jararaca</i> e <i>B. insularis</i> . ..... 75	
<b>Figura 10.</b> Eletroforese bidimensional de amostras de venenos de <i>B. alcatraz</i> ..... 77	
<b>Figura 11.</b> Diagrama de Venn da distribuição dos grupos de proteínas identificados na análise do proteoma total dos venenos de <i>B. jararaca</i> , <i>B. insularis</i> e <i>B. alcatraz</i> ..... 78	
<b>Figura 12.</b> Gráficos da distribuição das toxinas identificadas na análise do proteoma total dos venenos do grupo Jararaca. .... 79	
<b>Figura 13.</b> Cluster hierárquico não supervisionado de proteínas identificadas com abundância diferencial nos proteomas dos venenos de <i>B. alcatraz</i> e <i>B. jararaca</i> ..... 81	
<b>Figura 14.</b> Cluster hierárquico não supervisionado de proteínas identificadas com abundância diferencial nos proteomas dos venenos de <i>B. jararaca</i> e <i>B. insularis</i> ..... 82	
<b>Figura 15.</b> Cluster hierárquico não supervisionado de proteínas identificadas com abundância diferencial nos proteomas dos venenos de <i>B. alcatraz</i> e <i>B. insularis</i> ..... 84	
<b>Figura 16.</b> Comparação entre o número de peptídeos identificados nas réplicas A e B da análise do N-terminoma do veneno de <i>B. alcatraz</i> . ..... 85	
<b>Figura 17.</b> Diagrama de Venn da distribuição dos 50 peptídeos identificados em estruturas primárias de SVMPs nas classes P-I, P-II, e P-III). ..... 92	
<b>Figura 18.</b> Sequenciamento de novo do peptídeo <ELGPPRPP, encontrado no veneno de <i>B. alcatraz</i> . ..... 94	
<b>Figura 19.</b> Sequenciamento de novo do peptídeo de estrutura <ELGPPRPP, identificado no veneno de <i>B. alcatraz</i> . ..... 95	
<b>Figura 20.</b> Perfis eletroforéticos (SDS-poliacrilamida 12%) dos venenos de <i>B. alcatraz</i> , <i>B. insularis</i> e <i>B. jararaca</i> ..... 97	
<b>Figura 21.</b> Perfis eletroforéticos (SDS-poliacrilamida 12%) dos venenos de <i>B. alcatraz</i> , <i>B. insularis</i> e <i>B. jararaca</i> ..... 98	
<b>Figura 22.</b> Perfis eletroforéticos (SDS-poliacrilamida 12%) dos venenos de <i>B. alcatraz</i> , <i>B. insularis</i> e <i>B. jararaca</i> ..... 99	
<b>Figura 23.</b> Perfil eletroforético das frações do veneno de <i>B. alcatraz</i> (5 µg) obtidas por cromatografia de afinidade às lectinas WGA, PNA e ConA ..... 100	
<b>Figura 24.</b> Gráficos de distribuição dos grupos de proteínas identificados nas frações do veneno de <i>B. alcatraz</i> retidas nas resinas de WGA, PNA e ConA. .... 102	
<b>Figura 25.</b> Diagrama de Venn dos grupos de proteínas identificados nas análises do glicoproteoma do veneno de <i>B. alcatraz</i> por cromatografia de afinidade às lectinas ConA, WGA e PNA. .... 103	
<b>Figura 26.</b> Comparação entre a média de 51 espectros de MS <sup>1</sup> de N-glicanos presentes em glicoproteínas dos venenos do grupo Jararaca. .... 105	
<b>Figura 27.</b> Possíveis estruturas do N-glicano de massa monoisotópica 3704,96 Da, ..... 109	
<b>Figura 28.</b> Nomenclatura de fragmentação de polímeros de carboidratos segundo Domon e Costello (1988). ..... 111	
<b>Figura 29.</b> Média de 22 espectros de massa (MS <sup>2</sup> ) do N-glicano de massa 3704,96 Da. .... 112	

<b>Figura 30.</b> Espectro de massas ( $MS^3$ ) do glicano de massa 3704,96 Da após a perda de três unidades de ácido siálico. ....	114
<b>Figura 31.</b> Topologias das estruturas de N-glicanos de número 13 e 16 encontradas nos venenos do grupo Jararaca. ....	124
<b>Figura 32.</b> Espectros de massas das antenas encontradas no N-glicano de massa 3342 Da, encontrado nos três venenos do grupo Jararaca. ....	125
<b>Figura 33.</b> Comparação entre os espectros de massa ( $MS^3$ ) dos dímeros de ácido siálico encontrados nos N-glicanos 13 e 16 e o padrão NeuAc-2,8-NeuAc. ....	126
<b>Figura 34.</b> Análise das posições das ligações envolvidas entre as unidades de ácido siálico e as unidades de lactosamina das antenas dos N-glicanos. ....	127
<b>Figura 35.</b> Espectro de massas da fragmentação do íon b $m/z$ 789 que corresponde ao dímero de ácido siálico contendo uma unidade de NeuGc. ....	129
<b>Figura 36.</b> Cromatograma de íons de N-glicanos do veneno de <i>B. alcatraz</i> por LC-MS. ....	131
<b>Figura 37.</b> Comparação entre os perfis cromatográficos dos N-glicanos encontrados nos venenos do grupo Jararaca. Colocar os dados da cromatografia ....	136
<b>Figura 38.</b> Análise comparativa dos venenos do grupo Jararaca ( <i>B. alcatraz</i> , <i>B. insularis</i> e <i>B. alcatraz</i> ) por eletroforese bidimensional. ....	140
<b>Figura 39.</b> Esquema da classificação das metaloproteases de venenos de serpentes com base no processamento pós-traducional. ....	150
<b>Figura 40.</b> Diferentes N-terminais identificados no veneno de <i>B. alcatraz</i> do domínio disintegrina da proteína P31985. ....	151
<b>Figura 41.</b> Exemplos de estruturas dominantes de N-glicanos em diferentes táxons eucarióticos. ....	158
<b>Figura 42.</b> Estruturas de N-glicanos descritas em venenos de serpentes. As estruturas de Lewis foram retiradas de Stanley e Cummings (2009). ....	160

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sequências N-terminais identificados pela análise N-terminômica no veneno de <i>B. alcatraz</i> . .....	86
<b>Tabela 2.</b> BPPs identificados pela análise peptidômica do veneno de <i>B. alcatraz</i> . .....	93
<b>Tabela 3.</b> Lista de composições de N-glicanos sugeridos pelo programa Glycomod para a massa monoisotópica 3704.6 Da. ....	106
<b>Tabela 4.</b> Lista de N-glicanos identificados no veneno de <i>B. alcatraz</i> . Os valores de massa e $\Delta$ (delta) foram determinados pelo programa Glycomod. ....	116
<b>Tabela 5.</b> Lista de N-glicanos identificados no veneno de <i>B. insularis</i> . Os valores de massa e $\Delta$ (delta) foram determinados pelo programa Glycomod. ....	119
<b>Tabela 6.</b> Lista de N-glicanos identificados no veneno de <i>B. jararaca</i> . Os valores de massa e $\Delta$ (delta) foram determinados pelo programa Glycomod. ....	121
<b>Tabela 7.</b> Valores observados na análise de LC-MS dos N-glicanos liberados das glicoproteínas presentes nos venenos do grupo Jararaca. ....	132

## Lista de abreviaturas e siglas

2AA: ácido aminobenzóico  
ALC: *Average Local Confidence*  
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta básica de busca de alinhamento local)  
CID: *Collision Induced Dissociation* (Dissociação induzida por colisão)  
ConA: Concanavalina A  
DDA: Data Dependent Acquisition  
D.E.: Diâmetro externo  
D.I.: Diâmetro interno  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DTT: Ditioneitol  
EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético  
ESI: *Electrospray Ionization* (ionização por *electrospray*)  
FDR: *False Discovery Rate*  
FTMS: Fourier Transform mass spectrometry  
Glc: Glicose  
GlcNAc: *N*-acetilglicosamina  
HCD: high-energy collision dissociation  
Hex: Hexose  
HexNAc: *N*-acetilhexosamina  
HEPES: ácido 4-(2-hidroxi)etil-1-piperazinetanesulfônico  
HexNAc: *N*-acetil-hexosamina  
IPG: *Immobilized pH Gradient* (gradiente de pH imobilizado)  
LAO: L-amino ácido oxidase  
LC: *Liquid Chromatography* (cromatografia líquida)  
LC-MS/MS: *Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial)  
LFQ: label free quantification  
 $m/z$ : razão massa/carga  
Man: Manose  
MS<sup>n</sup>: Espectrometria de massas sequencial, n representa um número maior que 2  
NP-40: 2-[2-[4-(2,4,4-trimetilpentano-2-il)fenoxi]etoxi]etanol  
PBS: *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato-salina)  
PGC: porous graphitized carbon  
pI: ponto isoelérico  
PLA2: *Phospholipase A2*  
PLB: Phospholipase B  
PMSF: Fluoreto de fenil metil sulfonil  
PNA: *Peanut Agglutinin-agarose*  
rpm: Rotações Por Minuto  
SCX: Strong cátion exchange  
SDS: *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)  
SVMP: Snake Venom MetallProteinase  
SVSP: Snake Venom Serine Proteinase  
TAILS: Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates  
TFA: Ácido tri-fluoro-acético  
TIC: *Total Ion Count* (contagem total de íons)  
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano  
WGA: *Wheat Germ Agglutinin-agarose*  
Z: carga

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Venenos de serpentes</b>	<b>25</b>
1.1.1. Variabilidade na composição de venenos de serpentes	26
1.1.2. Composição do veneno Botrópico	29
<b>1.2. Grupo Jararaca</b>	<b>31</b>
<b>1.3. Análise proteômica de venenos</b>	<b>36</b>
<b>1.4. Glicosilação</b>	<b>38</b>
1.4.1. Glicosilação de proteínas	38
1.4.2. N-glicosilação	40
1.4.3. Glicosilação de toxinas	43
<b>1.4. Perspectiva de contribuição do estudo</b>	<b>44</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>45</b>
<b>3. Material e métodos</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Venenos</b>	<b>46</b>
<b>3.2. Análise proteômica</b>	<b>46</b>
3.2.1. Eletroforese unidimensional	46
3.2.2. Eletroforese bidimensional	47
3.2.3. Análise do proteoma total	48
3.2.3.1. Digestão de proteínas em solução	48
3.2.3.2. LC-MS/MS	49
3.2.3.3. Análise dos dados	50
<b>3.3. Análise N-terminômica</b>	<b>51</b>
3.3.1. Seleção de N-terminais naturais	51
3.3.2. Desnaturação, redução e alquilação	52
3.3.3. Dimetilação redutiva	53
3.3.4. Digestão com tripsina	54
3.3.5. LC-MS/MS	56
3.3.6. Análise bioinformática	57
<b>3.4. Análise peptidômica</b>	<b>58</b>
3.4.1. LC-MS/MS	59
3.4.2. Análise dos dados	59
<b>3.5. Análise glicoproteômica</b>	<b>61</b>
3.5.1. Tratamento com neuraminidase	61
3.5.2. Tratamento com N-glicosidase	61
3.5.3. Tratamento com O-glicosidase	61
3.5.4. Cromatografia de afinidade à lectinas	62
3.5.4.1. Digestão em solução com tripsina	64
3.5.4.2. LC-MS/MS	64
3.5.4.3. Análise dos dados	65
<b>3.6. Análise N-glicômica</b>	<b>65</b>

3.6.1. N-desglicosilação enzimática	66
3.6.2. Extração em fase sólida	66
3.6.3. Análise Qualitativa	67
3.6.3.1. Redução e Dessalinização	67
3.6.3.2. Permetilação	67
3.6.3.3. Espectrometria de massas sequencial (MS <sup>n</sup> )	68
3.6.3.4. Glycomod	69
3.6.4. Análise Quantitativa	69
3.6.4.1. Marcação com ácido aminobenzóico	69
3.6.4.2. LC-MS	70
3.6.4.3. Análise dos dados	71
<b>4. Resultados</b>	<b>72</b>
<b>4.1. Análise proteômica</b>	<b>72</b>
4.1.1. Análise por eletroforese unidimensional	72
4.2.1. Proteoma total	77
4.2.1.1. Identificação de proteínas	77
4.2.1.2. Quantificação de proteínas	79
<b>4.2. Análise N-terminômica</b>	<b>84</b>
<b>4.3. Análise peptidômica</b>	<b>89</b>
4.3.1. Peptídeos oriundos de SVMPS	92
4.3.2. BPPs	93
<b>4.4. Análise glicoproteômica</b>	<b>96</b>
4.4.1. Tratamento dos venenos com glicosidasas	96
4.4.2. Análise glicoproteômica	99
<b>4.5. Análise N-glicômica</b>	<b>103</b>
4.5.1. Análise Qualitativa	103
4.5.2. Análise Quantitativa	130
<b>5. Discussão</b>	<b>138</b>
<b>5.1. Proteomas dos venenos do grupo Jararaca</b>	<b>138</b>
<b>5.2. N-terminoma</b>	<b>142</b>
5.2.1. Modificações do N-terminal	142
5.2.2. N-Terminais de SVSPs	147
5.2.2. N-terminais de SVMPS	149
<b>5.6. Peptidoma</b>	<b>152</b>
<b>5.4. Glicoproteoma</b>	<b>155</b>
5.4.1. Glicosilação de toxinas de venenos do grupo Jararaca	155
5.4.2. Cromatografia de afinidade à lectinas	156
<b>5.5. N-glicoma</b>	<b>157</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>166</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>168</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>174</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Venenos de serpentes

Dentre as 2430 espécies de serpentes existentes na superfamília Colubroidea (Ordem Squamata, subordem Serpentes) (Vidal, 2002) apenas uma pequena fração (~20%) é considerada de importância médica. Essa denominação apreciativa é consequência do fato de que apenas algumas famílias específicas de serpentes são responsáveis por envenenamentos. Os venenos de serpentes têm como objetivo principal a predação, sendo a ocorrência de acidentes uma consequência da aplicação do veneno como forma de defesa pelo animal contra agressores (Gans e Elliot, 1968; Thomas e Pough, 1979; Mackessy, 1993; Barlow *et al.*, 2009).

Os gêneros desta superfamília são classificados em quatro famílias: Atractaspididae, Colubridae, Elapidae e Viperidae, e a capacidade de produção de veneno está presente em todas elas (Vidal, 2002; Fry *et al.*, 2003). Todavia, as serpentes de maior importância médica pertencem apenas às duas últimas.

O surgimento da capacidade de produção de veneno ocorreu no início do desenvolvimento da ordem Squamata, há milhões de anos, acompanhado pela especialização do maxilar e da dentição destes animais (Vidal, 2002; Fry *et al.*, 2005). Entretanto, o cenário atual mostra que ao longo da evolução algumas espécies de serpentes (alguns membros da família Colubridae) sofreram perdas secundárias destes caracteres especializados na inoculação de veneno, porém mantiveram a capacidade de produzir secreções tóxicas (Vidal, 2002).

No Brasil, os acidentes com serpentes apresentam um grande impacto na saúde pública e a análise das notificações recebidas pelo Ministério da Saúde indica

que cerca de 90% destas ocorrências envolvem um gênero da família Viperidae, o gênero *Bothrops* (Melgarejo, 2009).

O território brasileiro é habitat de diversos representantes deste gênero, mas a espécie de maior repercussão e importância é a *Bothrops jararaca*. A evidência recebida por esta espécie decorre do elevado número de acidentes ofídicos no qual ela está envolvida (Melgarejo, 2009). Esse índice elevado é consequência de sua distribuição em regiões populosas do país (desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul) e sua fácil adaptação a diferentes ambientes (Furtado, 2005).

Apesar da ampla distribuição da capacidade de produção de veneno entre várias espécies de serpentes, o produto final (o veneno) apresenta uma enorme variabilidade de componentes entre diferentes gêneros dentro de uma mesma família (Chippaux *et al.*, 1991; Vidal, 2002). Esta variabilidade acarreta em diferentes quadros de envenenamento, que podem ser classificados de acordo com o gênero das espécies envolvidas. Os venenos botrópicos apresentam, em linhas gerais, atividade proteolítica, relacionada com os efeitos locais (edema, bolhas e necrose), e atividades coagulante e hemorrágica (Ministério da Saúde, 2001).

#### **1.1.1. Variabilidade na composição de venenos de serpentes**

Ainda que os venenos do gênero *Bothrops* contêm invariavelmente os mesmos componentes, há o registro de grande variabilidade interespecies e intraespecies na composição do veneno. Essa observação de alta variabilidade é um evento ubíquo entre serpentes e pode ser observada em diferentes níveis taxonômicos (Chippaux *et al.*, 1991).

Desta forma, conhecer a variabilidade e os fatores que a influenciaram ao longo da evolução das serpentes permitirá avanços na produção e emprego dos soros antiofídicos no tratamento das vítimas (Chippaux *et al.*, 1991; Sasa, 1999). Até

mesmo nos dias atuais, a administração de um soro antiofídico específico é o tratamento mais adequado para neutralizar os efeitos letais dos venenos de serpentes (Theakston *et al.*, 2003).

Dentre as variáveis correlacionadas com a variabilidade de venenos existem fatores geográficos (localização) e temporais (idade, sexo, sazonalidade) (Chippaux *et al.*, 1991; Daltry *et al.*, 1996). Dentro do gênero *Bothrops*, a espécie *B. jararaca* pode ser utilizada para exemplificação da existência de variação na composição do veneno dirigida pelo dimorfismo sexual (diferenças entre machos e fêmeas) (Furtado *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2006; Pimenta *et al.*, 2007) e pela idade (ontogenia) (Zelanis *et al.*, 2010, 2011, 2012). Como exemplo de variabilidade relacionada com a localização geográfica da serpente citam-se casos de envenenamentos por *B. atrox*, onde esta variabilidade mostra-se um fator importante a ser considerado no tratamento das vítimas de acidentes ofídicos (Calvete *et al.*, 2011).

A influência destas variáveis na composição do veneno é consenso na literatura, e vários exemplos podem ser citados, entretanto, um item permanece em discussão: a influência da dieta ao longo da evolução. Chippaux *et al.* (1991) citaram três trabalhos que indicavam não ter sido encontrada qualquer evidência que suporte a correlação entre dieta e composição do veneno. Outro ponto defendido por alguns grupos considera que as variabilidades são produtos de eventos neutros durante a seleção natural, e que as serpentes seriam capazes de injetar uma quantidade de veneno muito acima daquela capaz de levar a presa à morte, o que faria da dieta um fator pouco significativo para dirigir a evolução dos componentes de veneno (Sasa, 1999; Mebs, 2001). Todavia, outros trabalhos relatam uma relação significativa entre dieta e venenos de serpentes, sugerindo que os venenos são mais potentes para suas presas naturais do que em outros modelos (Daltry *et al.*, 1996;

Da Silva e Aird, 2001; Li *et al.*, 2005; Barlow *et al.*, 2009; Gibbs e Mackessy, 2009; Casewell *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2012; Casewell *et al.*, 2014,).

Daltry *et al.* (1996) compararam os perfis eletroforéticos de venenos de *Calloselasma rhodostoma* e chegaram à conclusão de que a variabilidade intraespecífica observada é consequência de diferentes dietas às quais determinadas populações são submetidas. Os autores também sugeriram que tal característica é herdada e mudar os hábitos alimentares de animais em cativeiro não reflete qualquer mudança na composição do veneno.

O trabalho de Gibbs e Mackessy (2009) envolveu seis espécies do gênero *Sistrurus* e demonstrou que espécies cuja dieta se vale predominantemente de mamíferos apresentam veneno com DL50 (dose letal mediana) muito menor em mamíferos do que em lagartos e rãs. Barlow *et al.* (2009) avaliaram o conteúdo gastrointestinal de algumas espécies do gênero *Echis* e com dados obtidos de ensaios in vivo sobre artrópodes observaram uma forte evidência de que a variação na composição do veneno é resultado de uma adaptação evolutiva a diferentes dietas. O estudos de Casewell *et al.* (2009) e Richard *et al.* (2012) corroboram estas observações dentro do gênero *Echis*. Da Silva e Aird (2001) analisaram venenos do gênero *Micrurus* e concluíram que estes venenos também possuem atividades mais potentes para suas presas naturais (outras serpentes) do que para camundongos.

Analisando o caso da espécie *Aipysurus eydouxii*, Li *et al.* (2005) sugeriram que a mudança da dieta, anteriormente baseada em peixes, para uma composta exclusivamente por ovos de peixes levou a deleção de importantes toxinas e a perda do aparato inoculador de veneno.

A despeito do fato de que venenos de serpentes apresentam variabilidade, permanecem ainda as discussões sobre quais fatores estão de fato correlacionados

a esta. Todavia, a plasticidade dos venenos ao longo da evolução pode ser considerada um resultado da alta taxa de mutações não sinônimas nos genes codificadores de toxinas, característica que favorece a rápida diversificação de toxinas por alterações na estrutura primária das proteínas (Deshimaru *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 1996; Kordis e Gubensek, 2000).

### **1.1.2. Composição do veneno Botrópico**

Os venenos de serpentes são misturas concentradas, de alto grau de complexidade, compostas predominantemente por proteínas, que podem ser classificadas em componentes enzimáticos e não enzimáticos. As principais proteínas (toxinas) com ação enzimática encontradas no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* são metaloproteinase (Snake Venom MetalloProteinase, SVMP), serinoproteinase (Snake Venom Serine Proteinase, SVSP), fosfolipase A2 (PLA2), e L-aminoácido oxidase (LAAO).

As SVMPs constituem uma complexa classe de toxinas muito abundante nos venenos botrópicos e cuja ação proteolítica está relacionada com hemorragia, atividades fibrinogenolítica, fibrinolítica e apoptótica, ativação de fatores da cascata de coagulação e inibição da agregação plaquetária (Fox e Serrano, 2008, 2009). A existência de múltiplos domínios em sua estrutura, o intrincado processamento de seus zimogênios e a variabilidade entre seus constituintes levou à classificação dessas metaloproteinases em três classes principais (P-I, P-II, P-III), considerando o processamento e a organização de seus domínios nas proteínas maduras (Fox e Serrano, 2008). As serinoproteinases também apresentam atividade sobre a cascata de coagulação, sistema fibrinolítico e calicreína-cinina, ocasionando o desequilíbrio da hemostasia (Serrano e Maroun, 2005; Serrano, 2013).

As fosfolipases A2 são enzimas envolvidas no processo de necrose de fibras do músculo esquelético (atividade miotóxica), inflamação e dor (Teixeira *et al.*, 2003). Fosfolipases B (PLB) foram também descritas recentemente em venenos do gênero *Bothrops* (Souza *et al.*, 2013), e diferem das clássicas enzimas da classe A2, abundantes em venenos, por clivar em diferentes posições na estrutura de fosfolípidos (Wilton e Waite, 2002). O trabalho de Bernheimer *et al.* (1987) mostrou que uma PLB isolada do veneno de *Pseudechis colletti* apresentava atividade hemolítica em hemácias humanas e de coelho. L-aminoácido oxidases atuam na alteração da função plaquetária e causam desordens na coagulação do plasma (Guo *et al.*, 2012; Fox, 2013; Izidoro *et al.*, 2014).

Entre as toxinas sem atividade enzimática encontra-se a classe das lectinas tipo-C, os peptídeos potenciadores de bradicinina (*Bradykinin potentiating peptide*, BPP), proteínas secretórias ricas em cisteínas (*Cysteine Rich Secretory Protein*, CRISP), disintegrinas e fatores de crescimento como os svVEGF e svNGF (*snake venom Vascular Endothelium Growth Factor* e *snake venom Nerve Growth Factor*, respectivamente).

As lectinas do tipo C são proteínas semelhantes em termos estruturais, mas que diferem quanto à atividade de ligação a carboidratos e atividades farmacológicas. Apresentam um domínio de reconhecimento de carboidrato e estão envolvidas em processos antagônicos, tais como atividade anticoagulante, ou de ativação ou inibição da agregação plaquetária (Ogawa *et al.*, 2005; Morita, 2005). Os BPPs são peptídeos ricos em prolina que contêm entre 5-13 resíduos de aminoácidos com um resíduo de ácido piroglutâmico na extremidade N-terminal (Ferreira e Rocha e Silva, 1965; Camargo *et al.*, 2012). Estes peptídeos são capazes de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), promovendo a potenciação da

atividade da bradicinina e causando hipotensão. As CRISPs estão relacionadas com bloqueios de canais iônicos, inibição da contração de músculo liso, e atividade antiangiogênica (Yamazaki e Morita, 2004; Wang *et al.*, 2010; Sunagar *et al.*, 2012; Lecht *et al.*, 2015). As disintegrinas são proteínas de baixa massa molecular provenientes do processamento das SVMPs e atuam principalmente interferindo na agregação plaquetária (Mc Lane *et al.*, 2004; Wijeyewickrema *et al.*, 2005; Calvete, 2013).

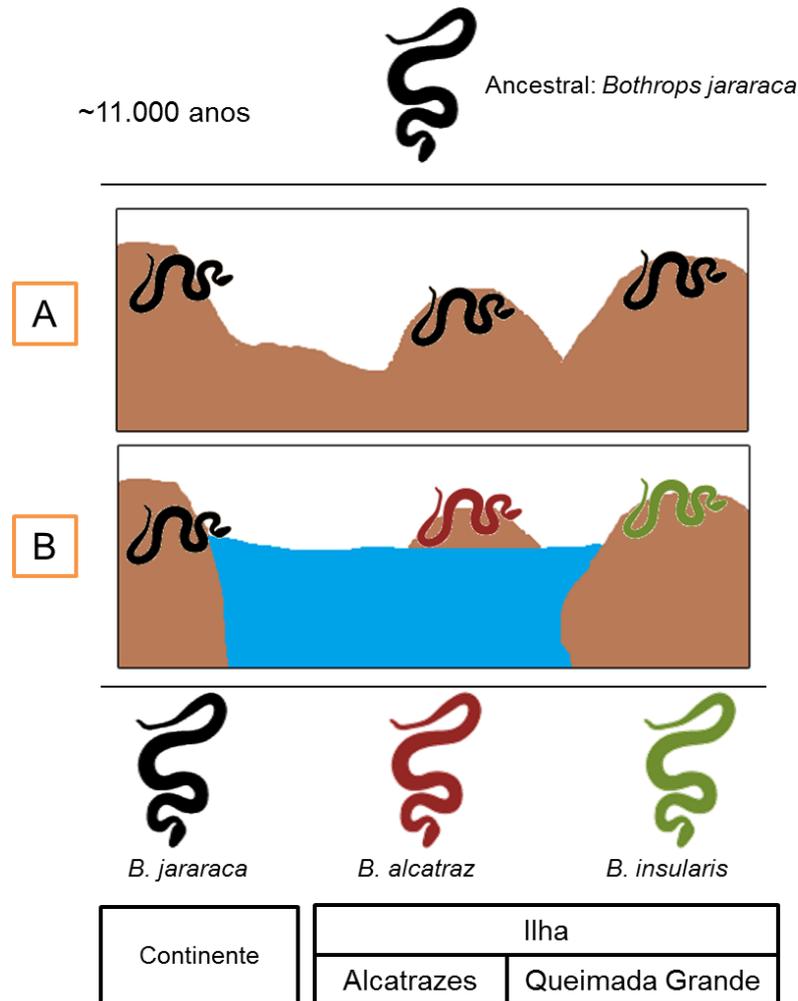
Apesar da aparente simplicidade e individualização das atividades de cada classe de toxina, os fenômenos observados no envenenamento são consequências de uma ação integrada de todas estas classes e suas diversas proteoformas (Aird *et al.*, 2015; Doley e Kini, 2009). Adicionalmente à ampla gama de classes de toxinas encontradas nos venenos e de suas várias proteoformas, a complexidade da mistura é aumentada diversas vezes pelas modificações pós-traducionais frequentemente encontradas nestes fluidos biológicos, sendo estas a glicosilação, o processamento proteolítico e a oligomerização (Serrano *et al.*, 2005; Fox e Serrano, 2008; Doley e Kini, 2009, Yamashiro *et al.*, 2014).

## **1.2. Grupo Jararaca**

No Brasil, a *B. jararaca* apresenta ampla distribuição geográfica, de forma que, além da conhecida variação ontogenética acompanhada pela mudança da dieta, existe ainda variabilidade regional, não somente na composição do veneno como nas características do animal, fato que aponta para a possibilidade de a espécie *B. jararaca* corresponder a um complexo de espécies e não a uma espécie definida (Grazziotin *et al.*, 2006).

Em um estudo de genética molecular e análise filogenética envolvendo representantes de *B. jararaca* de diferentes regiões e duas espécies insulares, *B. alcatraz* e *B. insularis*, Grazziotin *et al.*(2006) analisaram a variabilidade da sequência do gene mitocondrial do citocromo b (cyt b) entre as populações destas espécies. Seus resultados levaram a uma hipótese para o surgimento das espécies insulares, segundo a qual estas teriam originado recentemente a partir de exemplares de *B. jararaca*, há cerca de 11.000 anos (Pleistoceno). Estes autores verificaram ainda que a variabilidade existente entre as serpentes insulares sugere uma origem a partir de espécimes de *B. jararaca* de regiões geográficas diferentes, que convergiram para uma origem independente. A este grupo tão próximo, composto pelas espécies *B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca* dá-se o nome de Grupo Jararaca (Martins *et al.*, 2001).

Acredita-se que o surgimento das ilhas da Queimada Grande e do arquipélago de Alcatraz ocorreram pela elevação do nível do mar no período Pleistoceno, e que o isolamento de indivíduos de *B. jararaca* possibilitou o desenvolvimento das novas espécies (especiação) com base no tipo de presa disponível em cada ambiente (Marques *et al.*, 2002a, Grazziotin *et al.*, 2006) (Figura1).



**Figura 1.** Esquema do processo de especiação envolvido no desenvolvimento do Grupo Jararaca. O painel A ilustra a ocupação de espécimes de *B. jararaca* no período Pleistoceno (há ~11.000 anos) e o painel B ilustra que a elevação do nível dos oceanos levou ao isolamento geográfico de alguns indivíduos de *B. jararaca* que originaram as espécies insulares hoje conhecidas por *B. insularis* (na ilha da Queimada Grande) e *B. alcatraz* (na ilha de Alcatrazes). Adaptado de Marques et al. (2002a).

*B. insularis* é uma espécie exclusiva e endêmica da Ilha da Queimada Grande, no litoral paulista, com hábitos arborícolas e mudança ontogenética na dieta, assim como ocorre em *B. jararaca*, onde os indivíduos jovens alimentam-se de animais ectotérmicos (artrópodes e anfíbios) e os adultos apresentam uma dieta baseada exclusivamente em aves. Diferentemente da *B. jararaca*, entretanto, indivíduos de *B. insularis* não apresentam dieta generalista, devido à limitação de recursos na ilha, que implica em uma alimentação baseada quase exclusivamente em aves por espécimes adultos (Valente *et al.*, 2009). Os estudos disponíveis sobre

o veneno de *B. insularis* demonstram que o padrão do envenenamento por esta serpente é característico do gênero *Bothrops*, com efeitos locais (edema, hemorragia e necrose) e sistêmicos (coagulopatia) (Valente *et al.*, 2009). Outros estudos mostram uma rápida ação do veneno, com evolução para o quadro de “choque” e consequente morte dos modelos animais e uma ação mais pronunciada sobre aves (Zelanis *et al.*, 2007).

*B. alcatraz* é uma espécie endêmica e exclusiva do arquipélago de Alcatrazes, localizado no litoral paulista. O arquipélago é constituído por seis ilhas, sendo que a presença desta espécie ocorre apenas na ilha de maior formação do arquipélago, a Ilha de Alcatrazes. A ilha é rochosa e abriga o maior ninhal de aves marinhas do sudeste brasileiro, e morcegos são os únicos representantes de mamíferos lá encontrados. Dentre os répteis existem, além de *B. alcatraz*, lagartos e outras serpentes (como por exemplo, *Micrurus cf corallinus* e *Dipsas albifron*) (Marques *et al.*, 2002b; Narvaes, 2007; Moraes, 2011). A espécie foi descrita em 2002 por Otavio Marques (Marques *et al.*, 2002b), cujo estudo mostrou o hábito alimentar como sendo equivalente àquele de indivíduos juvenis de *B. jararaca*. Dadas as condições propiciadas pela ambiente insular, *B. alcatraz* mantém uma dieta restrita e baseada em ectotérmicos durante toda a vida, alimentando-se principalmente de lagartos, lagartixas e lacraias. Espécimes de *B. alcatraz* adultos apresentam tamanho inferior ao observado para indivíduos adultos de *B. jararaca* (Furtado, 2005).

Eventos de especiação por isolamento geográfico por barreiras intransponíveis, como ilhas, são ótimos modelos de estudo de variabilidade e constituem um quadro favorável ao estudo do mecanismo evolutivo responsável pela

diferenciação e variabilidade entre as espécies encontradas no continente e nas ilhas.

A análise do perfil eletroforético unidimensional, em condições não redutoras, mostra a existência de padrões proteicos diferentes entre os venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*, assim como ocorre com outras espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. Ainda, ensaios enzimáticos com o veneno de *B. alcatraz* mostraram atividades coagulante e proteolítica maiores do que aquelas do veneno de *B. jararaca* (Furtado, 2005).

Diversos estudos sobre a caracterização do proteoma e peptidoma do veneno de *B. jararaca* (Serrano *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2006; Zelanis *et al.*, 2010, 2012; Tashima *et al.*, 2012; Gonçalves-Machado *et al.*, 2015) e de *B. insularis* (Zelanis *et al.*, 2007; Oliveira-Carvalho *et al.*, 2008; Valente *et al.*, 2009) mostraram a grande complexidade e variabilidade de sua composição, entretanto, nada se sabe sobre o proteoma/peptidoma do veneno de *B. alcatraz*, exceto sobre suas atividades biológicas (Furtado, 2005; Moraes, 2011).

*B. alcatraz*

*B. jararaca*

*B. insularis*



**Figura 2.** Espécimes adultos de *B. alcatraz*, *B. jararaca* e *B. insularis*. Fotos: *B. alcatraz* por Inácio de Loiola Meireles Junqueira de Azevedo, *B. jararaca* por Otavio Marques e *B. insularis* por Sílvia Regina Travaglia-Cardoso.

### 1.3. Análise proteômica de venenos

A elevada complexidade dos venenos de serpentes não se reflete apenas nos quadros de envenenamento, mas também traz desafios analíticos aos estudos científicos focados nesses fluidos biológicos. O estudo de venenos por abordagens bioquímicas teve seu início com a caracterização de suas atividades biológicas e isolamento de toxinas e, posteriormente, incluiu as análises por eletroforese (unidimensional e bidimensional) como formas de avaliação do proteoma total (Fox e Serrano, 2008).

A eletroforese bidimensional foi amplamente empregada na caracterização de diversos proteomas de venenos e, embora hoje em dia esta técnica esteja caindo em desuso (por suas limitações e dificuldades de reprodutibilidade), a “imagem” de proteomas de venenos ilustra de forma visual a grande variabilidade existente entre os diferentes gêneros de serpentes.

A existência de múltiplos componentes e suas várias proteoformas também representa um desafio pelas limitações analíticas em si. A elevada complexidade dos venenos faz com que métodos de fracionamento sejam necessários, de modo a reduzir o número de componentes por fração e aumentar assim a identificação de componentes menos abundantes. Nesse sentido, as eletroforeses unidimensional e bidimensional foram aos poucos sendo substituídas por processos cromatográficos (Fox e Serrano, 2008; Calvete, 2011).

Muitos processos cromatográficos podem ser empregados como forma de descomplexação das amostras de veneno, e os resultados sugerem que a análise de subproteomas permite maior identificação de proteínas do que a análise do proteoma total (Paes-Leme *et al.*, 2009; Calvete *et al.*, 2007; Zelanis e Tashima, 2014,).

Com os avanços das metodologias analíticas aplicáveis às proteínas, principalmente a técnica de espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*, MS), o acesso aos componentes dos venenos foi amplificado ao longo dos anos (Calvete *et al.*, 2007; Fox e Serrano, 2008; Calvete, 2011). Outra metodologia, indireta, mas bastante aplicada aos estudos das proteínas de veneno, e que auxilia no progresso das análises proteômicas por espectrometria de massas, é a criação de bibliotecas de cDNA construídas a partir do mRNA isolado das glândulas de veneno (Junqueira de Azevedo e Ho, 2002; Fox e Serrano, 2008; Calvete, 2013).

Assim a geração de bancos de transcriptomas aumentou o número de sequências disponíveis no banco de dados de proteínas, o que impactou diretamente o processo de identificação de proteínas por MS. As primeiras caracterizações de genomas de serpentes só foram publicadas em 2013 (*Python molurus bivittatus* (Castoe *et al.*, 2013) e *Ophiophagus hannah* (Vonk *et al.*, 2013), enquanto que nenhum genoma da família Viperidae foi reportado até o momento. Como alternativa ao uso de um banco de dados de proteínas, para a identificação de proteínas e peptídeos por espectrometria de massas, existe a abordagem denominada “*de novo sequencing*” que utiliza apenas os dados dos espectros de fragmentação dos peptídeos para inferir a sequência de aminoácidos. Neste caso, embora não exista a necessidade do banco de dados, o processo é demorado para análises de uma grande quantidade de dados, o que torna seu emprego laborioso (Zelani e Tashima, 2014).

## 1.4. Glicosilação

### 1.4.1. Glicosilação de proteínas

“Um gene, muitas proteínas, incontáveis glicanos” (Reinhold *et al.*, 2010). O material genético compacta e armazena as informações necessárias para a produção do arsenal proteico celular, que é essencial à manutenção da vida. Como forma de aumentar o poderio deste arsenal, sem aumentar o número de genes, a célula dispõe de um mecanismo de transcrição que permite aumentar o número de proteínas produzidas a partir de um único gene (*splicing* alternativo). Entretanto, são as modificações pós-traducionais que amplificam dramaticamente a complexidade e funcionalidade das proteínas (Reinhold *et al.*, 2010).

A adição de cadeias de carboidratos por meio de ligações covalentes às proteínas é a modificação co- e pós-traducional mais proeminente e complexa encontrada em eucariotos (Spiro, 2002; Hart e Copeland, 2010; Vanderschaeghe *et al.*, 2010; Tharmalingam *et al.*, 2013; Lannoo e Van Damme, 2015). Os dois principais tipos de ligação entre cadeias de carboidratos e proteínas são a N-glicosilação e a O-glicosilação. A letra (N ou O) associada se refere ao átomo da cadeia lateral do resíduo de aminoácido utilizado para a ligação covalente com o oligossacarídeo (denominado glicano). Na N-glicosilação o glicano é adicionado ao átomo de nitrogênio da amida da cadeia lateral de resíduos de asparagina e na O-glicosilação a adição do glicano é feita ao oxigênio da hidroxila da cadeia lateral de resíduos de serina ou treonina (Varki e Sharon, 2009). O processo de glicosilação não é um evento randômico sobre resíduos de asparagina ou serina/treonina ao longo da estrutura primária das proteínas, pois existem regiões da estrutura primária mais ou menos susceptíveis a esta modificação.

Da mesma forma como no caso das proteínas, o significado biológico envolvido na glicosilação de proteínas não pode ser generalizado ou simplificado, pois as atribuições funcionais conferidas por esta modificação à uma determinada proteína podem ser diferentes em cada caso particular, podendo variar de um papel puramente estrutural até uma função sinalizadora específica. Mas, podem ser citadas como funções intrínsecas dos glicanos o aumento da solubilidade, atuação no *fold*ing e *turnover* proteico, proteção contra proteólise e estabilidade (Wormald e Dwek, 1999; Taylor e Drickamer, 2011; Lannoo e Van Damme, 2015,).

Os autores Taylor e Drickamer (2011) ainda classificam algumas funções dos glicanos como sendo extrínsecas a estes, nestes casos a adição dos glicanos está relacionada com tráfego intra- e extracelular, interações célula-célula e célula-matriz e a atuação destas moléculas como mediadores/moduladores da sinalização intra- e extracelular. O termo extrínseco é utilizado porque a ação não é desencadeada pela glicoproteína em si, mas sim por uma interação desta com uma lectina. Lectinas são proteínas que podem ser consideradas como os “receptores” de glicoproteínas. Elas possuem um domínio capaz de interagir com as cadeias de glicanos, o que as faz componentes tão importantes em estudos de glicobiologia quanto os próprios glicanos.

As funções extrínsecas ilustram a importância da glicosilação de proteínas fora do âmbito puramente estrutural, considerando os aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos das glicoproteínas. Como ilustração da importância dessa modificação em organismos multicelulares, experimentos envolvendo a eliminação completa de qualquer classe de glicoconjugados (glicoproteínas ou glicolipídeos) de um organismo resultam na morte deste já nos estágios iniciais de desenvolvimento (Taylor e Drickamer, 2011). Em contrapartida, a produção de células *knockout* para

qualquer glicoconjugado gera células viáveis (Taylor e Drickamer, 2011, Zielinska *et al.*, 2012). Desta forma, é evidente que embora o papel dos glicanos possa ser avaliado no contexto celular, muitas de suas funções só são reconhecidas com um olhar que integre diferentes sistemas de um organismo (Taylor e Drickamer, 2011).

#### 1.4.2. N-glicosilação

Dentre os tipos conhecidos de glicosilação de proteínas, a N-glicosilação é a mais notória de todas. Este fato é consequência de sua enorme frequência (Apweiler *et al.*, 1999), e do maior conhecimento disponível sobre o processo e as consequências da adição de N-glicanos à proteínas.

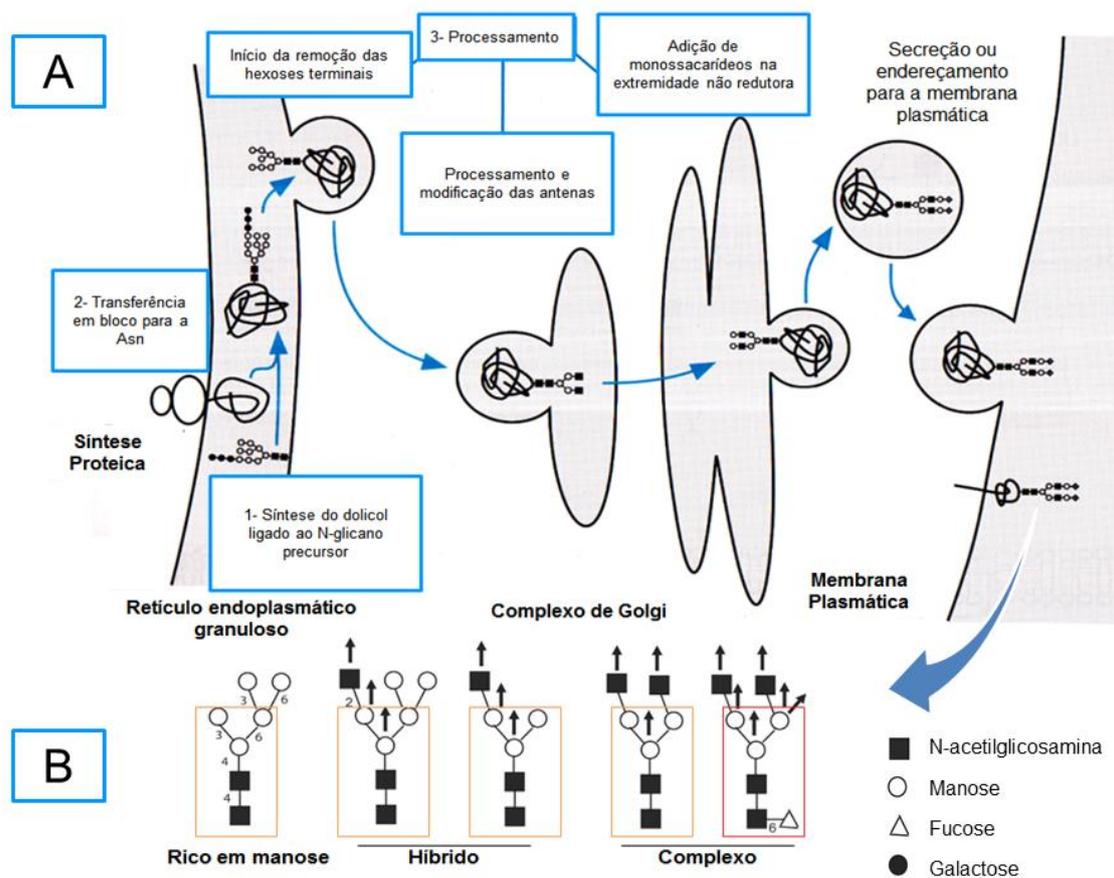
Conforme citado no item 1.4. a adição de cadeias de glicanos ao resíduo de asparagina não é um evento randômico, ao contrário, apenas asparaginas em determinadas posições na estrutura primária são candidatas a se tornarem sítios de N-glicosilação. Esta condição necessária para a glicosilação de uma asparagina é definida como *sequon*, que é uma sequência de aminoácidos composta por Asn-X-Ser/Thr, onde X representa qualquer aminoácido exceto prolina (Schulz, 2012, Lannoo e Van Damme, 2015). Algumas variações deste *sequon* já foram registradas em casos específicos na literatura dos últimos anos, entre elas a sequência Asn-X-Cys (Taylor e Drickammer, 2011; Schulz, 2012) e as sequências S/TXN (sequência reversa do *sequon*) e NCG (Valliere-Dougllass *et al.*, 2010).

Embora necessária para a N-glicosilação de uma proteína, a ocorrência de um *sequon* em uma estrutura primária não implica na obrigatoriedade da ocorrência de glicosilação neste ponto (Lannoo e Van Damme, 2015). A identidade do resíduo X na estrutura do *sequon* (Rao e Wollenweber, 2010) e a inserção deste em um contexto estrutural favorável para a adição da cadeia de glicanos são fatores que

influenciam as chances de uma asparagina ser glicosilada (Taylor e Drickammer, 2011).

O processo de N-glicosilação se inicia no retículo endoplasmático granuloso (REG) durante a síntese proteica que ocorre nos ribossomos e, em decorrência deste fato, esta modificação pós-traducional também recebe a denominação de co-traducional (Taylor e Drickammer, 2011, Lannoo e Van Damme, 2015). A primeira etapa do processo consiste na transferência de um oligossacarídeo denominado precursor que é composto por uma estrutura denominada *core* e três hexoses ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ). Essa transferência ocorre em bloco, ou seja, toda a estrutura do precursor é transferida de um glicolípídeo (dolicol) ao resíduo de Asn da proteína nascente no lúmen do REG (Taylor e Drickammer, 2011). Após a transferência do N-glicano para a Asn e finalização do processo de tradução da proteína, este é então submetido a uma etapa de “*trimming*” (processamento da extremidade não redutora do glicano) que se inicia no REG e continua durante a transição da glicoproteína pelo complexo de Golgi (Taylor e Drickammer, 2011). Nessa etapa há a remoção e adição de novos monossacarídeos ao glicano, processo responsável pela diferenciação das cadeias de N-glicanos entre diferentes espécies de eucariotos e pela geração de diferentes tipos de N-glicanos.

Os N-glicanos são classificados em três categorias: rico em manose, complexo, e híbrido, utilizando como parâmetro para classificação não apenas a composição de monossacarídeos do oligossacarídeo de suas antenas mas também sua estrutura. A Figura 3 ilustra o processo de N-glicosilação de proteínas que ocorre durante o trânsito destas pelo REG e complexo de Golgi e os diferentes tipos de N-glicanos encontrados em animais.



**Figura 3.** Processo de N-glicosilação em células animais e classificação de N-glicanos. Painel A: descrição da rota de N-glicosilação de proteínas partindo da síntese proteica vinculada ao REG até o mecanismo de secreção e incorporação de proteínas na membrana plasmática. Ilustração adaptada de Taylor e Drickammer (2011). Painel B: classificação de N-glicanos. A caixa laranja sinaliza a estrutura denominada *core* dos N-glicanos, que é comum a todos as classes. A caixa vermelha ilustra a adição de uma fucose ao *core*. As setas para cima representam o alongamento das antenas de cada N-glicano. Adaptado de Eisenmann (2005).

A definição de cada classe de N-glicano é o resultado do balanço final entra a ação de manosidases e outras glicosiltransferases envolvidas ao longo do processamento dos oligossacarídeos no REG e no complexo de Golgi. A classificação considera a composição final de monossacarídeos das antenas das estruturas (antena é a denominação das estruturas adicionadas ao core).

Os N-glicanos do tipo rico em manose apresentam apenas manoses como constituintes de suas antenas, o tipo complexo contém antenas cujo alongamento se inicia com N-acetilglicosamina e o tipo híbrido contém antenas contendo unidades de manose e antenas que se iniciam com N-acetilglicosamina.

### 1.4.3 Glicosilação de toxinas

Considerando a existência de diversos componentes N-glicosilados no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* (Lochnit e Geyer, 1995; Murayama *et al.*, 2003; Silva-Junior *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 1998; 2000; 2005; Silva *et al.*, 2004; Yamashiro *et al.*, 2014) e a variabilidade intrínseca deste fluido biológico, é notável que a importância da glicosilação de toxinas permaneça pouco explorada. Um único estudo sobre a N-glicosilação de proteínas do veneno de *Bothrops* mostrou o uso de abordagens *high-throughput* de espectrometria de massas para a caracterização de N-glicanos em venenos de filhote e adulto de *B. jararaca* (Zelanis *et al.*, 2012). A presença de glicosiltransferases nas glândulas de venenos também não tem sido explorada. Porém, recentemente um estudo sobre transcritos de vários tecidos da *B. jararaca* mostrou a presença de alguns unigenes associados a vias de glicosilação, e a análise de enriquecimento de genes indicou a importância de genes associados à glicosilação para a biossíntese de veneno (Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2015). Mais especificamente, esses autores identificaram várias subunidades da enzima doliquil-difosfo-oligosacarídeo glicosiltransferase, uma enzima que atua como elemento essencial no complexo N-oligosacaril transferase no processo de glicosilação de proteínas, com expressão relativamente alta na glândula de veneno.

A ocorrência de glicosilação em toxinas sempre foi muito contextualizada sob o ponto de vista estrutural, uma vez que esta também está envolvida na manutenção da estrutura da toxina. Todavia, conhecer mais adequadamente este processo pode ser de extrema importância para o uso terapêutico de biomoléculas, pois tal propriedade pode influenciar fortemente parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de proteínas (Hart e Copeland, 2010).

#### 1.4. Perspectiva de contribuição do estudo

Com exceção da *B. jararaca*, as demais espécies que compõem o grupo Jararaca ocupam o status de Critically Endangered pela International Union for Conservation of Nature (IUCN) e o acesso a estas espécies é extremamente restrito por órgãos federais como a Marinha Brasileira e o IBAMA. Na ausência de dados sobre a composição do veneno de *B. alcatraz*, sua caracterização à luz de abordagens conjuntas em proteômica, peptidômica e glicômica, deverá trazer uma importante contribuição para elucidar as bases moleculares de sua composição, bem como proporcionar subsídios para o entendimento do complexo processo evolutivo das espécies do Grupo Jararaca.

## 2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral caracterizar o proteoma, peptidoma, glicoproteoma e N-glicoma do veneno de *B. alcatraz*. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Analisar o perfil proteico do veneno por eletroforese unidimensional e bidimensional.
- Identificar as proteínas do veneno por digestão com tripsina e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), e busca em banco de dados.
- Analisar os N-terminais naturais das proteínas do veneno por dimetilação e análise por LC-MS/MS.
- Analisar o peptidoma do veneno por LC-MS/MS, e busca em banco de dados.
- Analisar o N-glicoma do veneno por espectrometria de massas sequencial ( $MS^n$ ).

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Venenos**

Foram utilizadas três amostras de veneno de espécimes de *B. alcatraz*: uma amostra de 20 mg de veneno liofilizado coletado na Ilha de Alcatrazes e uma amostra de veneno não liofilizado proveniente de 6 animais mantidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (cedidas pela Dra. Sílvia Travaglia Cardoso), a qual foi dividida em duas partes, e a uma delas foram adicionados 5 mmoles dos inibidores de proteases EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético; Merck Millipore) e PMSF (sigla em inglês para fluoreto de fenilmetilsulfonila, Sigma-Aldrich). A inclusão de inibidores de proteases foi baseada em dados anteriores publicados pelo nosso grupo (Tashima *et al.*, 2012), onde se observou que a adição destes ao veneno, logo após sua extração, é importante para evitar a degradação de proteínas durante sua manipulação para análise proteômica. As amostras de veneno liofilizado de *B. insularis* e *B. jararaca* foram obtidas do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

Para todas as etapas de quantificação de proteínas do veneno e de suas frações foi utilizado o reagente de Bradford (Bradford, 1976) e uma curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich).

#### **3.2. Análise proteômica**

##### **3.2.1. Eletroforese unidimensional**

As amostras de veneno de *B. alcatraz* foram analisadas por eletroforese unidimensional para visualização de seus perfis proteicos na ausência e presença

de agente redutor. O protocolo utilizado para o procedimento de eletroforese unidimensional foi descrito por Laemmli (1970). Para as análises em condições redutoras  $\beta$ -mercaptoetanol foi escolhido como agente redutor (Sigma-Aldrich) e, após a adição do mesmo, as amostras foram aquecidas a 90°C por 5 minutos.

### 3.2.2. Eletroforese bidimensional

Para as análises dos venenos por eletroforese bidimensional inicialmente estes foram submetidos à focalização isoeétrica em fitas comerciais de 7 cm com um gradiente de pH linear entre 3 e 10 (*Immobiline DryStripGel*, GE Healthcare). Para tanto, 50  $\mu$ g de veneno foram dissolvidos em 125  $\mu$ L da solução comercial *Destreak* (GE Healthcare) contendo 1% de anfólitos para a faixa de pH utilizada (IPG buffer). Essa etapa tem como finalidade a solubilização completa das proteínas para que estas possam ser absorvidas pela malha da fita de acrilamida. Antes da aplicação de sua aplicação sobre a fita, a amostra foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugada a 14 000 x g por 10 minutos. A fita foi então vertida sobre a amostra em um dispositivo de aplicação próprio e reidratada por 18 horas, a temperatura ambiente.

Em seguida o processo de focalização (primeira dimensão) foi realizado no focalizador Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (GE Healthcare) de acordo com informações do fabricante, a 20°C, utilizando um programa de 3 fases. O programa foi montado da seguinte forma: 500 V por 45 minutos, 4.000 V por 180 minutos e 5.000 V por 1 hora.

Após a focalização, as fitas foram removidas e submetidas aos protocolos de redução de pontes de dissulfeto de proteínas com ditioneitol e alquilação de grupos SH com iodoacetamida, pela incubação com as soluções redutora (Tris-HCl

0,05 M, pH 8,4, SDS 20%, glicerol 30%, ureia 6 M e ditioneitol 20 mg/mL) e alquilante (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,4, SDS 20%, glicerol 30%, ureia 6 M, azul de bromofenol 0,002% e iodoacetamida 30 mg/mL). Primeiramente, cada fita foi incubada sob agitação em tubos de centrífuga de 15 mL contendo 12 mL da solução redutora por 10 minutos, e posteriormente incubada pelo mesmo tempo e condições com 12 mL da solução alquilante.

Para a segunda dimensão as fitas foram colocadas sobre géis de SDS-poliacrilamida 12% e cobertas por uma solução de agarose 0,5% contendo 0,5% de azul de bromofenol. A corrida foi realizada a temperatura ambiente sob voltagem constante (120 V) e as proteínas foram coradas pelo método de nitrato de prata.

### **3.2.3. Análise do proteoma total**

#### **3.2.3.1. Digestão de proteínas em solução**

Para a análise do proteoma total dos venenos do grupo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. jararaca* e *B. insularis*), 100 µg de proteínas foram submetidos ao procedimento de digestão com tripsina em solução. A solubilização das proteínas foi feita com uma solução 6 M de ureia em Tris-HCl 100 mM, pH 7,8. A seguir, foram adicionados 5 µL da solução redutora contendo ditioneitol 2 mM. Após 1 hora, foram adicionados 20 µL de uma solução contendo iodoacetamida 2 mM e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por mais 1 hora. Uma nova incubação por 1 hora com 20 µL da solução redutora foi necessária para consumir o excesso de iodoacetamida. Uma vez que as proteínas tiveram suas pontes de dissulfeto reduzidas e os resíduos de cisteína alquilados, foram adicionados 775 µL de água desionizada para reduzir a concentração de ureia presente para 0,6 M, a qual não

interfere na atividade enzimática da tripsina. Em seguida, foram adicionados 2 µg de tripsina e a reação foi incubada a 37°C por 18 horas. A proporção de enzima-substrato foi de 1:50 (m/m; enzima:substrato).

No dia seguinte, a reação foi interrompida pela adição de 10 µL de ácido fórmico concentrado, para diminuir o pH do meio. Posteriormente, as amostras foram concentradas por centrifugação a vácuo (Christ) e os peptídeos foram dissolvidos em 400 µL de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v). Os peptídeos foram então dessalinizados em cartuchos de extração em fase sólida C-18 (Sep-pak Short tC18; Waters) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Após a dessalinização os peptídeos foram novamente concentrados e dissolvidos em 100 µL de ácido fórmico 0,1% para análise por LC-MS/MS.

### **3.2.3.2. LC-MS/MS**

Para a análise de LC-MS/MS, realizada em duplicata, 3 µL da solução de peptídeos foram injetados em uma pré-coluna de C-18 de 2 cm de comprimento (100 µm D.I. x 360 µm D.E.), empacotada no laboratório, utilizando o cromatógrafo Easy II-nanoLC system (Proxeon) acoplado ao espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). A separação cromatográfica dos peptídeos foi realizada em uma coluna de 10 cm de comprimento (75 µm D.I. x 360 µm D.E.) empacotada no laboratório com *beads* de C-18 de 5 µm Aqua C-18 (Phenomenex). Os peptídeos foram eluídos da coluna por meio de um gradiente linear de acetonitrila de 3 a 35% em ácido fórmico 0,1% sob fluxo de 200 nL/min. A voltagem do spray de ionização foi configurada para 2.0 kV e o espectrômetro de massas foi operado no modo *DDA*, no qual o  $MS^1$  (ou *full MS scan*) foi adquirido utilizando a faixa de m/z 300-1800 para varredura com resolução de 30.000 no modo FTMS. A

fragmentação dos dez íons mais intensos de cada MS<sup>1</sup> foi realizada por CID (*collision induced dissociation*) e os fragmentos analisados no *ion trap*. A configuração da janela de isolamento, tempo de ativação e energia normalizada de colisão foram, respectivamente, 3 m/z, 30 ms e 35%. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 90 segundos, com uma lista contendo 500 íons, para diminuir a aquisição repetida de um mesmo valor de *m/z*.

### 3.2.3.3. Análise dos dados

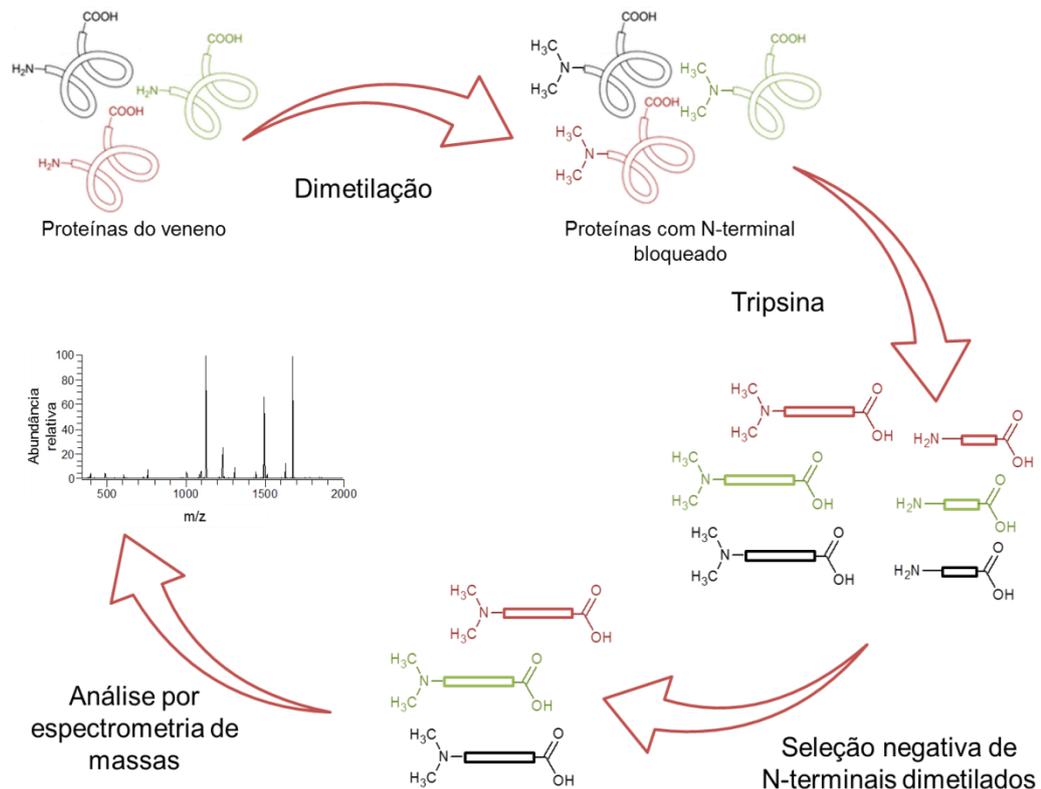
Os dados brutos (.raw files) dos espectros de MS/MS foram submetidos à busca no banco de dados por meio do programa MaxQuant 1.5.3.12 (Cox *et al.*, 2008) utilizando como banco as sequências anotadas na taxonomia Serpentes do Uniprot (disponível em 16/09/2015; <http://www.uniprot.org/>; 58.974 sequências) mais as sequências obtidas pelo sequenciamento dos transcritos da glândula de veneno de *B. jararaca* (Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2015) cedidas pelo Dr. Inácio de Loiola Meireles Junqueira de Azevedo, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan.

Como modificações variáveis foram estabelecidas a oxidação de resíduos de metionina e a deamidação de resíduos de asparagina e glutamina, enquanto que a carbamidometilação de resíduos de cisteína foi estabelecida como modificação fixa. Os valores de tolerância para as massas observadas foram 20 ppm para os precursores selecionados no MS<sup>1</sup> e 0,5 Da para os fragmentos analisados no *ion trap*. A enzima selecionada foi a tripsina, com a tolerância máxima de 2 sítios de clivagem perdidos. Para a quantificação relativa de proteínas foi estabelecido o uso do algoritmo LFQ (*label free quantification*) entre as amostras de *B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca*. A taxa de falsos positivos máxima estabelecida foi de 1%.

### 3.3. Análise N-terminômica

#### 3.3.1. Seleção de N-terminais naturais

A análise dos N-terminais naturais das proteínas presentes no veneno de *B. alcatraz* foi realizada utilizando o método denominado TAILS (do inglês *Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates*) descrito por Kleifeld *et al.* (2010). Em linhas gerais, este método consiste na marcação de N-terminais das proteínas por dimetilação redutiva, seguida pelo enriquecimento de amostras contendo os N-terminais marcados e análise por espectrometria de massas. As proteínas são desnaturadas, alquiladas e submetidas à marcação por dimetilação, processo que permite o “bloqueio” das aminas primárias do N-terminal e resíduos de lisina. Em seguida, a reação de digestão com tripsina gera peptídeos com novos N-terminais livres, isto é não dimetilados, que são removidos da amostra posteriormente. Por fim, os peptídeos selecionados correspondem àqueles com N-terminal bloqueado (N-terminais naturais) que são submetidos ao processo de dessalinização, fracionamento e finalmente submetidos à análise por espectrometria de massas. A Figura 4 contém um resumo do método utilizado.



**Figura 4.** Representação esquemática do método TAILS utilizado para análise do N-terminoma do veneno de *B. alcatraz*. A representação gráfica das proteínas foi adaptada do trabalho de Temming *et al.* (2013).

### 3.3.2. Desnaturação, redução e alquilação

Os primeiros passos do protocolo incluíram a desnaturação e redução das proteínas do veneno (500 µg) utilizando como agente desnaturante hidrócloro de guanidina (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 4 M e como agente redutor o ditiotretol a 5 mM. A solução foi mantida a 65°C por 1 hora e, em seguida, a reação de carbamidometilação das cisteínas foi feita pela adição de 15 mM de iodoacetamida (Sigma-Aldrich) e posterior incubação a temperatura ambiente por 1 hora em ambiente protegido da luz.

O excesso de iodoacetamida foi consumido por 10 mM de ditiotretol que foram adicionados logo após a reação de alquilação. Decorridos 15 minutos de

incubação a temperatura ambiente o pH da solução foi ajustado para 7 utilizando 4  $\mu\text{L}$  de uma solução de hidróxido de sódio 100 mM. O ajuste do pH da solução é necessário para a próxima etapa do protocolo que consiste na dimetilação das aminas primárias.

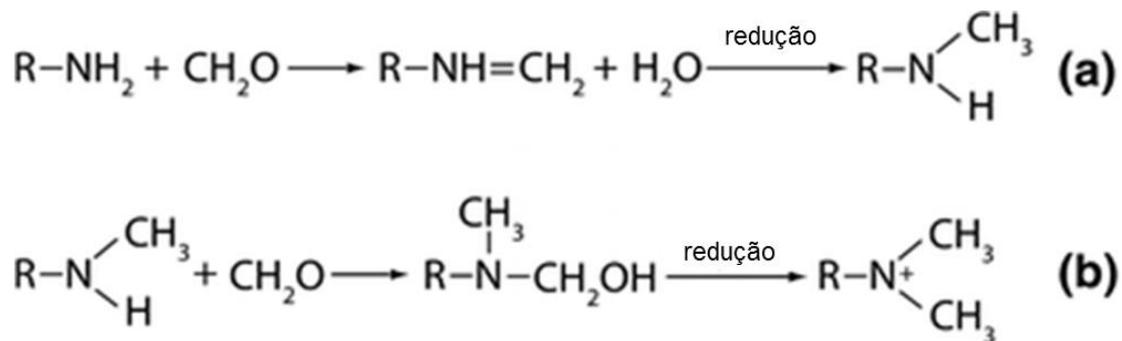
### 3.3.3. Dimetilação redutiva

O método TAILS preconiza o uso de reagentes de dimetilação contendo isótopos de C e H para análises quantitativas entre diferentes amostras, mas no caso deste trabalho específico isto não foi realizado. As proteínas do veneno foram marcadas por dimetilação usando apenas reagentes contendo átomos com distribuição isotópica normalmente observada na natureza e que na análise dos peptídeos identificados foram responsáveis por um incremento de massa de 28 Da por resíduo de aminoácido modificado (N-terminal ou lisina).

O processo de dimetilação redutiva foi realizado usando cianoborohidreto de sódio (Sigma-Aldrich) como agente redutor. As concentrações finais dos reagentes utilizados foram 40 mM de formaldeído e 20 mM de cianoborohidreto de sódio e a reação ocorreu a 37°C por 18 horas. No dia seguinte foram adicionados mais 40 mM de formaldeído e 20 mM de cianoborohidreto de sódio e a reação foi mantida a 37°C por mais 2 horas, para garantir a dimetilação dos resíduos de lisina e dos *N*-terminais naturais livres das proteínas. A Figura 5 apresenta os processos envolvidos na dimetilação dos resíduos de lisina e do N-terminal livre de proteínas.

Para o consumo do excesso de reagentes da reação de dimetilação, Tris 100 mM (Sigma-Aldrich) foram adicionados e a solução mantida novamente a 37°C por 2 horas.

Posteriormente, as proteínas foram precipitadas com 8 volumes de acetona e 1 volume de metanol gelados por 3 horas à  $-80^{\circ}\text{C}$ . A amostra foi centrifugada a  $14.000 \times g$  por 15 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$  e submetida a duas lavagens com 1 volume de metanol gelado e centrifugação por 10 minutos a  $14000 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 5.** Esquema da reação de dimetilação redutiva de aminas primárias utilizando formaldeído como fonte dos grupos metilas (Reproduzido de Abraham *et al.*, 2008). (a): descrição do processo de substituição de um hidrogênio por uma metila ( $\text{CH}_3$ ); (b): substituição do segundo hidrogênio gerando o produto final dimetilado.

### 3.3.4. Digestão com tripsina

Ao precipitado de proteínas foram adicionados  $12,5 \mu\text{L}$  de uma solução aquosa de hidróxido de sódio  $100 \text{ mM}$  e, após sua dissolução completa, foram adicionados  $450 \mu\text{L}$  de uma solução de HEPES  $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,5$  (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfônico) (Sigma-Aldrich).

A proporção utilizada de tripsina:substrato foi de  $1:100 \text{ (m/m)}$  (Sigma-Aldrich) e a reação foi mantida a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Antes da adição da enzima, uma alíquota de  $2 \mu\text{L}$  de reação foi reservada e congelada para o passo de confirmação da eficiência da digestão da amostra por tripsina. Para tanto, esta amostra foi comparada com  $2 \mu\text{L}$  da reação reservados após as 18 horas de digestão, por eletroforese unidimensional em géis de poliacrilamida  $12\%$  contendo SDS (Sigma-Aldrich) (Laemmli, 1970).

Após a confirmação da eficiência da digestão por tripsina, o próximo passo incluiu a seleção negativa dos N-terminais naturais das proteínas utilizando a resina AminoLink Plus Immobilization 44894 (Thermo Scientific). O passo de digestão com tripsina gerou os peptídeos que foram submetidos à identificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Mas este processo do protocolo *bottom up* levou também à geração de novos N-terminais, que diferentemente dos N-terminais naturais presentes na amostra, apresentavam suas aminas primárias sem marcação por dimetilação.

Aproveitando o mesmo princípio utilizado na marcação dos N-terminais e lisinas, mas utilizando um suporte sólido como fonte de moléculas contendo a função aldeído, os N-terminais gerados pelo tripsina foram removidos pois estes reagiram com a resina e foram imobilizados, permitindo que apenas os N-terminais marcados permanecem em solução e pudessem ser eluídos.

A dimetilação dos resíduos de lisina altera o processo de digestão com tripsina, pois as lisinas dimetiladas não constituem mais sítios de clivagem, o que faz com que apenas os resíduos de arginina sejam reconhecidos pela enzima. Dessa forma, os peptídeos gerados se tornam maiores do que seriam na ausência da marcação e para aperfeiçoar a identificação dos peptídeos gerados foram selecionados apenas os peptídeos com massa molecular menor que 10 kDa utilizando um micro-concentrador Ultracel (Merck Millipore).

Em seguida, a solução de peptídeos recuperada foi dessalinizada utilizando cartuchos de extração em fase sólida C18 (Sep-Pak Short tC18; Waters), seguindo protocolo indicado pelo fabricante.

Como método de fracionamento e dessalinização dos peptídeos foi utilizado o protocolo de *StageTip* (descrito por Rappsilber *et al.*, 2007) onde ponteiros de 200

$\mu\text{L}$  contendo 3 discos de membranas de teflon (3M), uma membrana de SCX (do inglês *Strong Cation Exchange*) intercalada com duas membranas com *beads* de C18 imobilizados em uma malha de Teflon, foram utilizadas para fracionamento da amostra em 5 frações, que incluíram: material não retido, material retido apenas na C18, e material eluído da SCX com NaCl 100 mM, NaCl 250 mM e NaCl 500 mM.

O material recuperado do protocolo da Sep-Pak foi dissolvido em 100  $\mu\text{L}$  da solução de acetonitrila 5% em ácido acético 1%, e dividido em duas StageTips, sendo que as frações destas foram coletadas separadamente, porém as mesmas frações de cada StageTip foram coletadas no mesmo microtubo por tratarem-se da mesma amostra. No caso da fração não retida, foi necessária uma etapa adicional de dessalinização utilizando ponteiras de 200  $\mu\text{L}$  contendo dois discos de membrana contendo *beads* de C18.

### 3.3.5. LC-MS/MS

As frações foram secas por centrifugação a vácuo (Christ) e cada fração foi dissolvida em 15  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 0,1% dos quais 10  $\mu\text{L}$  foram submetidos a análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado ao sistema de nanoLC Easy II (Proxeon).

Para tanto o volume de 10  $\mu\text{L}$  foi injetado em pré-colunas de C18 (100  $\mu\text{m}$  x 50 mm x 10  $\mu\text{m}$ ) (diâmetro interno x comprimento x tamanho de partícula), empacotadas em laboratório, para concentração da amostra e remoção de sais que pudessem estar presentes. Os peptídeos foram separados em uma coluna analítica contendo *beads* de resina C18 (75  $\mu\text{m}$  x 100 mm x 5  $\mu\text{m}$ ).

Após o carregamento da amostra foi utilizado um gradiente cromatográfico com duração de 90 minutos, a uma vazão de 250 nL/min e composto por água (A) e acetonitrila (B) contendo 0,1% de ácido fórmico. O sistema partiu de uma

concentração de 7% de B e levou 77 minutos para atingir 40%, depois atingiu 85% de B em 8 minutos, permanecendo por mais 2 minutos nesta condição e retornando para a condição inicial em 1 minuto e permanecendo nesta por 2 minutos. Os espectros de massas foram obtidos por meio do analisador FTMS com uma resolução de 60.000 na faixa de  $m/z$  de 300-1800 (*mass range*). O método de fragmentação escolhido foi CID e apenas íons com duas ou mais cargas foram selecionados para fragmentação. A energia de colisão usada para a obtenção dos fragmentos (espectros de MS/MS) foi de 35 eV, e os fragmentos foram analisados no *ion trap*. A voltagem da fonte foi fixada em 2,5 kV e o tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 90 segundos, com uma lista contendo 500 íons, para diminuir a aquisição repetida de um mesmo valor de  $m/z$ .

### 3.3.6. Análise bioinformática

Os dados brutos (.raw files) dos espectros de MS/MS foram submetidos à busca no banco de dados por meio do programa MaxQuant 1.5.3.12 (Cox *et al.*, 2008) utilizando como banco as sequências anotadas na taxonomia Serpentes do Uniprot (disponível em 16/09/2015; <http://www.uniprot.org/>; 58.974 sequências) mais as sequências obtidas pelo sequenciamento dos transcritos da glândula de veneno de *B. jararaca* (Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2015).

Para a busca no bando de dados, como modificações variáveis foram escolhidas: oxidação da metionina, deamidação de resíduos de asparagina e glutamina, acetilação do N-terminal de peptídeos, dimetilação do N-terminal de peptídeos (contendo apenas isótopos leves de C e H), conversão de ácido glutâmico e glutamina em ácido piroglutâmico. Como modificações fixas foram escolhidas a carbamidometilação das cisteínas e a dimetilação de lisinas. Como valores de tolerâncias para as massas monoisotópicas observadas foram considerados 20 ppm

para os eventos de MS e 0,5 Da para os eventos de MS/MS, e foram considerados íons com carga +2,+3, ou +4. A enzima de escolha foi a semi- Arg-C, pois o processo de dimetilação dos resíduos de lisinas interfere na especificidade da tripsina, que passa a clivar apenas após resíduos de arginina, foram admitidas no máximo 2 clivagens perdidas. A taxa de falsos positivos máxima foi estabelecida como sendo de 1%.

Os peptídeos identificados sem modificação no resíduo N-terminal foram descartados, pois estes foram gerados pela digestão com tripsina e não correspondem a N-terminais naturais. As anotações foram feitas no programa Microsoft Excel 2007. A anotação da posição dos peptídeos encontrados nas estruturas das proteínas identificadas foi feita manualmente utilizando as informações disponíveis no banco de sequência de proteínas utilizado.

### **3.4. Análise peptidômica**

Para a análise da fração peptídica do veneno de *B. alcatraz* foi utilizada a amostra coletada na presença de inibidores de proteases. A concentração de proteínas presentes na amostra foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e o volume correspondente a 1 mg de proteínas foi diluído em 1 mL de solução de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA) (Sigma-Aldrich) e aplicado em um cartucho de extração em fase sólida C-18 light (Sep-Pak Short tC18; Waters). A amostra foi lavada com 3 mL de TFA 0,1% e a fração peptídica foi eluída com 1,5 mL de acetonitrila 30% em 0,1% TFA. Esta fração foi evaporada em um sistema de concentração a vácuo (Christ) e dissolvida em 15 µL de ácido fórmico 0,1%.

### 3.4.1. LC-MS/MS

A amostra da fração peptídica foi submetida à análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado ao sistema de nanoLC Easy II (Proxeon).

Para a cromatografia líquida foram utilizadas uma pré-coluna de C18 (100  $\mu\text{m}$  x 40 mm x 10  $\mu\text{m}$ ) (diâmetro interno x comprimento x tamanho de partícula) e uma coluna analítica C18 (75  $\mu\text{m}$  x 100 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) empacotadas no laboratório. Foram realizadas 3 réplicas técnicas consecutivas injetando 3  $\mu\text{L}$  de amostra em cada análise.

A cromatografia líquida foi realizada utilizando como solvente (A) uma solução aquosa de 0,1% ácido fórmico, e como solvente (B) acetonitrila em 0,1% ácido fórmico. O gradiente de eluição linear utilizado partiu de uma concentração de 5% de B e em 60 minutos atingiu 40%. Os espectros de massas foram obtidos por meio do analisador FTMS com a resolução de 60.000 na faixa de  $m/z$  de 400 a 2000 (*mass range*). O método de fragmentação escolhido foi HCD (*high-energy collision dissociation*) e os íons monocarregados foram rejeitados. A energia de colisão usada para a fragmentação foi 40 eV e o tempo de ativação de 0,1 ms. A voltagem da fonte de ionização foi fixada em 2,5 kV. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 90 segundos, com uma lista de 500 íons. Na análise por HCD o espectro de  $\text{MS}^1$  foi obtido com a resolução de 30.000, enquanto que para as análises de  $\text{MS}/\text{MS}$  a resolução foi de 7.500 para os fragmentos.

### 3.4.2. Análise dos dados

Os arquivos brutos provenientes das três análises por LC-MS/MS foram submetidos à análise bioinformática utilizando o programa Peaks Studio 7.5 (Ma *et*

al., 2003). Este programa difere das tradicionais ferramentas de busca por utilizar dados do sequenciamento *de novo* dos peptídeos da amostra para o procedimento de busca no banco de dados. Para a análise dos dados foram utilizados os arquivos brutos (.raw) gerados pela análise por LC-MS/MS.

O primeiro procedimento do tratamento dos dados foi a configuração dos parâmetros utilizados na análise dos espectros para o sequenciamento *de novo*. Como tolerância de massa foram utilizados os valores de 15 ppm para o íon precursor e 0,02 Da para os fragmentos observados no MS/MS. Como modificações variáveis foram selecionadas a oxidação dos resíduos de metionina, a deamidação dos resíduos de asparagina e glutamina, a acetilação do N-terminal de peptídeos, e a conversão de resíduos de ácido glutâmico e de glutamina em ácido piroglutâmico (<E).

No programa, no campo correspondente à especificação da enzima utilizada foi escolhida a opção *none* (sem enzima) e como banco de dados foi utilizado o banco Serpentes do Uniprot (disponível em 16/09/2015; <http://www.uniprot.org/>; 58974 sequências) mais as sequências obtidas pelo sequenciamento *de novo* dos transcritos da glândula de veneno de *B. jararaca* (Junqueira-de-Azevedo et al., 2015). Como filtro dos peptídeos identificados pelo sequenciamento *de novo* foram consideradas apenas identificações com valores de ALC (*Average Local Confidence*) superiores a 80%. *Local Confidence* é um valor percentual que representa a convicção do algoritmo na identificação de cada aminoácido presente no peptídeo. O valor final utilizado para filtro (ALC) representa a média dos valores de convicção na identificação de cada aminoácido na sequência. Para os peptídeos identificados no banco de dados foi considerada uma taxa de FDR (*False Discovery Rate*) < 1% e um valor para  $-10 \lg P \geq 20$  para a pontuação dos peptídeos.

### **3.5. Análise glicoproteômica**

#### **3.5.1. Tratamento com neuraminidase**

Para essa análise, 100 µg de proteínas de cada veneno do grupo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. jararaca* e *B. insularis*) em solução de acetato de sódio 50 mM, pH 5,1 contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, foram incubados com 10 mU da enzima neuraminidase (Worthington), a 37°C por 24 horas. Como controle negativo, as amostras de cada veneno foram submetidas às mesmas condições de incubação, porém sem a adição de enzima.

#### **3.5.2. Tratamento com N-glicosidase**

Para o experimento de N-desglicosilação dos venenos do grupo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. jararaca* e *B. insularis*), a 100 µg de proteínas em 100 µL de fosfato de sódio 500 mM, pH 7,5 foram adicionados 2,5 µL de uma solução desnaturante (SDS 5% e ditioneitol 0,4 M) e a mistura foi incubada a 90°C por 15 minutos. Após resfriamento a 4°C por 10 minutos, 2,5 µL de uma solução do detergente NP-40 10% (m/v) e 2 U da enzima PNGase F (Roche) foram adicionados e a mistura foi incubada por 18 horas a 37°C. O controle negativo foi submetido às mesmas condições, mas sem a adição de enzima.

#### **3.5.3. Tratamento com O-glicosidase**

Para o experimento de O-desglicosilação dos venenos do grupo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. jararaca* e *B. insularis*) foram usadas as enzimas e reagentes do kit Glycoprotein Deglycosylation Kit (Merck Millipore). Para esses experimentos foram

utilizadas 20 µg das proteínas, dissolvidas em fosfato de sódio 250 mM, pH 7,0, e submetidas à desnaturação pela adição de SDS 0,02% e β-mercaptoetanol 0,01 M. As misturas foram mantidas a 100°C por 5 minutos e após seu resfriamento a temperatura ambiente foram adicionados Triton X-100 0,15% (concentração final) e 0,1 µL de cada enzima disponível no kit (α2-3,6,8,9-Neuraminidase, Endo-α-N-acetilgalactosaminidase, β1,4-galactosidase e β-N-Acetilglucosaminidase). A reação foi mantida a 37°C por 16 horas. Como controle negativo, as amostras dos venenos foram submetidas às mesmas condições de incubação, porém sem a adição das enzimas.

#### **3.5.4. Cromatografia de afinidade à lectinas**

Os experimentos de cromatografia de afinidade foram realizados utilizando resinas contendo as lectinas Concanavalina A (ConA), *Wheat Germ Agglutinin-agarose* (WGA) e *Peanut Agglutinin-agarose* (PNA) (Sigma-Aldrich). As colunas foram montadas em seringas de 3 mL, às quais foi adicionada uma fina camada de lã de vidro sobre a qual foram adicionados 1 mL de cada resina, que foram inicialmente condicionadas com 5 mL de cloreto de sódio 1 M, MgCl<sub>2</sub> 5mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM e CaCl<sub>2</sub> 5 mM. Em seguida cada coluna foi equilibrada com sua respectiva solução de equilíbrio; no caso da ConA e WGA foi utilizada uma solução de Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e CaCl<sub>2</sub> 5 mM, e para a PNA HEPES 10 mM, pH 8,0, contendo NaCl 150 mM e CaCl<sub>2</sub> 2 mM.

A massa de 10 mg de veneno de *B. alcatraz*, obtida da amostra de veneno coletada sem inibidores, foi dissolvida em 1 mL de solução de equilíbrio de cada lectina e aplicada nas colunas previamente equilibradas. Durante 20 minutos a solução de veneno foi mantida na coluna, com agitações periódicas (utilizando uma pipeta para perturbação do sistema bifásico), a cada 5 minutos. A fração não retida

de proteínas das cromatografias foi coletada por meio da lavagem da coluna com 12 mL da solução de equilíbrio de cada lectina. As frações retidas foram eluídas em duas etapas. Na primeira, para a ConA utilizou-se 5 mL de glicose 0,5 M, para a WGA 5 mL de N-acetilglicosamina 0,5 M, e para a PNA 3 mL de galactose 0,5 M; as soluções de eluição foram preparadas nas respectivas soluções de equilíbrio. Na segunda etapa, uma fração adicional de alta afinidade, de proteínas não eluídas por meio da solução anterior, foi coletada utilizando, para a ConA, 5 mL de uma solução de acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, contendo cloreto de sódio 1 M, enquanto que para a WGA e PNA foram utilizadas 5 mL e 3 mL, respectivamente, das soluções de eluição anteriores, porém com pH 3,0.

Para as análises por eletroforese unidimensional e identificação de proteínas por espectrometria de massas, as frações eluídas tiveram suas concentrações proteicas quantificadas pelo método de Bradford e o volume correspondente a 150 µg de proteínas foi submetido a precipitação pela adição de 8 volumes de acetona gelada e 1 volume de metanol. Após um período de incubação a -80°C por 3 horas as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 15 minutos (4°C). Os precipitados de proteínas foram lavados com metanol gelado, e após sua recuperação por um novo ciclo de centrifugação, as proteínas foram dissolvidas e quantificadas pelo método de Bradford.

Para a análise das proteínas com afinidade pela PNA, uma etapa adicional fez-se necessária, pois ao adicionar acetona e metanol gelados, a galactose presente no meio precipitou juntamente com as proteínas. Deste modo, após a centrifugação, observou-se um sistema bifásico composto por uma fase mais densa e amarelada contendo galactose e proteínas, e uma fase orgânica composta por acetona. A fase superior foi descartada e, em seguida, a fase composta por galactose e

proteínas foi dissolvida em 500  $\mu\text{L}$  de tampão HEPES 100 mM, pH 8 e 200  $\mu\text{L}$  de fenol. Durante 10 minutos o sistema foi agitado periodicamente e mantido em banho de gelo. Decorrido este tempo, o sistema foi centrifugado por 10 minutos a 4°C a 10.000 g. A fase orgânica e uma pequena parte da interface foram removidas e submetidas ao processo de precipitação de proteínas utilizando 8 volumes de acetona e 1 volume de metanol, seguida de uma incubação a -80°C por 2 horas e posterior centrifugação a 20.000 g por 15 minutos, a 4°C. Visando remover traços de fenol, o precipitado foi lavado com 200  $\mu\text{L}$  de acetona gelada e, em seguida, dissolvido em 200  $\mu\text{L}$  de água desionizada. Em seguida, estas amostras foram submetidas à quantificação pelo método de Bradford.

#### **3.5.4.1. Digestão em solução com tripsina**

As amostras obtidas das cromatografias utilizando as lectinas ConA e WGA, (100  $\mu\text{g}$  de proteínas) e PNA (15  $\mu\text{g}$  de proteínas ) foram submetidas à digestão com tripsina em solução como descrito no item 3.2.3.1.

#### **3.5.4.2. LC-MS/MS**

Da solução de peptídeos tripsínicos, 5  $\mu\text{L}$  foram submetidos a análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado ao sistema de cromatografia EASY II-nanoLC system (Proxeon).

O volume de amostra foi injetado em pré-colunas de C18 (100  $\mu\text{m}$  x 50 mm x 10  $\mu\text{m}$ ) (diâmetro interno x comprimento x tamanho de partícula) empacotadas em laboratório, para concentração da amostra e remoção de sais que poderiam estar presentes. Em seguida, os peptídeos foram separados em uma coluna analítica contendo *beads* de C18 (75  $\mu\text{m}$  x 100 mm x 5 $\mu\text{m}$ ). Após o carregamento da amostra

foi utilizado um gradiente de eluição com duração de 90 minutos, sob fluxo de 250 nL/min e composto por água (A) e acetonitrila (B) contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente foi iniciado com a concentração de 7% de B e em 70 minutos atingiu 40% de B, a seguir atingiu 85% de B em 10 minutos, permanecendo por mais 5 minutos nesta condição e retornou para a condição inicial em 5 minutos. Os espectros de massas foram obtidos por meio do analisador FTMS com resolução de 60.000 na faixa de  $m/z$  de 300-1800 (*mass range*). O método de fragmentação escolhido foi CID (*collision-induced dissociation*) e apenas íons com duas ou mais cargas foram selecionados para fragmentação. A energia de colisão usada para a obtenção dos fragmentos (espectros de MS/MS) foi de 35 eV, sendo a varredura realizada entre 300 e 1800  $m/z$ , e os fragmentos foram analisados pelo *ion trap*. A voltagem da fonte foi fixada em 2,5 kV. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 90 segundos, com uma lista contendo 500 íons, para diminuir a aquisição repetida de um mesmo valor de  $m/z$ .

#### **3.5.4.3. Análise dos dados**

A análise dos dados seguiu os mesmos parâmetros descritos no item 3.2.3.3., com exceção da opção de quantificação *label free* (algoritmo LFQ), a qual não foi habilitada.

### **3.6. Análise N-glicômica**

As análises do N-glicoma apresentadas a seguir foram realizadas no laboratório do Professor Dr. Vernon Reinhold (Glycomics Center, University of New Hampshire, Durham, NH, EUA) no período de 17/09/2014 a 17/03/2015. Este estágio foi financiado pela FAPESP (Bolsa BEPE, processo 2014/12245-0). Dado o

escopo deste estudo, que previa a caracterização do veneno de *B. alcatraz* em comparação aos venenos do grupo Jararaca, as amostras de *B. jararaca* e *B. insularis* foram incluídas nesta análise.

### 3.6.1. N-desglicosilação enzimática

Para a remoção dos N-glicanos presentes nas glicoproteínas dos venenos de *B. alcatraz* (amostra oriunda da Ilha de Alcatrazes), *B. insularis* e *B. jararaca* (obtidos do Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan), 1 mg de cada amostra de veneno liofilizado foi dissolvida em 300  $\mu$ L de bicarbonato de sódio 50 mM, pH 8,0, contendo dodecil sulfato de sódio 0,09% e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05 M, e incubadas a 100°C por 10 minutos. Após a desnaturação as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos para resfriamento e foram adicionados 15  $\mu$ L de uma solução de NP-40 10% e 15  $\mu$ L de fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5. A cada amostra foram adicionados 2,5  $\mu$ L de PNGase F 2,5 mU/mL (Prozyme) e as amostras foram incubadas por 8 horas a 37°C. Posteriormente foram adicionados mais 2,5  $\mu$ L de enzima e as amostras foram mantidas a 37°C por mais 40 horas. No total foram utilizados 12,5 mU de enzima e 48 horas de reação.

### 3.6.2. Extração em fase sólida

Após a liberação enzimática dos N-glicanos presentes nas glicoproteínas dos venenos do grupo Jararaca, a remoção de proteínas e detergentes foi feita utilizando um cartucho de extração em fase sólida (C18) (Sep-Pak; Waters). Durante o procedimento o cartucho foi sequencialmente lavado com 3 mL de metanol, 3 mL de uma solução de equilíbrio (ácido acético 5% em isopropanol 5%), 3 mL de isopropanol e mais 4 mL da solução de equilíbrio. O volume das amostras foi

ajustado para 1 mL com água Milli-Q e estas foram individualmente aplicadas no cartucho. O volume de 1 mL (*flow-through*) foi coletado em um tubo de vidro e o cartucho lavado com mais 3 mL da solução de equilíbrio. As lavagens foram coletadas no mesmo tubo que o *flow-through* e o volume total foi seco em um sistema de centrifugação a vácuo (Labconco). Após a secagem, os N-glicanos foram dissolvidos em 200 µL de metanol 50% em água e 10% desse volume foram reservados para marcação fluorescente com ácido aminobenzóico e análise por LC-MS (análise quantitativa), e o restante do material foi utilizado na análise qualitativa.

### **3.6.3. Análise Qualitativa**

#### **3.6.3.1. Redução e Dessalinização**

As amostras foram secas novamente por centrifugação a vácuo e dissolvidas em 400 µL de uma solução de complexo borano amônia (10 mg/mL) em hidróxido de amônio. A reação foi mantida por duas horas a 50°C, com agitações a cada 30 minutos. Para remoção do excesso de reagentes, as amostras foram secas por centrifugação a vácuo e lavadas por 3 vezes com 2 mL de metanol.

Os N-glicanos reduzidos foram dessalinizados utilizando carvão grafitizado poroso (*Porous Graphitized Carbon*, PGC; Agilent) que foi previamente lavado com hidróxido de sódio 3M. Um cartucho vazio foi preenchido com 250 µL de PGC e lavado com 4 mL de água Milli-Q. Os N-glicanos reduzidos foram dissolvidos em 1 mL de água Milli-Q e carregado na coluna de PGC. A coluna foi lavada com 8 mL de água Milli-Q e os N-glicanos foram eluídos com acetonitrila 40% em ácido trifluoroacético 0,1%. A amostra final foi seca por centrifugação a vácuo.

#### **3.6.3.2. Permetilação**

Os N-glicanos foram permetilados usando *beads* de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich), *spin column* (Harvard Apparatus), dimetilsulfoxido e iodometano (Sigma-Aldrich). Para tanto, uma *spin column* foi preenchida com *beads* de hidróxido de sódio e lavada com 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por duas vezes. Em seguida a amostra foi dissolvida em 100 µL de DMSO e 100 µL de iodometano e aplicada na coluna de hidróxido de sódio. Após uma incubação de 30 minutos a coluna foi centrifugada a 538 x g por 2 min. Uma nova adição de iodometano (100 µL) foi realizada e a amostra foi incubada por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação a coluna foi lavada com 300 µL de DMSO e 400 µL de acetonitrila. Todos os volumes foram coletados no mesmo tubo e resfriados sobre gelo. Os N-glicanos permetilados foram dessalinizados por um processo de extração líquido-líquido usando clorofórmio e água gelada. As amostras foram secas usando corrente de nitrogênio e dissolvidas em metanol 50%.

### **3.6.3.3. Espectrometria de massas sequencial (MS<sup>n</sup>)**

A injeção direta das amostras foi feita usando o equipamento Triversa Nanomate (Advion) acoplado ao espectrômetro de massas LTQ (Thermo Scientific). Os parâmetros do spray de ionização foram configurados para 1,4-1,8 kV, 0,4 psi de nitrogênio, 10-150 nA de corrente. Para aquisição dos espectros foi utilizado o modo positivo e habilitada a opção “*enhanced*” no *scan rate*, os demais parâmetros como número de *microscans*, *AGC target value* e o tempo máximo de injeção variaram de acordo com a intensidade do sinal. *Activation Q* e o tempo de ativação para a fragmentação por *CID* foram mantidos com os valores *default*, 0,250 e 30 ms, respectivamente, a energia normalizada de colisão foi mantida em 35%. A seleção

do íon precursor foi feita manualmente e a janela de isolamento foi estabelecida de modo a capturar todo o envelope isotópico. Pelo menos um *scan* de cada isolamento dos íons precursores com energia de colisão definida como 0 foi adquirido em cada arquivo de fragmentação para documentação. Em alguns casos foi utilizado o espectrômetro LTQ Velos Pro (Thermo Scientific) no lugar do LTQ e este também foi acoplado ao sistema Triversa Nanomate para a execução das injeções diretas. A metodologia usada no LTQ Velos Pro foi a mesma utilizada no LTQ, sendo as únicas modificações o tempo de ativação de 10 ms e a energia de colisão de 40%.

#### **3.6.3.4. Glycomod**

Os arquivos da análise do *full* MS das amostras foram analisados manualmente e os valores das massas monocarregadas foram usados para a busca de composições putativas no programa Glycomod (<http://web.expasy.org/glycomod/>) (Cooper *et al.*, 2001). Todos os íons foram considerados como adutos de sódio e na busca foi estipulado uma tolerância de 2,0 Da, forma reduzida e permetilada. Foram descartadas as possibilidades de os N-glicanos apresentarem grupos fosfatos, sulfatos, pentoses, ácido glucurônico e ácido deaminoneuramínico; estas modificações foram descartadas por serem perdidas ao longo do processamento da amostra e os 3 monossacarídeos desconsiderados não serem encontrados em N-glicanos (exceto pentoses em plantas). Após a primeira análise por composições putativas, as amostras foram analisados por injeção direta novamente para a abordagem MS<sup>n</sup>.

#### **3.6.4. Análise Quantitativa**

##### **3.6.4.1. Marcação com ácido aminobenzóico**

Antes do procedimento de marcação, os N-glicanos reservados para a análise quantitativa foram submetidos ao processo de dessalinização com PGC descrito no item 3.6.3.1. para remoção de quaisquer traços de impurezas da amostra (principalmente detergentes). Após essa limpeza as amostras foram submetidas ao procedimento de marcação com ácido aminobenzóico (2AA) como descrito por Bigge *et al.* (1995). Brevemente, as amostras foram dissolvidas em 20 µL da solução de 2AA e incubadas a 65°C por 3 horas. Após resfriamento a temperatura ambiente, os N-glicanos foram submetidos a precipitação com acetona (adaptado de Pabst *et al.*, 2009). Nesse procedimento 1 mL de acetona foi adicionado à amostra, homogeneizado por vortex por 30 segundos e centrifugado a 19.000 x g por 5 minutos. Após a centrifugação a camada superior de 950 µL foi removida e descartada e o procedimento repetido mais duas vezes. A solução final foi seca por centrifugação a vácuo e dissolvida em 200 µL de acetonitrila 67% e formato de amônio 33% em água (fase móvel inicial para o fracionamento por HPLC).

#### **3.6.4.2. LC-MS**

Os perfis dos N-glicanos liberados dos venenos analisados foram obtidos por LC-MS utilizando a massa molecular como propriedade para a separação cromatográfica das moléculas. A cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês HPLC) foi realizada utilizando o cromatógrafo Thermo Scientific Surveyor equipado com detector de fluorescência e utilizando a coluna TSKgel Amide-80 (2,0 mm x 150 mm, 3 µm) (Tosoh). Para a separação foram utilizadas como fases móveis (A) acetonitrila e (B) formato de amônio em água, pH 4,4. A temperatura da coluna foi ajustada para 40°C e o fluxo utilizado foi de 1890 µL/min. O gradiente foi iniciado

com 33% de B, atingiu 48% de B em 32 minutos e depois 100% em 30 segundos, e assim foi mantido por 2 minutos. A condição inicial foi reestabelecida em 30 segundos e mantida por 10 minutos para re-equilíbrio da coluna. A detecção da fluorescência do 2AA foi realizada utilizando como comprimento de onda para excitação 320 nm e 420 nm para o de emissão. Os espectros de massas foram adquiridos no espectrômetro Thermo LTQ Velos Pro (Thermo Scientific) no modo negativo, *profile*, com *scan rate* “*enhanced*” e *m/z* (*mass range*) de 650 a 2000.

#### **3.6.4.3. Análise dos dados**

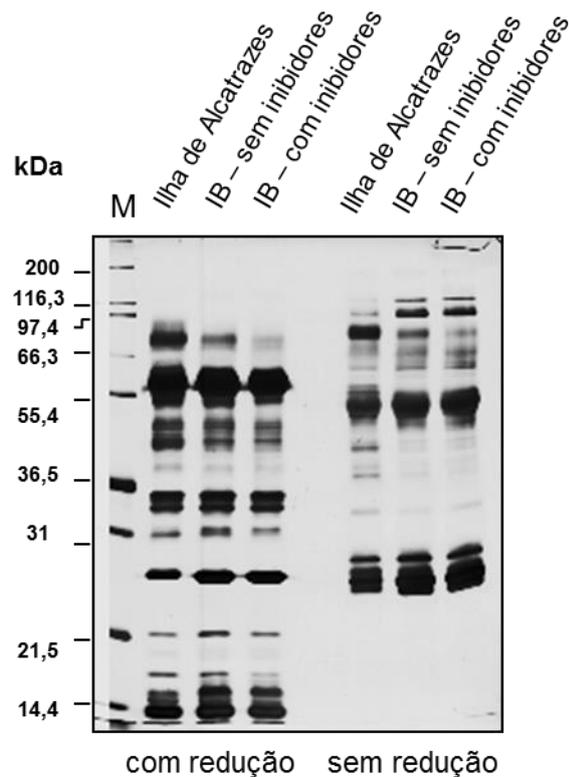
Os arquivos brutos gerados das análises de LC-MS foram tratados utilizando o programa Thermo Xcalibur Qual Browser (Thermo Scientific). Os valores das massas esperadas de cada pico identificado por MSn foram previamente calculados e estes foram usados para busca das estruturas de glicanos no cromatograma de íons. O perfil final dos N-glicanos corresponde ao *extracted ion chromatogram* dos padrões isotópicos de cada composição. Estes perfis foram usados para o cálculo da área dos picos de cada componente para quantificação relativa. Para normalização dos dados a área de cada pico foi dividida pela soma das áreas dos demais N-glicanos do *extracted ion chromatogram*.

## 4. Resultados

### 4.1. Análise proteômica

#### 4.1.1. Análise por eletroforese unidimensional

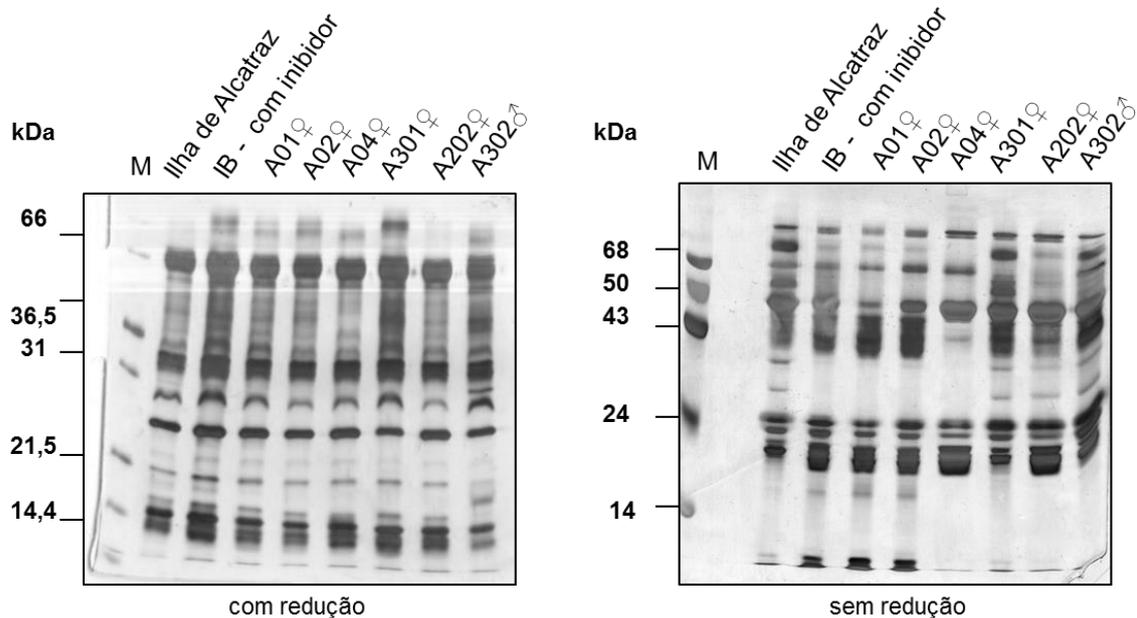
A análise do proteoma do veneno de *B. alcatraz* se iniciou com a visualização do perfil proteico das três amostras disponíveis para o estudo. Para tanto, 10 µg de veneno do espécime proveniente da ilha de Alcatrazes, e das amostras coletadas dos espécimes de *B. alcatraz* mantidos no Instituto Butantan (adicionadas ou não de inibidores de proteinases) foram analisadas por eletroforese unidimensional, em condições redutoras e não redutoras (Figura 6).



**Figura 6.** Perfil eletroforético (SDS-poliacrilamida 12%) dos venenos de *B. alcatraz* (10 µg) em condições redutoras e não redutoras. M: padrões de massa molecular. Coloração: nitrato de prata.

A análise comparativa dos perfis de proteínas mostrou que não há diferenças significativas entre as amostras coletadas dos espécimes em cativeiro (com e sem inibidores) e a amostra coletada na ilha de Alcatrazes, avaliadas com e sem a redução de pontes de dissulfeto.

Para a preparação do *pool* de veneno coletado no Instituto Butantan estabeleceu-se como metodologia a extração individual de cada animal e posterior mistura das alíquotas de mesmo volume de cada indivíduo. O restante dos venenos, que foram aliquoteados individualmente, foi utilizado para avaliação da variabilidade individual entre os seis espécimes de *B. alcatraz* mantidos no Instituto Butantan (Figura 7).

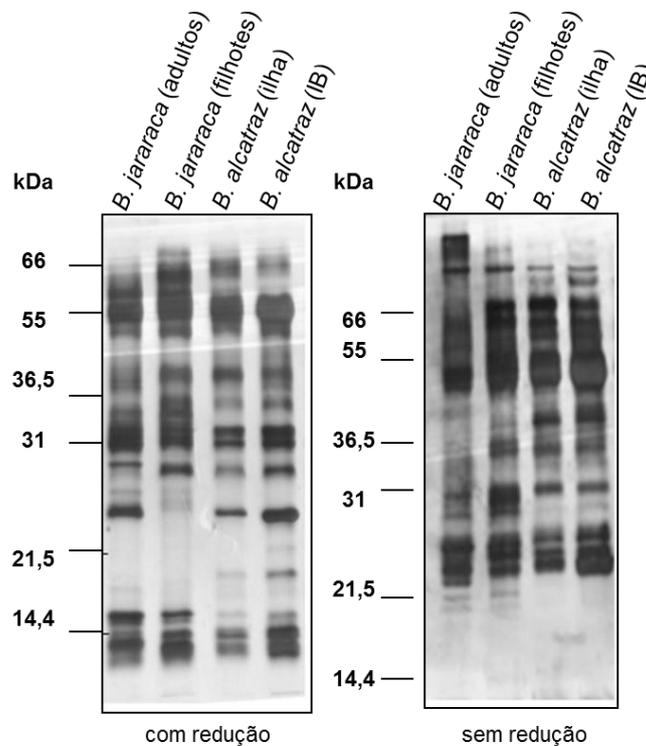


**Figura 7.** Perfil eletroforético (12% SDS-poliacrilamida) dos venenos individuais de *B. alcatraz* (5 µg) em condições redutoras e não redutoras. M: padrões de massa molecular. Coloração: nitrato de prata.

A comparação dos perfis mostrados na Figura 7 revelou que existe variabilidade individual entre espécimes de *B. alcatraz*, sendo que em condições

reduzoras esta variabilidade se mostra mais proeminente nas regiões acima de 66 kDa, entre 50 kDa e 30 kDa, e abaixo de 14 kDa. Em condições não redutoras as diferenças são observadas acima de 68 kDa, entre 68 kDa e 50 kDa e entre 24 kDa e 14 kDa.

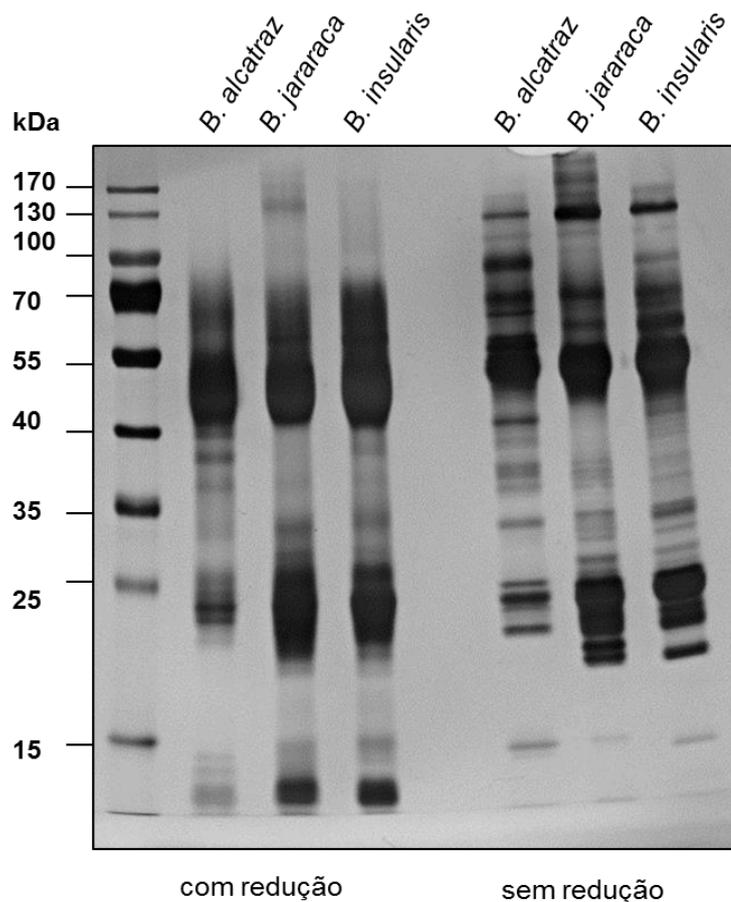
A comparação das atividades biológicas (DL50, dose hemorrágica, atividades procoagulantes e proteolítica) do veneno de *B. alcatraz* com o veneno de *B. jararaca* de espécimes filhotes e adultos revelou que o veneno de *B. alcatraz* apresenta características mais próximas ao veneno de filhotes da *B. jararaca* (Furtado, 2005). Neste estudo, comparamos o perfil eletroforético destes venenos (Figura 8). Esta análise mostrou que os venenos de *B. alcatraz*, amostras da ilha e do Instituto Butantan, diferem quanto ao perfil de proteínas em relação ao veneno de *B. jararaca*, tanto de filhotes quanto de adultos.



**Figura 8.** Perfil eletroforético (12% SDS-poliacrilamida) dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca* (10 µg), em condições redutoras e não redutoras. Coloração: nitrato de prata. A amostra de veneno de *B. alcatraz* (Instituto Butantan) foi coletada sem inibidores de proteinases.

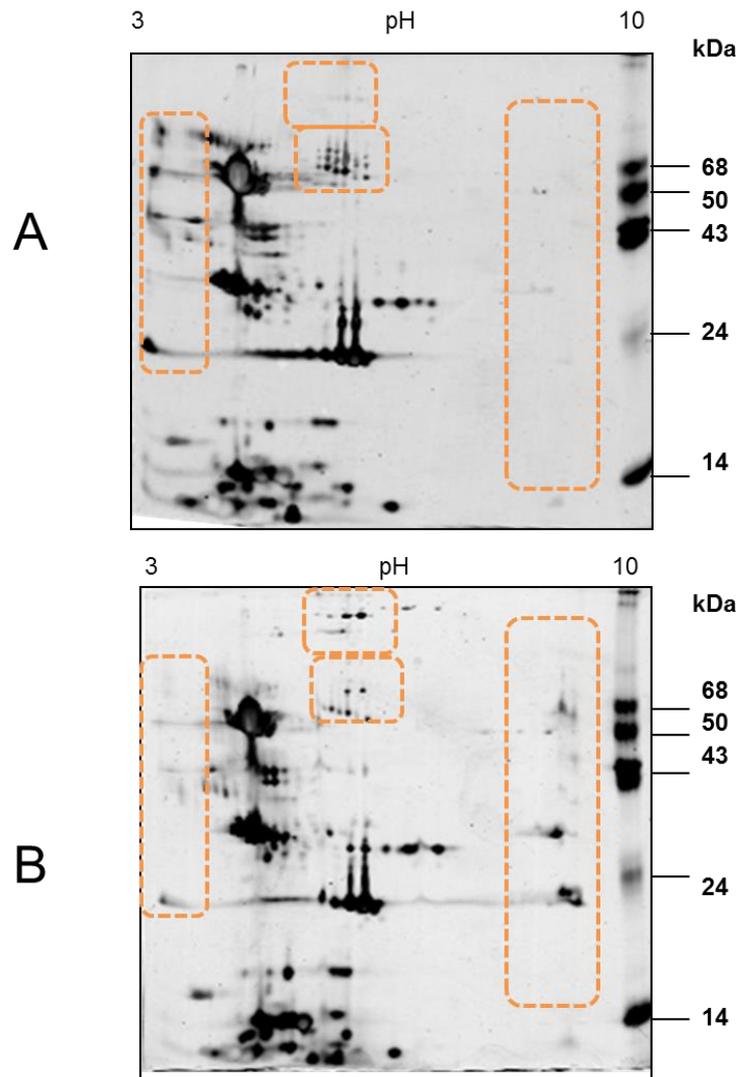
A partir da comparação entre os perfis destes venenos, podemos observar que o veneno de *B. alcatraz* se mostra diferente tanto da amostra de indivíduos juvenis como de adultos de *B. jararaca*. A partir da análise sem redução é possível notar que o veneno de espécimes adultos de *B. jararaca* apresenta componentes de alta massa molecular que estão ausentes nas amostras de juvenis de *B. jararaca* e *B. alcatraz*.

O compartilhamento da mesma origem evolutiva entre as espécies do grupo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. jararaca* e *B. insularis*) e o isolamento geográfico entre elas levanta questões importantes acerca das diferenças entre seus venenos. A Figura 9 contém a comparação destes venenos por eletroforese unidimensional.



**Figura 9.** Perfil eletroforético (12%-SDS-poliacrilamida) dos venenos de *B. alcatraz*, *B. jararaca* e *B. insularis* (10 µg) em condições redutoras e não redutoras. M: padrões de massa molecular. Coloração: nitrato de prata.

Esta análise revelou que os perfis eletroforéticos dos venenos de *B. jararaca* e *B. insularis* são mais parecidos entre si e diferem do veneno de *B. alcatraz*, principalmente com relação às proteínas de massa molecular abaixo de 25 kDa (nas amostras reduzidas e não reduzidas) e quanto ao componentes de alta massa molecular (amostras não reduzidas). Buscando aprofundar a análise do veneno de *B. alcatraz* por eletroforese, as amostras coletadas no Instituto Butantan foram submetidas à análise por eletroforese bidimensional, utilizando fitas de gradiente de pH 3-10 (Figura 10).



**Figura 10.** Eletroforese bidimensional de amostras de venenos de *B. alcatraz* (50 µg), coletadas no Instituto Butantan na ausência (A) e na presença (B) de inibidores de proteinases. Coloração: nitrato de prata. Os retângulos indicam regiões com perfis diferenciais entre os venenos.

Os perfis eletroforéticos observados nas amostras de veneno de *B. alcatraz* dos animais mantidos em cativeiro, coletadas com e sem inibidores de proteinases, apresentaram-se semelhantes, porém em algumas regiões dos géis podem-se observar pequenas diferenças com relação à presença ou ausência de *spots* (destacados na Figura 10).

#### 4.2.1. Proteoma total

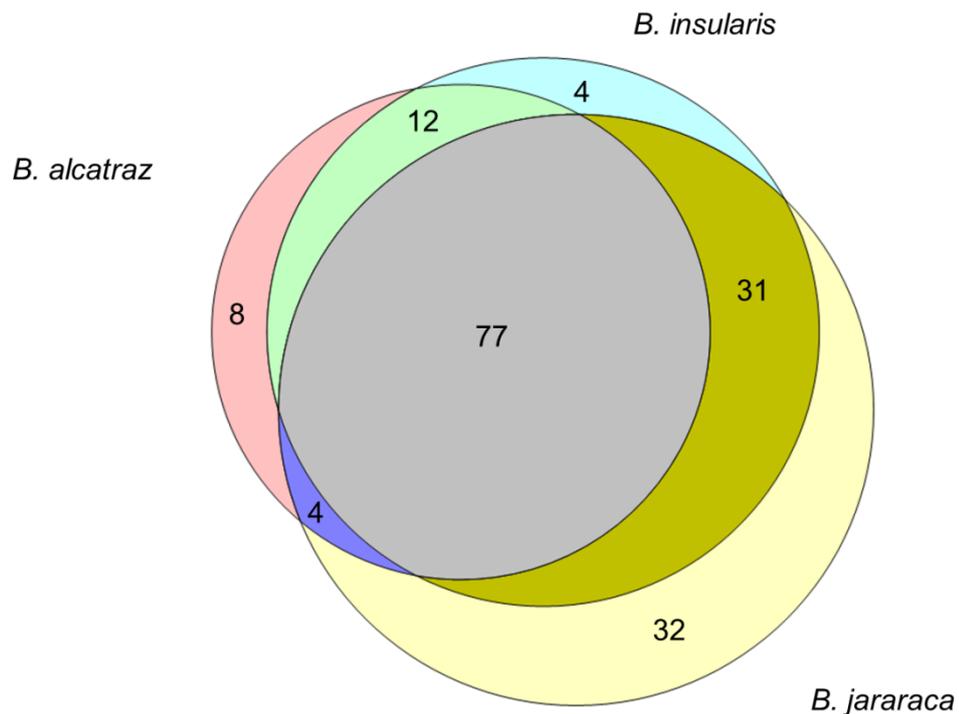
A análise do proteoma total do veneno de *B. alcatraz* foi realizada de forma comparativa com as outras duas espécies do grupo Jararaca (*B. jararaca* e *B. insularis*), e de forma qualitativa e quantitativa. Para tanto, os venenos foram submetidos à digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS. Após a busca em banco de dados utilizando o programa MaxQuant, as identificações foram filtradas de modo a remover contaminantes e identificações com baixa evidência estatística, e o procedimento de quantificação foi realizado pelo método *label free*. Deste processo foram geradas duas tabelas que contém a lista de grupos de proteínas identificadas (Tabela suplementar 1; anexo em CD-ROM), e a lista de grupos de proteínas identificadas e quantificadas (Tabela suplementar 2; anexo em CD-ROM).

##### 4.2.1.1. Identificação de proteínas

Na análise comparativa dos proteomas dos venenos do grupo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. jararaca* e *B. insularis*) foram identificados 168 grupos de proteínas. Os grupos de proteínas pertencem a diferentes classes de toxinas: SVMPs (63), SVSPs (32) CTL (35) (CTL), PLA2 (15), LAAO (7), (LAAO). Dezesesseis grupos de proteínas

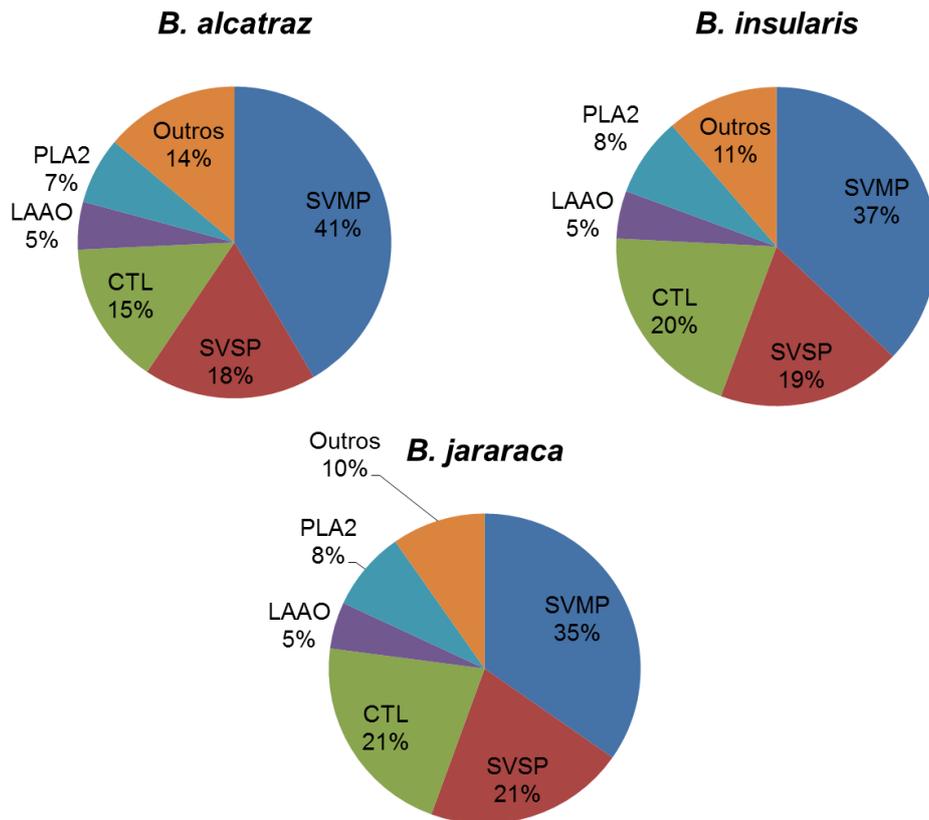
correspondem a outras classes minoritárias de toxinas (fosfolipase B, sWEGF, glutaminil ciclase, aminopeptidase, hialuronidase, diesterase, dipeptidase e CRISP). Como critério para definição de identificação de proteínas foram considerados: i) número de espectros de MS/MS dos peptídeos pertencentes a cada grupo de proteína e ii) a identificação de cada grupo de proteína em pelo menos uma das réplicas experimentais.

Dos 168 grupos de proteínas identificados na análise do grupo Jararaca, 101 destes foram identificados na amostra de *B. alcatraz*, 124 em *B. insularis* e 144 em *B. jararaca* (Tabela 1; anexo em CD-ROM). A Figura 11 mostra o diagrama de Venn da distribuição dos grupos de proteínas identificados entre os venenos do grupo jararaca.



**Figura 11.** Diagrama de Venn da distribuição dos grupos de proteínas identificados na análise do proteoma total dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. alcatraz*, por digestão das proteínas com tripsina, LC-MS/MS, e análise pelo programa MaxQuant. Diagrama de Venn gerado pelo programa Venn Diagram Plotter (PNNL).

A classificação dos grupos de proteínas identificados, de acordo com as classes de toxinas conhecidas (Tabela 1; anexo em CD-ROM) mostrou que o padrão de distribuição destas é similar entre os três venenos do grupo Jararaca (Figura 12), apenas com uma pequena diminuição na proporção de CTL em *B. alcatraz*.



**Figura 12.** Gráficos da distribuição das toxinas identificadas na análise do proteoma total dos venenos do grupo Jararaca.

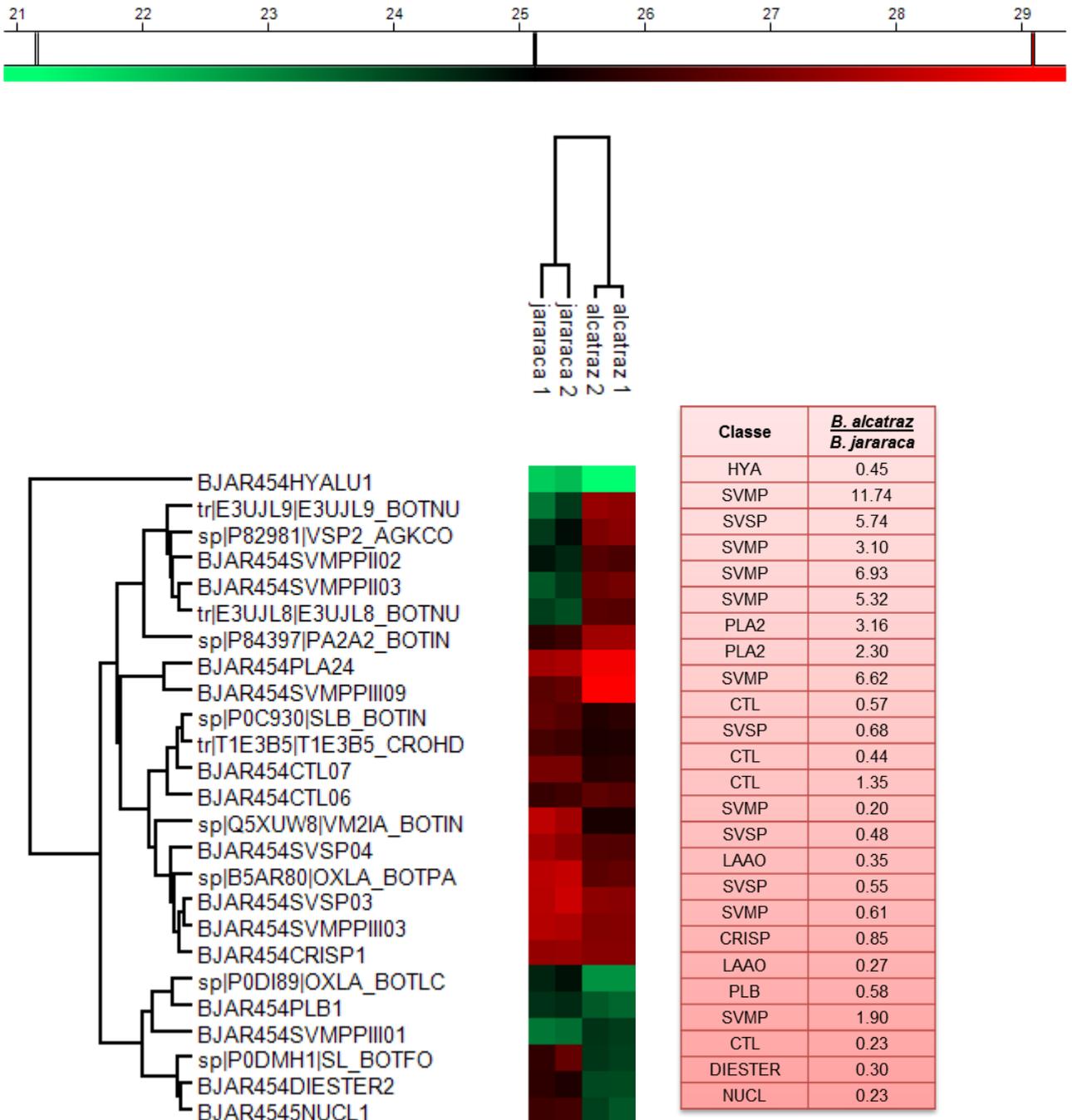
#### 4.2.1.2. Quantificação de proteínas

Para a análise quantitativa foram considerados apenas os grupos de proteínas que foram identificados em todas as réplicas experimentais. (Tabela 2; anexo em CD-ROM). Os dados provenientes da busca em banco de dados pelo programa MaxQuant foram inseridos no programa Perseus (plataforma MaxQuant),

para a quantificação relativa entre os venenos. Para a quantificação relativa, o algoritmo do programa Perseus considerou os valores de LFQ (*label free quantification*), calculados no programa MaxQuant, que foram transformados para a forma logarítmica na base 2, e os três venenos foram analisados aos pares (*B. jararaca-B. alcatraz*, *B. jararaca-B. insularis*, *B. alcatraz-B. insularis*) pelo teste-t para duas amostras. O cálculo destes valores é feito pela normalização da intensidade dos íons precursores ( $MS^1$ ) de todos os peptídeos identificados para um determinado grupo de proteínas. Nesta análise, a Hipótese nula considerada é que não há diferenças entre os valores de LFQ para os grupos de proteínas identificados nas duas amostras, considerando o p-valor de 0,05.

Após a determinação de quais grupos de proteínas apresentavam diferenças estatísticas, avaliadas pelo teste-t, estes foram selecionados e submetidos ao processo de clusterização hierárquica não supervisionada para visualização destas diferenças em um gráfico do tipo *heat map*. As Figuras 13, 14 e 15 mostram os gráficos gerados no programa Perseus, pela análise quantitativa separada por pares de venenos do grupo Jararaca (Tabelas suplementares 3-5; anexo em CD-ROM).

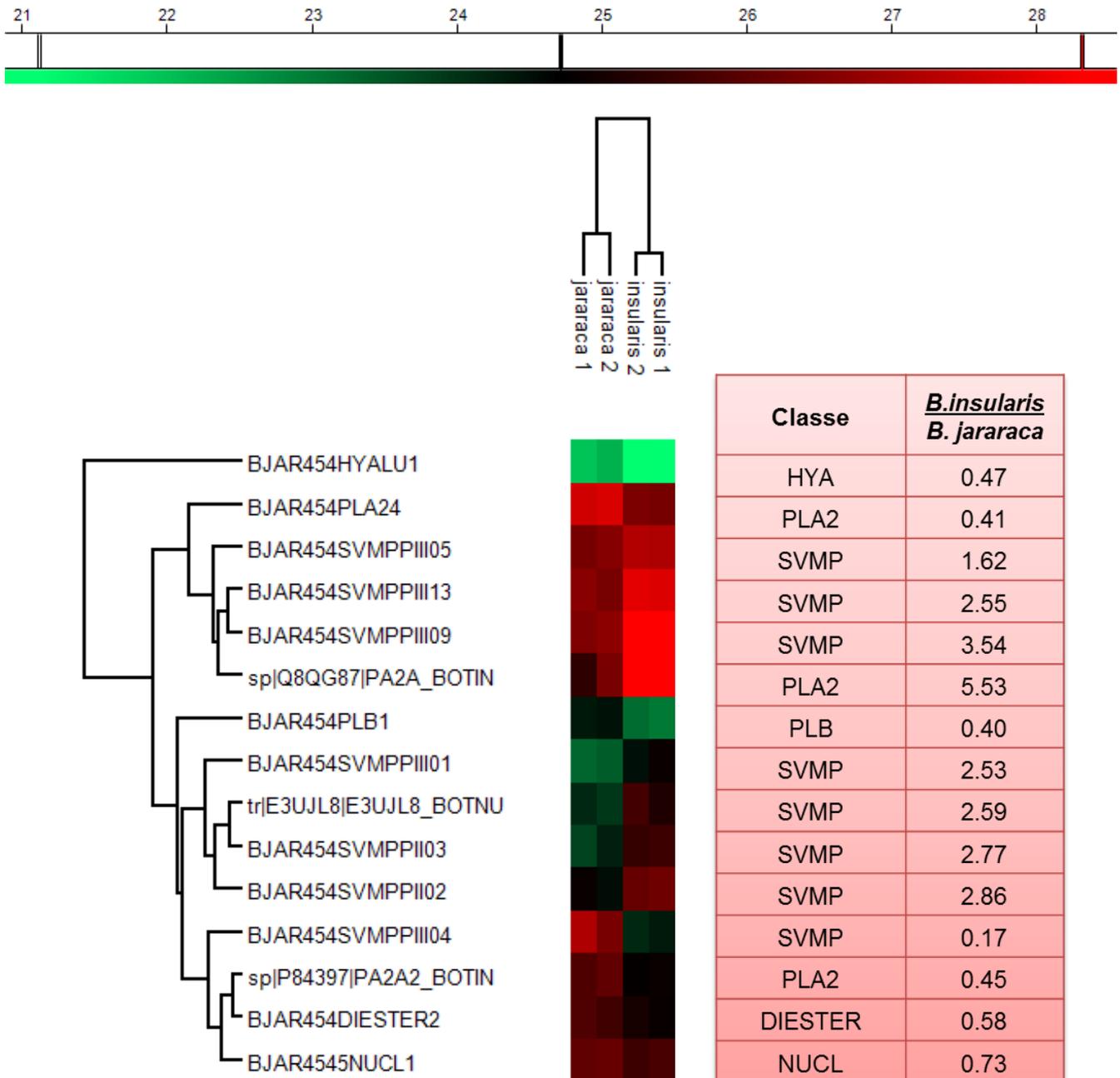
A análise quantitativa das 25 proteínas presentes nos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*, que mostraram diferença de abundância (Figura 13), destacou as classes SVMPs e fosfolipases A2, como aquelas mais variáveis entre os dois venenos. A maior parte das SVMPs quantificadas apresentou abundância mais alta no veneno de *B. alcatraz*. O mesmo foi observado quanto à fosfolipases A2, cujos dois grupos quantificados apresentaram-se mais abundantes em *B. alcatraz*. Por outro lado, na classe das SVSPs, dos três grupos quantificados apenas um é mais abundante em *B. alcatraz*.



**Figura 13.** Cluster hierárquico não supervisionado de proteínas identificadas com abundância diferencial nos proteomas dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*, avaliados por digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS. Grupos de proteínas apresentando alterações de abundância estatisticamente significantes (teste-t  $p < 0,05$ ), com intensidades normalizadas e agrupadas utilizando a distância euclidiana. Os clusters destas proteínas estão representados no *heat map* em vermelho, pelas proteínas mais abundantes, e em verde por aquelas menos abundantes. As proteínas identificadas estão indicadas (apenas a primeira de cada grupo) na árvore horizontal; as réplicas estão indicadas nas árvores verticais. O cluster foi construído utilizando o programa Perseus (plataforma MaxQuant).

Como observado nos perfis eletroforéticos dos venenos de *B. jararaca* e *B. insularis* (Figura 9), estes apresentam poucas diferenças em bandas de proteínas, em condições redutoras e não redutoras. Esta semelhança entre esses venenos foi

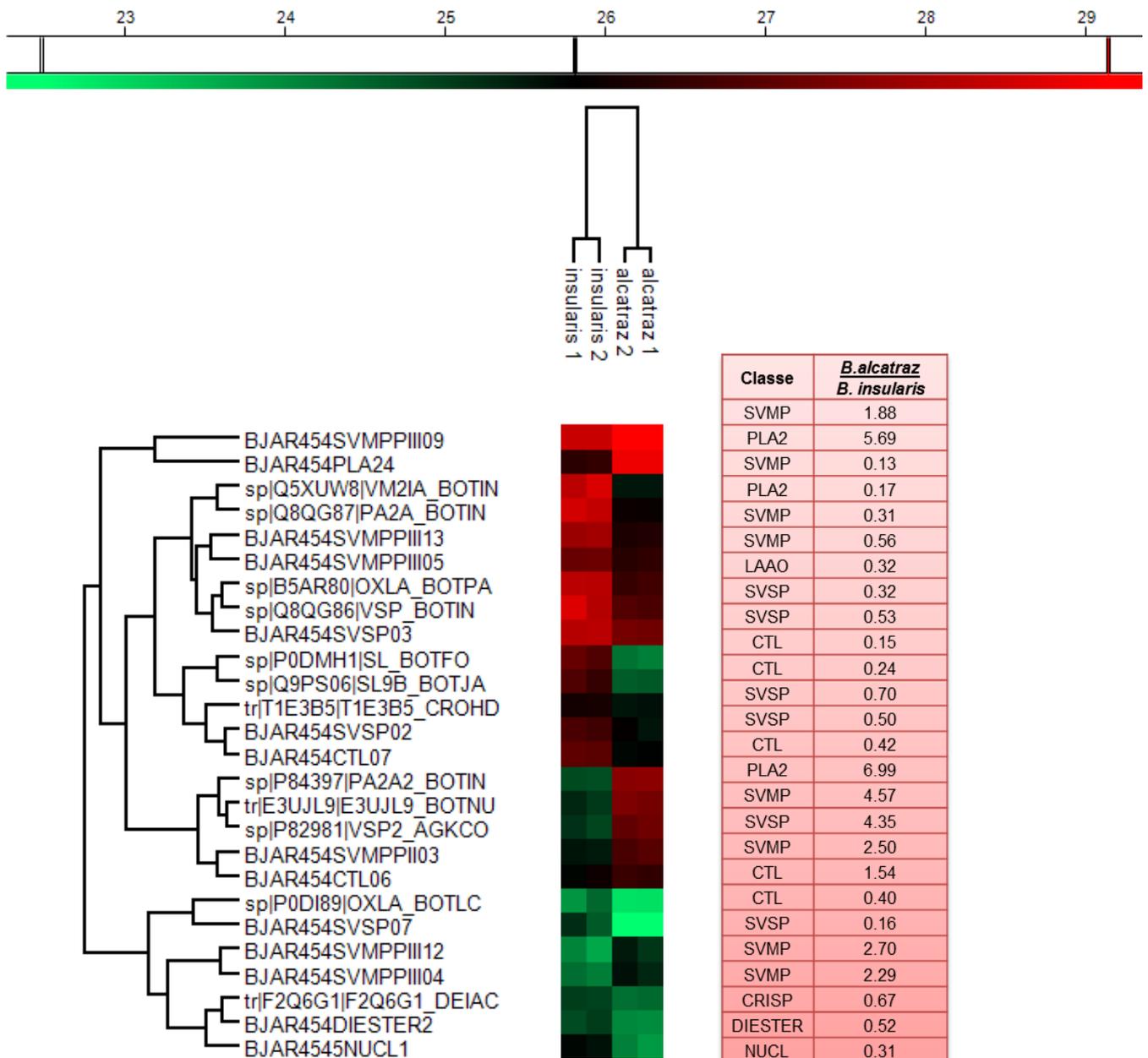
também verificada pela análise quantitativa (Figura 14), na qual apenas 15 grupos de proteínas mostraram diferença de abundância, representados principalmente por SVMPs, que se apresentaram mais abundantes no veneno de *B. insularis*.



**Figura 14.** Cluster hierárquico não supervisionado de proteínas identificadas com abundância diferencial nos proteomas dos venenos de *B. jararaca* e *B. insularis* avaliados por digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS. Grupos de proteínas apresentando alterações de abundância estatisticamente significantes (teste-t  $p < 0,05$ ), com intensidades normalizadas e agrupadas utilizando a distância euclidiana. Os clusters destas proteínas estão representados no *heat map* em vermelho, pelas proteínas mais abundantes, e em verde por aquelas menos abundantes. As proteínas identificadas estão indicadas (apenas a primeira de cada grupo) na árvore horizontal; as réplicas

estão indicadas nas árvores verticais. O cluster foi construído utilizando o programa Perseus (plataforma MaxQuant).

A análise quantitativa das 26 proteínas presentes nos venenos de *B. alcatraz* e *B. insularis*, que mostraram diferença de abundância (Figura 15), destacou as classes SVMPs e fosfolipases A2, como aquelas mais variáveis entre os dois venenos. A maior parte das SVMPs quantificadas apresentou abundância mais alta no veneno de *B. alcatraz*. O mesmo foi observado quanto à classe das fosfolipases A2, dois dos três grupos quantificados apresentaram-se mais abundantes em *B. alcatraz*. Por outro lado, na classe das SVSPs, dos seis grupos quantificados apenas um é mais abundante em *B. alcatraz*.



**Figura 15.** Cluster hierárquico não supervisionado de proteínas identificadas com abundância diferencial nos proteomas dos venenos de *B. alcatraz* e *B. insularis* avaliados por digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS. Grupos de proteínas apresentando alterações de abundância estatisticamente significantes (teste-t  $p < 0,05$ ), com intensidades normalizadas e agrupadas utilizando a distância euclidiana. Os clusters destas proteínas estão representados no *heat map* em vermelho, pelas proteínas mais abundantes, e em verde por aquelas menos abundantes. As proteínas identificadas estão indicadas (apenas a primeira de cada grupo) na árvore horizontal; as réplicas estão indicadas nas árvores verticais. O cluster foi construído utilizando o programa Perseus (plataforma MaxQuant).

## 4.2. Análise N-terminômica

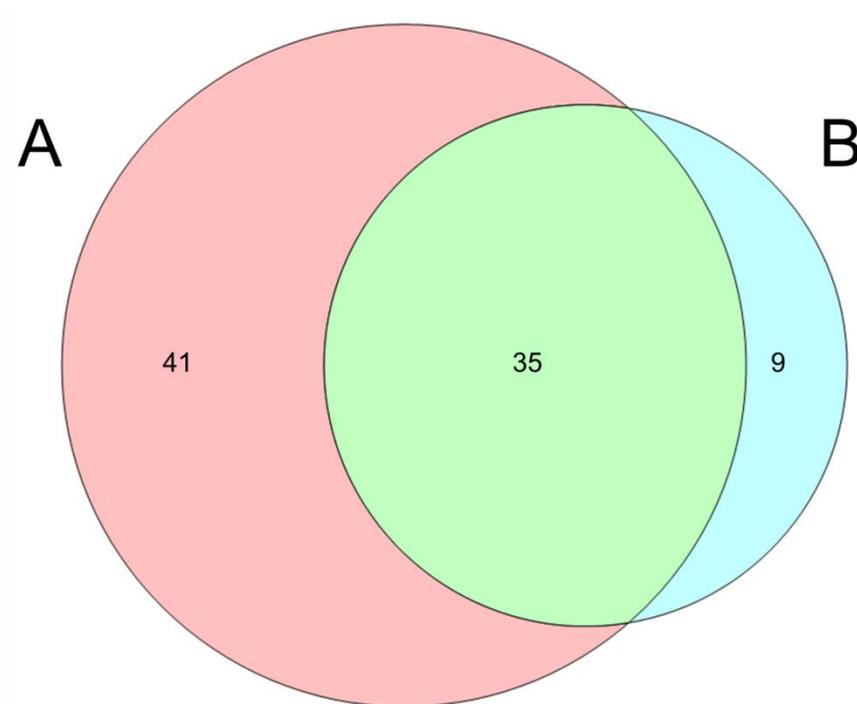
O protocolo utilizado para análise do N-terminoma do veneno de *B. alcatraz* permite marcar os N-terminais livres das proteínas e, por seleção negativa, utilizando uma resina que contém grupos aldeídos que formam ligações covalentes com aminas primárias geradas pela tripsina, identificar as sequências N-terminais das proteínas do veneno. Esta seleção é possível, pois após a reação de dimetilação os N-terminais estão bloqueados por dimetilação, acetilação ou por um resíduo de ácido piroglutâmico.

O primeiro passo da análise dos dados de identificação, realizada com o programa MaxQuant, incluiu a remoção de peptídeos com baixa significância (*e-value* maior que 0,05), já que este dado reflete a probabilidade da identificação ter ocorrido ao acaso. Da lista restante, os peptídeos identificados foram selecionados quanto à presença de modificações no N-terminal, e os peptídeos não marcados nessa posição foram descartados, pois tais N-terminais podem não ser naturais e sim gerados pela clivagem pela tripsina.

No total a análise do N-terminoma do veneno de *B. alcatraz*, possibilitou a identificação de 85 peptídeos diferentes, que foram classificados de acordo com a modificação observada em sua extremidade N-terminal. Destes, 76 peptídeos foram identificados como dimetilados, 14 peptídeos apresentaram ácido piroglutâmico e 2 peptídeos estavam acetilados. A falta de concordância entre o número total de

peptídeos identificados (85) e a ocorrência de modificação no resíduo N-terminal ocorreu porque alguns peptídeos foram identificados com mais de uma modificação, ou seja, a mesma estrutura peptídica apresentou-se com o N-terminal dimetilado ou bloqueada pelo ácido piroglutâmico.

A comparação entre os peptídeos identificados em cada réplica experimental (A e B) demonstra que houve uma baixa correspondência entre as análises do N-terminoma, provavelmente devido há algum problema durante o preparo da amostra B, onde o número de peptídeos identificados foi menor (Figura 16).



**Figura 16.** Comparação entre o número de peptídeos identificados nas réplicas A e B da análise do N-terminoma do veneno de *B. alcatraz*. Diagrama de Venn gerado pelo programa Venn Diagram Plotter (PNNL).

Por essa razão para as considerações desta análise foram utilizados apenas os 35 peptídeos identificados em ambas as análises, de forma a aumentar a confiabilidade das identificações. A Tabela 1 mostra os peptídeos identificados na abordagem do N-terminoma.

**Tabela 1.** Sequências N-terminais identificados pela análise N-terminômica no veneno de *B. alcatraz*.

Grupo de proteínas	Classe de Toxina	Peptídeo	Modificação do N-terminal	Posição	E-value	m/z	z	Réplica	
								A*	B*
BJAR454CRISP1	CRISP	ECPATCFCQNKII	Dimetilação	C-terminal	4.8E-10	848.896	2		x
					6.5E-07	848.896	2	x	
		QMQLCEPATCFCQNKII	Dimetilação Gln->Pyro-Glu	C-terminal	7.7E-20	1099.02	2	x	
					1.9E-70	1076.49	2	x	
BJAR454CTL20	CTL	GSCVCYENLVGR	Dimetilação	Interno	0.0028	721.332	2	x	
					0.00422	721.332	2		x
		SCVCYENLVGR	Dimetilação	Interno	0.01104	692.821	2	x	
					0.01918	692.821	2		x
BJAR454PLA24	PLA2	FLNAENCQEASEAC	Dimetilação	C-terminal	2E-199	835.843	2		x
					5E-153	835.843	2	x	
BJAR454SVMPPII02	SVMP	SCIMSATVSDQPSSR	Dimetilação	Interno	4.6E-56	827.382	2		x
					4.8E-19	827.382	2	x	
BJAR454SVMPPII03	SVMP	GDDMDDYCTGQSAGCPR	Dimetilação	Interno-D	2.6E-46	966.861	2	x	
					3.8E-11	966.861	2		x
BJAR454SVMPPIII03	SVMP	SPPVCGNYFVEVGEECDCGSPR	Dimetilação	N-terminal D	1.2E-45	848.359	3	x	
					1E-11	848.359	3		x
		TECQAAKDECDMADLCTGR	Dimetilação	Interno-D	1.2E-31	762.987	3	x	
					1.3E-24	762.987	3		x
YFVEVGEECDCGSPR	Dimetilação	N-terminal D	1.8E-14	916.385	2	x			
			0.00025	916.385	2		x		
sp C5H5D4 VM33_BOTAT	SVMP	TPQCILNEPLR	Dimetilação	Interno	0.00835	684.869	2	x	
					0.01954	684.869	2		x
sp P0C930 SLB_BOTIN	CTL	DCPPDWSSYEGSCYR	Dimetilação	N-terminal	2E-44	636.251	3	x	
					2E-44	953.872	2		x
sp P0DJF4 VSPAL_TRIAB	SVSP	VVGDECNINE	Dimetilação	N-terminal	0.00905	617.274	2	x	

					0.01715	617.274	2		x
sp P0DKZ9 BPPAP_BOTFO	BPP	QARPPHPPIPPAP	Gln->Pyro-Glu	BPP	8.7E-06	679.372	2	x	x
sp P31985 VM2I_CROOC;sp P31986 VM2I_CROOL	SVMP	AGEECDGCGSPANPCCDAA TCKLR	Dimetilação	N-terminal D	1.2E-46	885.696	3	x	
					3.1E-12	885.696	3		x
		EAGEECDGCGSPANPCCDA ATCKLR	Dimetilação	N-terminal D	1.1E-26	928.71	3	x	
			Glu-> Pyro-Glu		2E-08	928.71	3		x
		ECDCGSPANPCCDAATCK LR	Dimetilação	N-terminal D	4E-06	799.995	3	x	
					0.00259	799.995	3		x
EECDGCGSPANPCCDAATC KLR	Dimetilação	N-terminal D	1.9E-25	843.009	3	x			
					2.7E-13	843.009	3		x
GEECDGCGSPANPCCDAAT CKLR	Dimetilação	N-terminal D	9.8E-18	862.017	3	x			
					0.00864	862.017	3		x
sp P86537 CRVP_DABRR	CRISP	SVDFDSESPR	Dimetilação	N-terminal	2.3E-12	583.77	2		x
					0.00079	583.77	2	x	
sp P86721 BPP12_BOTAT	BPP	QQWPRDPAPIPP	Deamidação (NQ), Dimetilação	BPP	0.04009	715.875	2		x
			Gln->Pyro-Glu		4.3E-05	692.854	2	x	
sp Q90X23 TXVE_BOTJA	svVEGF	CGGCCTDESLECTATGKR	Dimetilação	Interno	1.6E-31	706.629	3	x	
					1.4E-06	706.629	3		x
sp Q9DGH6 VM2_GLOHA;BJAR454SVMPPII02	SVMP	DDMDDYCNGISAGCPR	Deamidação (NQ), Dimetilação	Interno	1.8E-19	937.853	2		x
					4.6E-11	937.853	2	x	
		DMDDYCNGISAGCPR	Deamidação (NQ), Dimetilação	Interno	3.6E-34	880.34	2		x
					7.8E-11	880.34	2	x	
GDDMDDYCNGISAGCPR	Deamidação (NQ), Dimetilação	Interno	1.2E-58	966.364	2		x		
					1.5E-54	966.364	2	x	
sp Q9IAY3 VM1H1_DEIAC	SVMP	ESGNVNDYEVYPR	Dimetilação	N-terminal Pró- domínio	5E-114	834.897	2	x	
					3.8E-41	834.897	2		x
		GNVNDYEVYPR	Dimetilação	N-terminal Pró-	0.00183	726.86	2		x
					0.00689	726.86	2	x	

				domínio					
		SGNVNDYEVYPR	Dimetilação	N-terminal Pró- domínio	1.1E-40	770.376	2	x	
					3E-30	770.376	2		x
sp Q9PS06 SL9B_BOTJA	CTL	DCPSDWSPYEGHCYR	Dimetilação	N-terminal	2.5E-14	652.926	3	x	
					0.00645	652.926	3		x
tr A0A077L840 A0A077L840_PRO FL	SVMP	SPPVCGNELLEVGEEDC G	Dimetilação	N-terminal D	2E-141	1074.95	2	x	
					2E-24	1074.95	2		x
tr E3UJM0 E3UJM0_BOTNU; ;sp P31985 VM2I_CROOC;sp Q9D GH6 VM2_GLOHA;BJAR454SVM PPII03;BJAR454SVMPPIII03	SVMP	QCAEGLCCDQCR	Gln->Pyro-Glu	Interno-D	1.6E-38	770.276	2	x	
					0.00433	770.276	2		x
tr Q3YL48 Q3YL48_AGKCO	SVMP	QCAEGLCCDQC	Gln->Pyro-Glu	Interno-D	1.5E-62	692.225	2	x	
					4E-09	692.225	2		x
tr T2HS34 T2HS34_OVOOK	SVSP	ELVGGDECNINEHR	Dimetilação	N-terminal	1.9E-34	590.281	3	x	
					0.01453	590.281	3		x
			Glu-> Pyro-Glu	N-terminal	2.4E-44	861.897	2		x
					2.8E-34	861.897	2	x	
		VGGDECNINEHR	Deamidação (NQ), Dimetilação	N-terminal	8.1E-07	509.9	3	x	
					0.0009	509.9	3		x
tr U3TBL7 U3TBL7_OVOOK	svVEGF	QQSEVIPFMTVYER	Gln->Pyro-Glu	Interno	0.00812	855.414	2		x
			Oxidação (M), Gln->Pyro-Glu		5.8E-22	863.411	2	x	

\* Cada peptídeo foi identificado em ambas as réplicas experimentais; o x indica o valor de *m/z* em cada réplica.

Os 35 peptídeos identificados por esta análise correspondem a 23 grupos de proteínas, que foram classificadas de acordo com as classes de toxinas às quais pertencem. Os grupos de proteínas são classificados como: SVMP (10), SVSP (3), CTL (3), PLA2 (1), proteína precursora de BPPs (2), CRISP (2) e svVEGF (2).

Do total de peptídeos identificados, 17 se encontram na porção N-terminal das proteínas, sendo denominados N-terminais clássicos, uma vez que concordam com as predições do banco de dados (Uniprot). Como critério para considerar se um peptídeo identificado corresponde à anotação disponível no banco de dados como sendo aquela do N-terminal da proteína, foi estabelecida a tolerância de 6 resíduos.

Dentre estas sequências N-terminais clássicas, 15 mostraram o resíduo N-terminal bloqueado por dimetilação, o que indica que estes estavam livres nas amostras de veneno bruto, e apenas 2 apresentaram ácido piroglutâmico. Analisando a distribuição destes N-terminais identificados temos: 11 N-terminais correspondentes à SVMP, 3 a SVSP, 2 a CTL e 1 a CRISP.

#### **4.3. Análise peptidômica**

A fração peptídica do veneno de *B. alcatraz* foi analisada por LC-MS/MS e os dados não processados (dados brutos) das três réplicas experimentais foram submetidos à identificação utilizando o programa PEAKS Studio (Bioinformatics Solutions). Este programa concilia a estratégia de sequenciamento de peptídeos denominada “*de novo sequencing*” com a busca no banco de dados utilizando o *match* dos espectros de MS/MS com as estruturas primárias depositadas.

A configuração da busca para a possibilidade da presença de ácido piroglutâmico na posição N-terminal dos peptídeos foi feita com base em informações presentes no banco de dados para toxinas de venenos de serpentes,

que indicam a presença desse resíduo no N-terminal dos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) (lanzer *et al.*, 2004; Zelanis *et al.*, 2010; Tashima *et al.*, 2012). Embora a acetilação do resíduo N-terminal de peptídeos não tenha sido relatada em toxinas animais até o momento, a busca por resíduos N-terminais acetilados foi mantida em nosso estudo pela importância dessa modificação em algumas proteínas, para a mediação de importantes processos biológicos como apoptose, degradação proteica, localização de proteína (Liszczyk *et al.*, 2013) e pelo restrito conhecimento disponível na literatura sobre os peptídomas de venenos de serpentes (Tashima *et al.*, 2012).

Como método de fragmentação escolhido para as análises de MS/MS, optamos por utilizar HCD (*high-energy collision dissociation*) em lugar de CID (*collision-induced dissociation*), devido à maior resolução dos espectros gerados pelo primeiro. Como o sequenciamento *de novo* é uma análise baseada unicamente na interpretação dos espectros, a aquisição destes em alta resolução favorece a determinação das estruturas primárias por este método.

Nesta abordagem, a derivação da estrutura primária de um peptídeo é feita única e exclusivamente com base nos dados brutos gerados pela análise por MS/MS. A primeira etapa da análise de dados pelo programa PEAKS Studio envolve a realização do sequenciamento *de novo* com todos os espectros de MS/MS e, posteriormente, esses resultados são incluídos dentro do banco de dados utilizado para a busca tradicional utilizando o *match* dos espectros de MS/MS.

Como resultados das identificações de peptídeos pelas duas abordagens (*de novo* e a busca no banco de dados, ambas pelo programa PEAKS Studio) duas tabelas de identificação distintas são geradas. A primeira inclui apenas os resultados do sequenciamento *de novo*, que não apresentaram sequências correspondentes no

banco de dados utilizado, e a segunda inclui os peptídeos encontrados no banco de dados de proteínas.

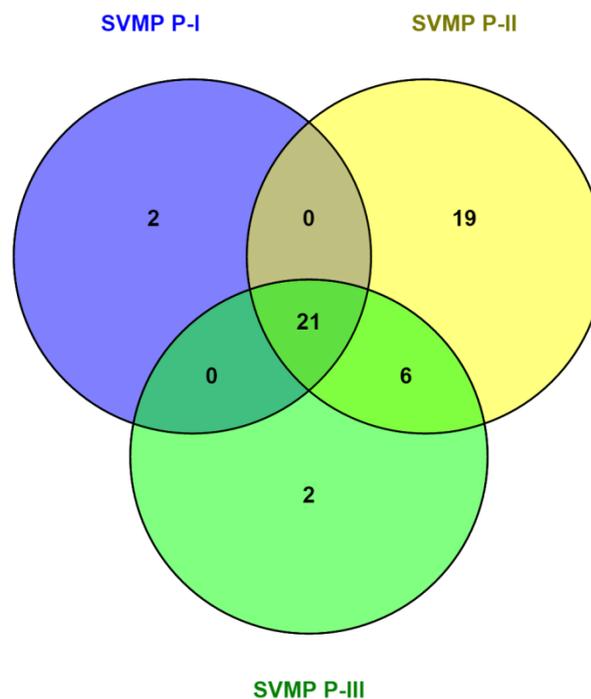
Analisando estas tabelas de identificação dos peptídeos encontrados no veneno de *B. alcatraz* (Tabela suplementar 6, sequenciamento *de novo*; Tabela suplementar 7, busca em banco de dados; anexos em CD-ROM), verificou-se a descrição de 45 peptídeos novos, cuja identificação só foi possível devido à metodologia do sequenciamento *de novo*, e 73 peptídeos diferentes identificados utilizando o banco de dados.

Com a intenção de avançar na descrição dos novos peptídeos optamos por utilizar uma ferramenta do programa PEAKS Studio, denominada SPIDER. Essa opção permite alinhar os peptídeos identificados pelo sequenciamento *de novo* com as sequências obtidas do banco de dados e organizar as identificações do banco com alta identidade com os novos peptídeos encontrados. Essa ferramenta é muito utilizada para a análise de proteoformas e mutações, e ajuda na caracterização de novas estruturas primárias. No caso dos peptídeos cujas sequências foram obtidas pelo sequenciamento *de novo* (45), para 21 deles a ferramenta SPIDER selecionou uma possibilidade de identificação, associando esta ao número de acesso da proteína com a qual cada peptídeo homologia.

Do total de 94 peptídeos identificados na análise do peptidoma do veneno de *B. alcatraz* (sendo 73 identificados no banco de dados e 21 cuja identificação foi inferida por similaridade), 65% (61 peptídeos) pertenciam à SVMPs, 28% (26 peptídeos) à proteína precursora dos BPPs e 7% (7 peptídeos) à fosfolipase A2.

#### 4.3.1. Peptídeos oriundos de SVMPs

A análise dos peptídeos oriundos de SVMPs, identificados pela busca em banco de dados (50 peptídeos diferentes) revelou a seguinte distribuição dos mesmos entre as classes de SVMPs: 23 na classe P-I, 46 na classe P-II, e 29 na classe P-III. A falta de concordância nos números de peptídeos de cada classe de SVMP é resultado do compartilhamento de 21 peptídeos entre as três classes. Destes 50 peptídeos, 31 eram oriundos do pró-domínio e 19 do domínio catalítico. Um diagrama de Venn (Figura 17) ilustra a distribuição destes peptídeos nas três classes de SVMPs.



**Figura 17.** Diagrama de Venn da distribuição dos 50 peptídeos identificados em estruturas primárias de SVMPs nas classes P-I, P-II, e P-III). Diagrama gerado pelo programa Venny (disponível em <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Um exame dos 19 peptídeos encontrados exclusivamente no domínio catalítico de SVMPs mostrou que todos pertencem a enzimas da classe P-II. Os 21

peptídeos comuns às três classes de SVMPs eram provenientes da região do pró-domínio, a qual é mais conservada entre os diferentes tipos de SVMPs.

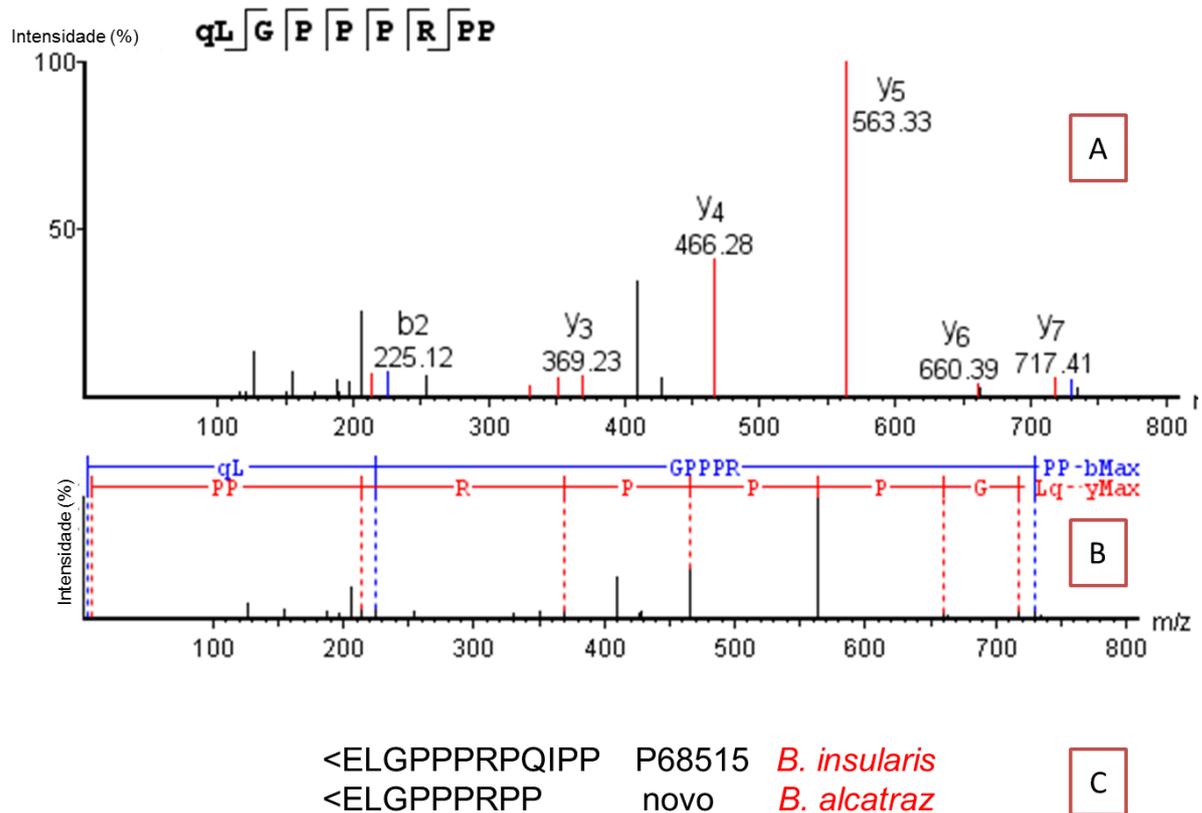
#### 4.3.2. BPPs

Ao todo, foram identificados 26 peptídeos com estrutura de BPP (peptídeo potenciador de bradicinina), e destes, 7 apresentaram sequências novas. A Tabela 2 contém a lista de BPPs identificados no veneno de *B. alcatraz* por meio da busca no banco de dados e pela metodologia do sequenciamento *de novo*. As sequências provenientes desta última metodologia foram anotadas como BPPs pela ferramenta SPIDER.

**Tabela 2.** BPPs identificados pela análise peptidômica do veneno de *B. alcatraz*.

Peptídeos	Massa (Da)	m/z	z	$\Delta$ ppm	Peptídeo
<EARPPHPP	881,4507	441,7365	2	8,8	BPP 11e sem IPP ( C-terminal)
<EARPPHPPIPP	1188,64	595,3292	2	3	BPP 11e
<EARPPHPPIPPA	1259,678	630,8512	2	8,2	BPP AP sem P (C-terminal)
<EARPPHPPIPPAP	1356,73	679,3728	2	0,6	BPP AP
<EGGWPRPGP	933,4457	467,7301	2	0	BPP 13a sem EIPP (C-terminal)
<EGGWPRPGPEIPP	1369,678	685,8473	2	1,6	BPP 13a
<EGRAPHPPIPPAPL	1429,783	715,8994	2	0,8	BPP APL
<EKWAPVQKWAP	1320,698	661,3568	2	0,9	BPP 5a sem processamento
<ENWPHQPIPP	1195,577	598,7979	2	3,1	BPP 10c
<EQWAQGGWPRPGPEIPP	1882,911	942,4645	2	1,7	BPP 13a + EQWA (N-terminal)
<EQWAQNWPHQPIPP	1708,811	855,4209	2	9,5	BPP 10c + EQWA (N-terminal)
<EQWAQNWPRQPIPP	1727,853	864,9351	2	1,4	BPP + EQWA (N-terminal)
<EWAQGRAPHPPIPPAP	1701,874	851,945	2	0,9	BPP AP + EWA (N-terminal)
AQGRAPHPPIPPAP	1404,763	469,2641	3	5,6	BPP AP + A (N-terminal)
GWPRPGPEIPP	1201,624	601,82	2	0,9	BPP 13a sem EG (N-terminal)
KVQQWAQGGWPRPGPEIPP	2127,101	1064,559	2	0,5	BPP 13a + KVQQWA (N-terminal)
FRFHPLPPAP	1316,703	659,3643	2	8,5	
AARHPHPLPP	1188,652	595,335	2	3,2	
<ERAPHPPLPP	1188,64	595,3318	2	7,4	
<ELGPPRPP	940,513	471,2674	2	7,8	
PAARHHPPLPP	1188,652	595,3345	2	2,4	
PLNHAHPPLPP	1188,64	595,3293	2	3,2	
QHRAHPPLPPAP	1316,71	659,3634	2	1,6	

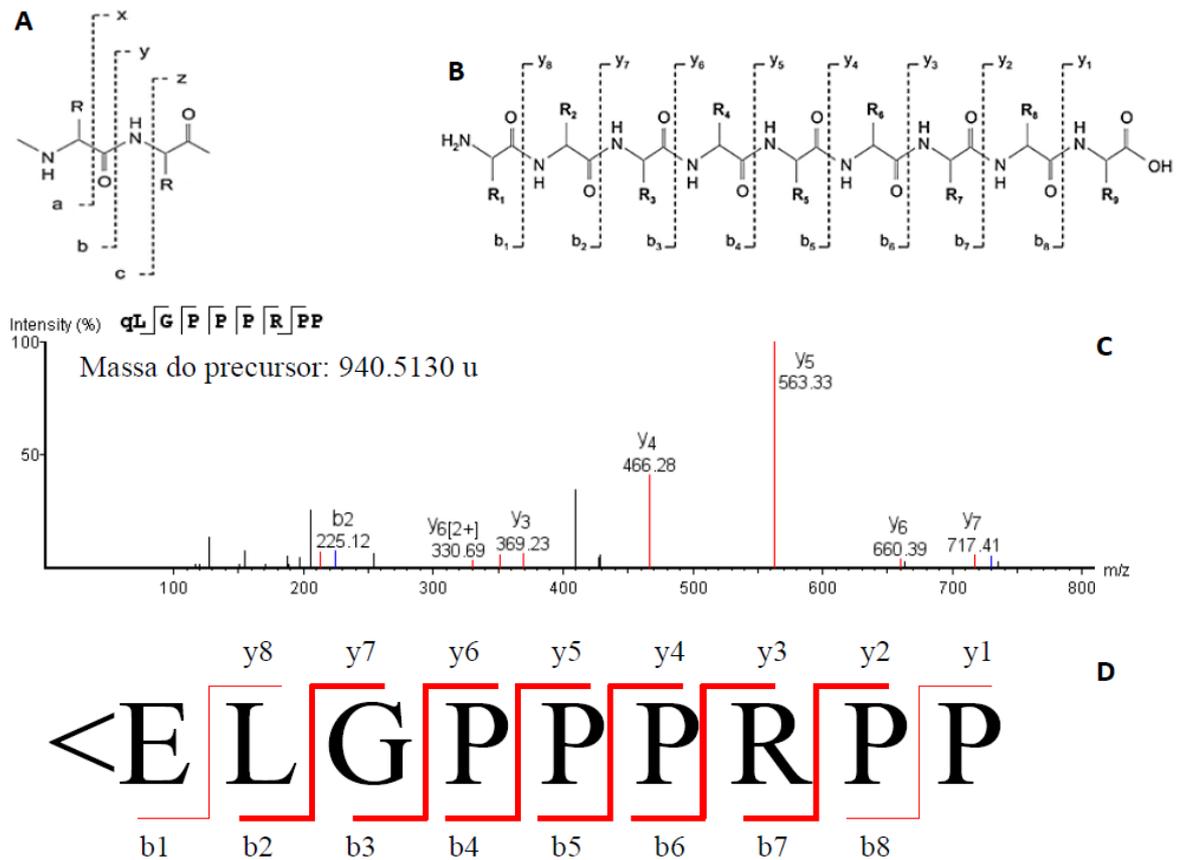
Como exemplo de sequenciamento *de novo* dos peptídeos que apresentaram sequências inéditas (7), há a ilustração do espectro de MS<sup>2</sup> (Figura 18) e a anotação gerada pelo programa PEAKS Studio para a identificação do peptídeo <ELGPPRPP.



**Figura 18.** Sequenciamento *de novo* do peptídeo <ELGPPRPP, encontrado no veneno de *B. alcatraz*. A anotação q equivale a <E (ácido piroglutâmico). O painel A mostra o espectro de MS/MS com a especificação das massas dos íons das séries b e y de acordo com a nomenclatura de Roepstorff-Fohlmann-Biemann (Roepstorff e Fohlmann, 1984). O painel B ilustra de forma gráfica as diferenças de massas encontradas na fragmentação do peptídeo que explicam a estrutura primária atribuída ao espectro. O painel C compara a estrutura primária de um BPP descrito no veneno de *B. insularis* (acesso Uniprot P68515) com o peptídeo <EQLGPPRPP, identificado no veneno de *B. alcatraz*.

Na Figura 18 (painel C) são mostradas as sequências de um BPP descrito no veneno de *B. insularis* e uma das novas sequências identificadas no veneno de *B. alcatraz* que apresenta similaridade com as estruturas de BPPs. No alinhamento é possível observar que os oito primeiros resíduos da nova sequência são idênticos a

um BPP de *B. insularis*. A Figura 19 mostra mais detalhes da análise do espectro de MS/MS desse peptídeo.



**Figura 19.** Sequenciamento *de novo* do peptídeo de estrutura  $\langle ELGPPPRPP \rangle$ , identificado no veneno de *B. alcatraz*. O painel A mostra a nomenclatura para os íons provenientes da fragmentação de peptídeos, segundo Roepstorff-Fohlmann-Biemann (Reproduzido de Cantú et al, 2008). O painel B mostra um exemplo da numeração da série b/y proveniente de um peptídeo de 9 resíduos de aminoácidos (Reproduzido de Cantú et al, 2008). O painel C contém o espectro de MS/MS do peptídeo identificado neste estudo, com as anotações dos íons da série b/y. O painel D mostra a série b/y do peptídeo identificado, onde as linhas vermelhas mais espessas indicam as fragmentações observadas, e as linhas de menor espessura indicam as fragmentações teóricas, cujas massas não foram detectadas no espectro de MS/MS.

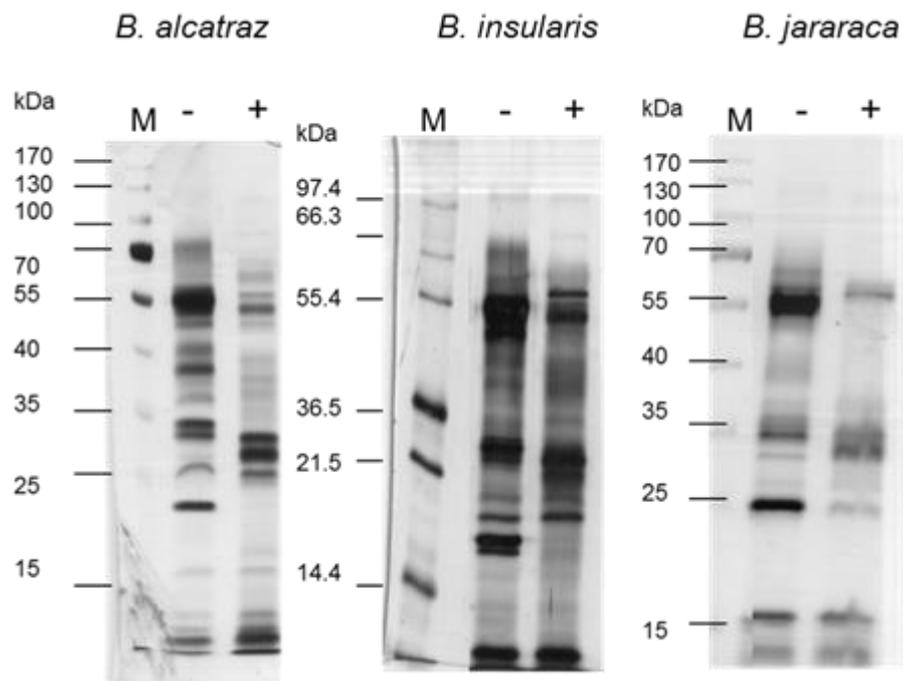
Durante o processo de fragmentação dos peptídeos no espectrômetro de massas, 3 séries de íons são possíveis. Como mostrado na Figura 19 (painel A), pode-se encontrar as séries a/x, b/y e c/z, onde a primeira letra de cada par corresponde à porção da molécula que retém a carga residual no N-terminal (a, b, c), e a segunda letra indica a porção da molécula que retém a carga residual no C-

terminal (x, y, z) (Mann *et al.*, 1989). Entretanto, dentre as ligações covalentes existentes nos peptídeos, a de menor energia é a ligação peptídica, cuja quebra é responsável pela geração dos íons da série b/y (Cantú *et al.*, 2008). No caso aqui utilizado como exemplo, o peptídeo de estrutura primária <ELGPPRPP, a Figura 19 mostra os íons identificados (b2, b7,y2,y3,y4,y5,y6, y7), contudo os íons b7 e y2 só podem ser observados utilizando a ferramenta *zoom* do programa (b7: m/z 729,42; y2: m/z 213,12). O íon y2 (m/z 213) corresponde aos resíduos C-terminais PP, cuja presença é considerada como uma assinatura da estrutura dos BPPs, e que fornece maior evidência sobre a identificação deste BPP (Tashima *et al.*, 2012).

#### **4.4. Análise glicoproteômica**

##### **4.4.1. Tratamento dos venenos com glicosidases**

A presença frequente de unidades de ácido siálico na porção terminal de N-glicanos de diferentes proteínas levou à escolha da enzima neuraminidase para avaliação da presença deste monossacarídeo na extremidade não redutora de cadeias de glicanos em glicoproteínas dos venenos do grupo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca*). Para a avaliação da remoção de ácido siálico foi realizada a comparação dos perfis eletroforéticos de proteínas dos venenos tratados ou não com a neuraminidase escolhida (Figura 20).



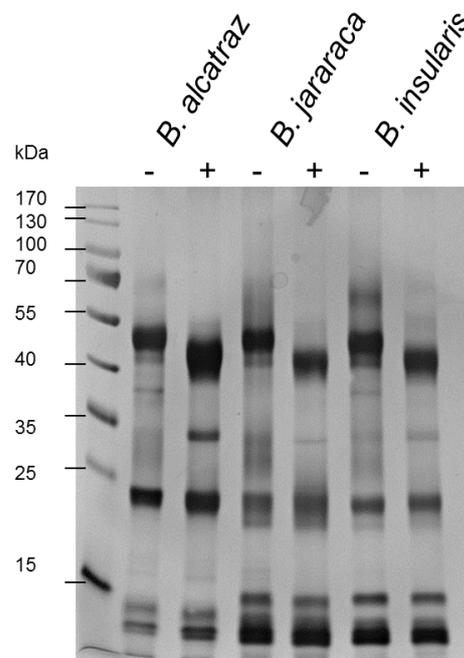
**Figura 20.** Perfis eletroforéticos (SDS-poliacrilamida 12%) dos venenos de *B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca* (5  $\mu$ g), em condições redutoras. Coloração: Nitrato de Prata. Os símbolos – e + representam, respectivamente amostra controle e amostra tratada com neuraminidase. M: padrões de massa molecular.

A comparação dos perfis eletroforéticos dos venenos de *B. jararaca* e *B. insularis* mostrou que estes são mais parecidos entre si e diferem do veneno de *B. alcatraz* (Figura 9). O tratamento com a neuraminidase revelou que este monossacarídeo está presente na extremidade não redutora dos glicanos dos três venenos, já que a maior parte das bandas de proteínas tiveram sua massa molecular alterada, e conseqüentemente sua mobilidade, possivelmente devido à instabilidade estrutural gerada pela remoção do monossacarídeo. Foi interessante observar que, após a remoção de ácido siálico, o perfil proteico destes venenos se mostrou mais similar entre si.

Com o objetivo de avaliar a N-glicosilação e O-glicosilação das proteínas, os venenos foram submetidos ao tratamento com as enzimas PNGase F (remoção de N-glicanos) e com as enzimas ( $\alpha$ 2-3,6,8,9-Neuraminidase, Endo- $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidase,  $\beta$ 1,4-galactosidase e  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidase). Nestes

experimentos, optamos por desnaturar as proteínas e reduzir suas pontes de dissulfeto, para facilitar o acesso das enzimas aos sítios de glicosilação.

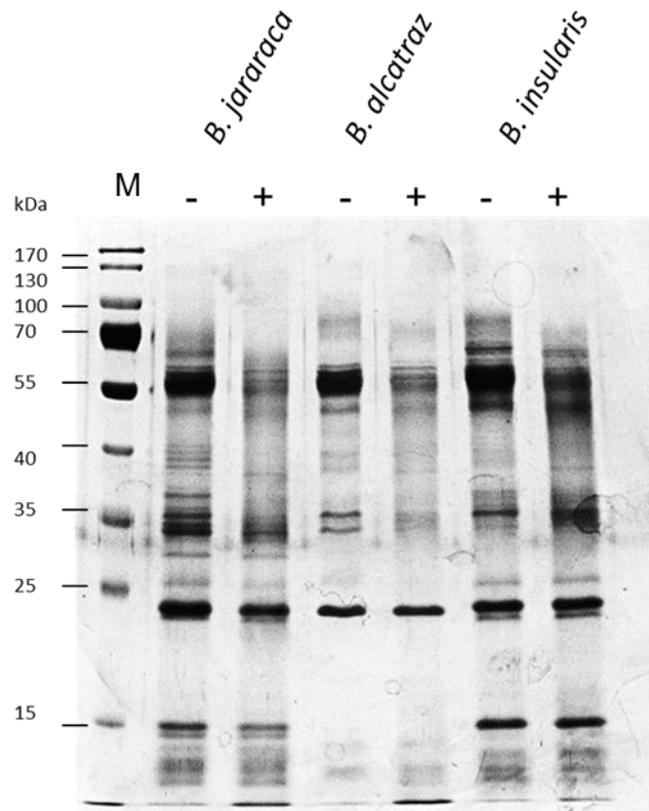
A análise da N-desglicosilação total dos venenos, mostrada na Figura 21, mostrou que a remoção das cadeias de N-glicanos das glicoproteínas dos três venenos causou alteração da mobilidade eletroforética principalmente das proteínas com massa molecular acima de 30 kDa.



**Figura 21.** Perfis eletroforéticos (SDS-poliacrilamida 12%) dos venenos de *B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca* (5 µg), em condições redutoras, após tratamento com a enzima PNGase F, com prévia desnaturação das proteínas do veneno. Coloração: Nitrato de Prata. Os símbolos – e + representam respectivamente amostra controle e amostra tratada com PNGase F.

Para a O-desglicosilação de proteínas é necessário o emprego de glicosidases com diferentes especificidades, pois a ausência de um core estrutural nos O-glicanos, como encontrado nos N-glicanos, impede a aplicação de uma enzima única. Adicionalmente algumas enzimas responsáveis pela remoção dos O-glicanos não atuam na presença de ácido siálico, o que torna necessária a adição de uma neuraminidase na reação, para que a O-desglicosilação seja completa. Nesse sentido, o tratamento dos venenos com a neuraminidase já revelou significativas

diferenças nas massas moleculares das proteínas (Figura 20). Desta forma, embora os perfis das proteínas após a O-desglicosilação (Figura 22) revelem diferenças significativas entre as proteínas nativas e tratadas, tais alterações não podem ser consideradas exclusivamente como consequência da remoção de O-glicanos.



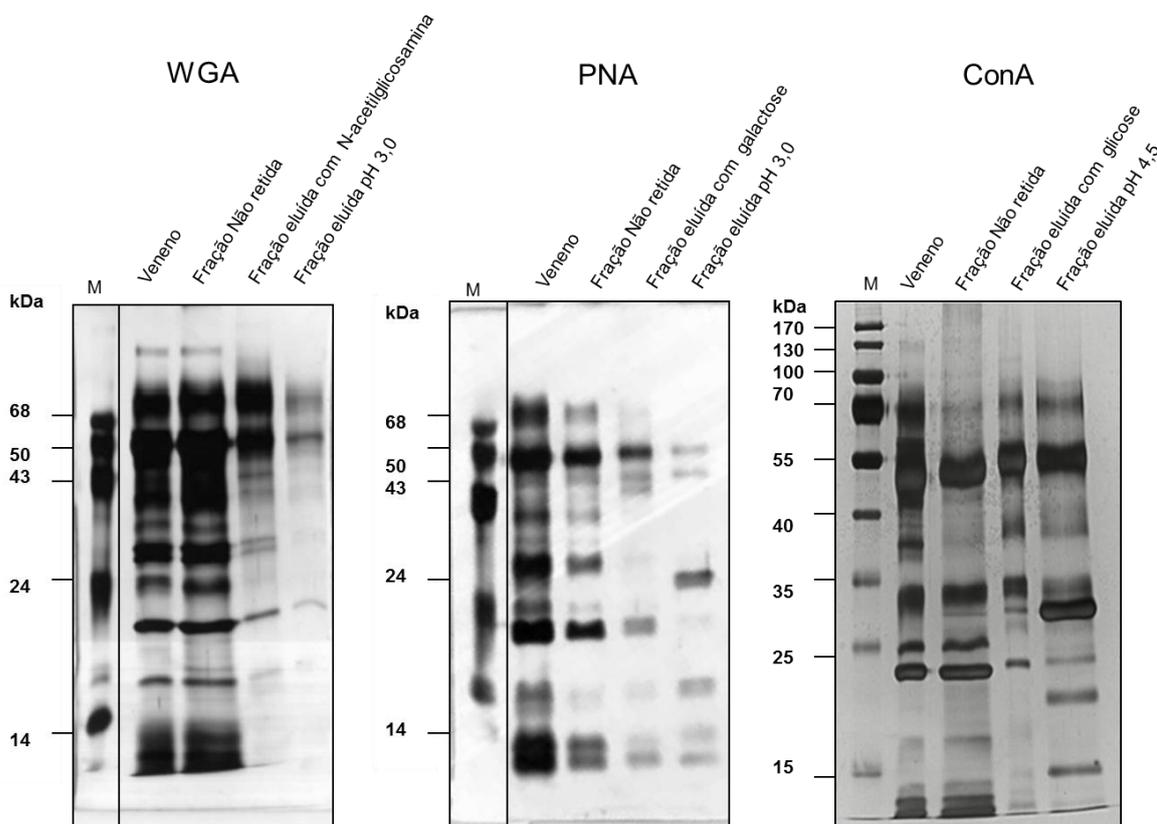
**Figura 22.** Perfis eletroforéticos (SDS-poliacrilamida 12%) dos venenos de *B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca* (5  $\mu$ g), em condições redutoras, após tratamento com as enzimas  $\alpha$ 2-3,6,8,9-Neuraminidase, Endo- $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidase,  $\beta$ 1,4-galactosidase e  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidase com prévia desnaturação das proteínas do veneno. Massa de proteína: 5  $\mu$ g. Coloração: Nitrato de Prata. Os símbolos - e + representam respectivamente amostra controle e amostra tratada com as enzimas. M: padrões de massa molecular

#### 4.4.2. Análise glicoproteômica

Para a análise do glicoproteoma do veneno de *B. alcatraz* foram empregadas três lectinas com diferentes especificidades: a WGA, que reconhece unidades de ácido siálico e N-acetilglucosamina, a PNA, que reconhece N-acetilgalactosamina e galactose, e a ConA, que apresenta afinidade por unidades de manose e glicose. A

Figura 23 mostra os perfis eletroforéticos das frações de proteínas das cromatografias de afinidade, realizadas com estas lectinas neste estudo.

A escolha destas três lectinas teve o objetivo de avaliar a presença de diferentes composições de glicanos nas glicoproteínas do veneno de *B. alcatraz*. O perfil eletroforético das frações de proteínas obtidas nas cromatografias de afinidade é mostrado na Figura 23. Como resultado da cromatografia de afinidade a WGA verificamos que as glicoproteínas retidas, ou seja aquelas que apresentam ácido siálico e/ou N-acetilglicosamina em sua composição de glicanos, apresentam em sua grande maioria elevada massa molecular. A região acima de 50 kDa foi a que apresentou maior enriquecimento nas frações eluídas da resina com N-acetilglicosamina e abaixamento de pH.

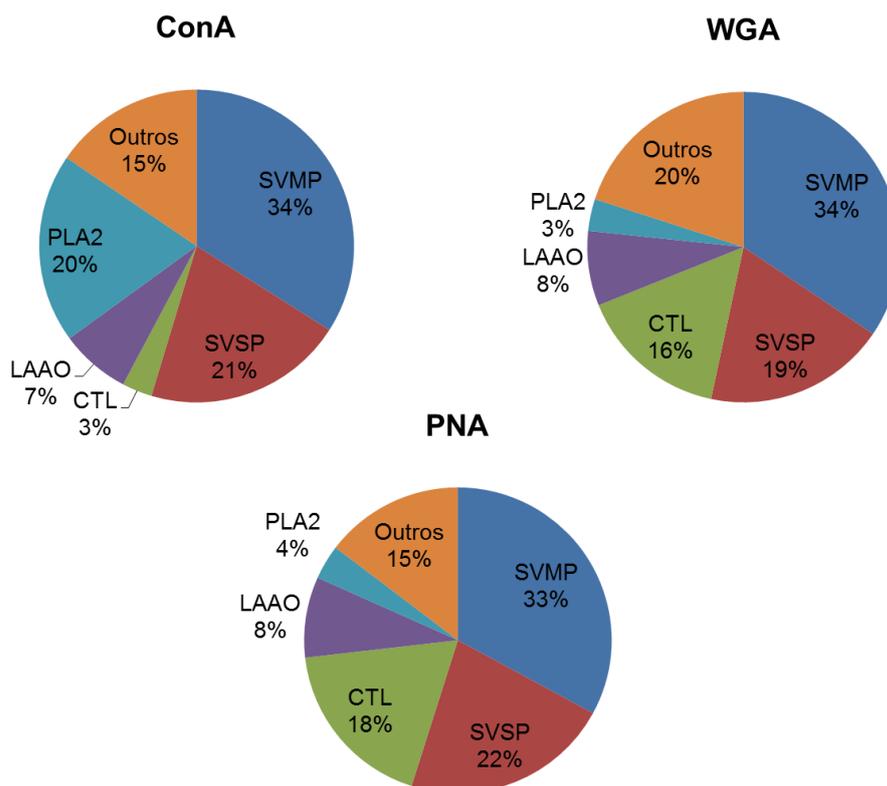


**Figura 23.** Perfil eletroforético das frações do veneno de *B. alcatraz* (5 µg) obtidas por cromatografia de afinidade às lectinas WGA, PNA e ConA em gel de SDS-poliacrilamida (12%). Coloração: Nitrato de prata. M: padrões de massa molecular.

A PNA é uma lectina que apresenta afinidade por unidades de galactose e também pela estrutura denominada Antígeno T ( $\text{Gal}\beta 3\text{GalNAc}\alpha$ ) e de acordo com os dados de quantificação e perfil eletroforético das glicoproteínas retidas nesta análise, a presença de unidades de galactose ou de Antígeno T não é frequente nas glicoproteínas do veneno de *B. alcatraz*. Diferentemente da análise utilizando a lectina WGA, o perfil das frações retidas pela PNA apresentou proteínas em uma faixa mais larga de massa molecular (10 kDa – 50 kDa).

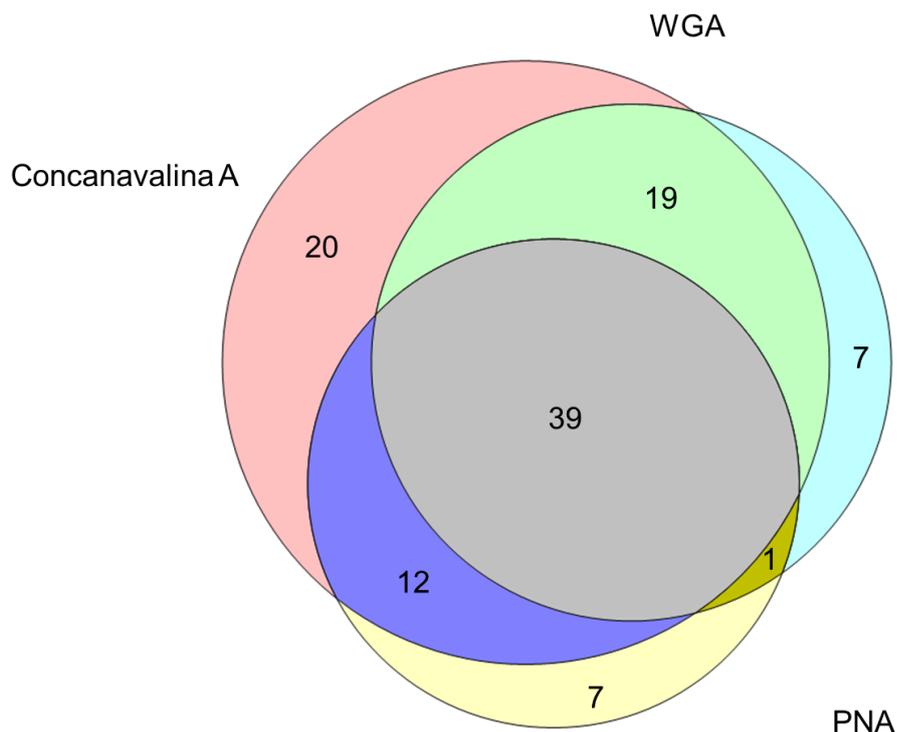
Como a ConA apresenta afinidade por unidades de manose, seu reconhecimento é mais abrangente, incluindo N-glicanos dos tipos rico em manose, híbrido e complexo (devido à presença de manose no *core*). Ao contrário do que se observou com as frações das cromatografias de afinidade a WGA e PNA, a ConA mostrou um perfil de proteínas muito próximo ao do veneno total. Este resultado pode ser consequência da ampla presença de N-glicosilação nas proteínas de veneno.

As frações com afinidade pelas três lectinas foram submetidas à digestão por tripsina e analisadas por LC-MS/MS, e o resultado desta análise está mostrado na Tabela suplementar 8 (anexo em CD-ROM). A identificação das proteínas com afinidade pela ConA, WGA e PNA revelou 90, 66 e 59 grupos de proteínas, respectivamente. A Figura 24 mostra os gráficos da distribuição dos grupos de proteínas entre as classes de toxinas. A maior parte das proteínas retidas pelas três lectinas foram identificadas como SVMPs, enquanto que as SVSPs e CTLs aparecem como segunda classe mais abundante.



**Figura 24.** Gráficos de distribuição dos grupos de proteínas identificados nas frações do veneno de *B. alcatraz* retidas nas resinas de WGA, PNA e ConA.

As identificações dos grupos de proteínas das frações da cromatografia com a lectina ConA sugerem a presença de N-glicosilação. Já no caso da WGA, as proteínas retidas poderiam conter tanto N-glicosilação como O-glicosilação, enquanto que a análise da PNA sugere a presença de O-glicosilação nas proteínas identificadas. Desta forma, a análise das proteínas comuns aos eluatos das três lectinas sugere quais grupos de toxinas poderiam apresentar N- e O-glicosilação concomitantemente. A Figura 25 mostra um diagrama de Venn das identificações oriundas das três lectinas utilizadas.



**Figura 25.** Diagrama de Venn dos grupos de proteínas identificados nas análises do glicoproteoma do veneno de *B. alcatraz* por cromatografia de afinidade às lectinas ConA, WGA e PNA.

Os 39 grupos de proteínas identificados pertencem majoritariamente às classes CTL (28%), SVMP (23%) e SVSP (20%). Os sete grupos de proteínas exclusivas dos eluatos da PNA pertencem à classe das SVMPs, PLA2, SVSP e CRISP. O único grupo de proteínas compartilhado por WGA e PNA pertence à classe das CRISPs. Os sete grupos de proteínas exclusivos das frações eluídas da WGA são SVMPs, svNGF, aminopeptidase e NUCL (Tabela suplementar 8; anexo em CD-ROM).

## 4.5. Análise N-glicômica

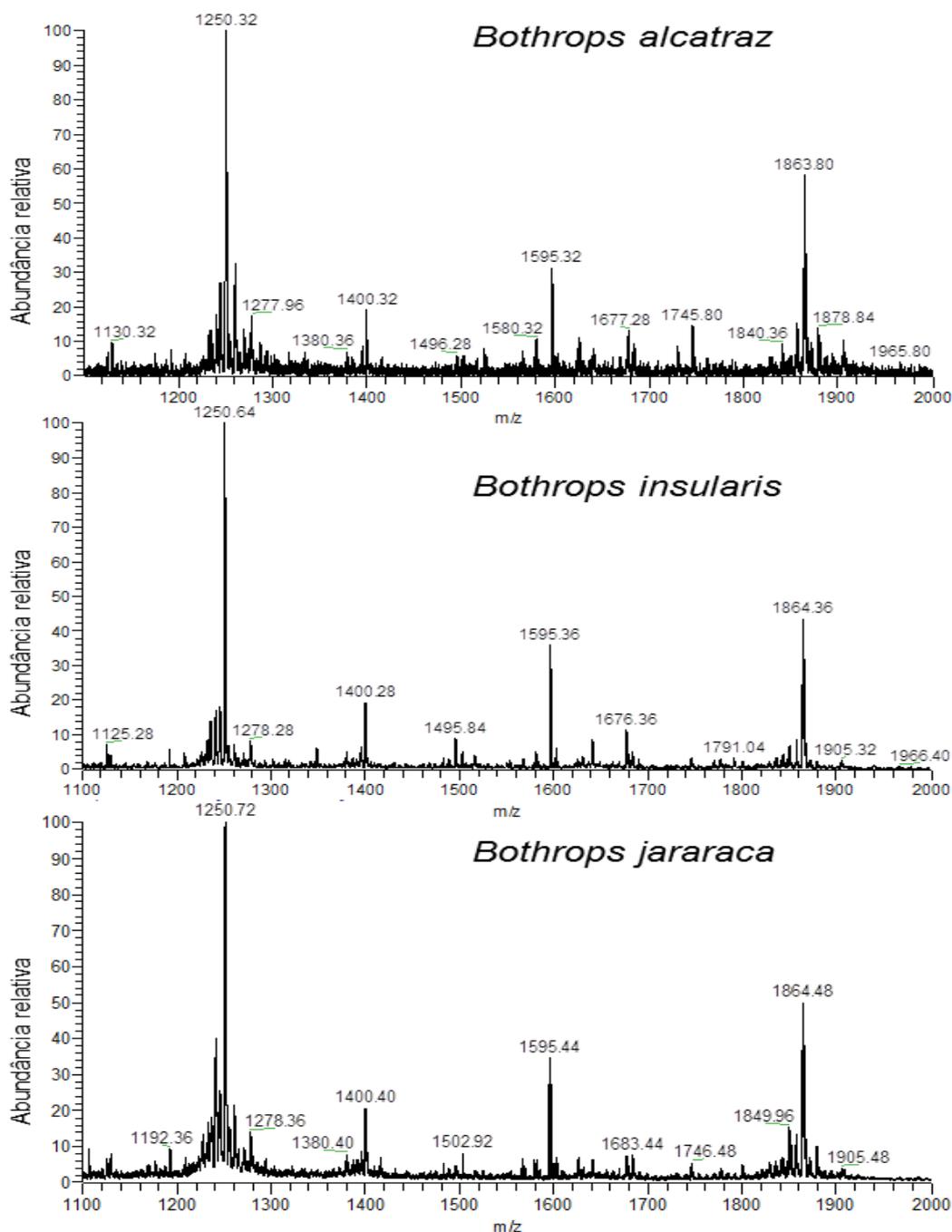
### 4.5.1. Análise Qualitativa

O primeiro passo na análise qualitativa do N-glicoma dos venenos do grupo Jararaca foi proceder com a identificação dos N-glicanos liberados pelo tratamento

com a enzima PNGase F. A identificação foi feita com base nos valores de massa observados nos espectros de cada amostra e posterior aplicação destes valores no programa Glycomod.

O processo de permetilação não é essencial para a análise de glicanos por espectrometria de massas, mas sua aplicação permite marcar as hidroxilas livres dos N-glicanos, tornando distinguíveis monossacarídeos em diferentes posições da estrutura e possibilitando a definição topológica. Outros benefícios deste método de derivatização é que este propicia maior estabilidade, hidrofobicidade e volatilidade às estruturas, além de normalizar as propriedades físico-químicas dos glicanos, diminuir o efeito de supressão durante o processo de ionização e auxiliar na exposição de pontos de fragmentação (Zaia, 2010, Reinhold *et al.*, 2010, Ashline *et al.*, 2005).

A primeira forma de ilustrar estes resultados qualitativos é a média da aquisição de 51 espectros de massas ( $MS^1$  ou *full MS*) de cada amostra (Figura 26) e, embora, a simples comparação destes seja limitada em detalhes, é possível observar a alta similaridade entre os perfis de massas dos N-glicanos dos venenos de *B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca*.



**Figura 26.** Comparação entre a média de 51 espectros de MS<sup>1</sup> de N-glicanos presentes em glicoproteínas dos venenos do grupo Jararaca. *Mass range*: 1100-2000 m/z.

A análise dos espectros de MS<sup>1</sup> mostrou que, sob as mesmas condições de ionização, os perfis de N-glicanos obtidos para as amostras de veneno são semelhantes, partilhando não apenas os mesmos valores de m/z como também as

intensidades relativas dos quatro íons mais abundantes nas três amostras (m/z 1250, m/z 1400, m/z 1595, e m/z 1864).

Para a análise dos dados no programa Glycomod, os valores das massas monoisotópicas de cada íon foram anotados e utilizados para busca de composições putativas e registros no banco de dados. Posteriormente, estas composições foram utilizadas para o procedimento de definição de topologia das estruturas dos N-glicanos por espectrometria de massas sequencial (MS<sup>n</sup>).

Para cada composição sugerida foram consideradas as possibilidades de ramificação e organização das unidades de monossacarídeos. Como exemplo pode-se considerar o raciocínio utilizado para os íons de m/z 1250,32 e 1863,80, encontrados no N-glicoma dos três venenos. Para exemplificação são mostrados apenas os resultados de *B. alcatraz*, mas a análise dos outros dois venenos mostrou os mesmos resultados para os N-glicanos.

Os íons de m/z 1250,32 e 1863,80 correspondem ao mesmo N-glicano de massa monoisotópica 3704 Da com diferentes cargas (3+ e 2+, respectivamente). Utilizando o valor de massa calculado a partir do íon m/z 1250,32, encontramos que o íon monoisotópico tem massa igual a 3704,96 Da e, de acordo com os parâmetros estabelecidos no item 3.6.3.4., o programa Glycomod reportou 15 composições de oligossacarídeos cuja massa se encontra dentro da tolerância de 2 Da do valor determinado experimentalmente. A Tabela 3 lista todas as composições reportadas pelo Glycomod para a massa monoisotópica 3704,96 Da.

**Tabela 3.** Lista de composições de N-glicanos sugeridos pelo programa Glycomod para a massa monoisotópica 3704.6 Da. Hex: hexose, HexNAc: N-acetilhexosamina, NeuAc\*: ácido neuramínico (ácido siálico), NeuGc\*: ácido N-glicolilneuramínico.

Nº	Massa (Da)	$\Delta$ (Da)	Composição	Classificação
----	------------	---------------	------------	---------------

<b>1</b>	3619.8	0.1 45	$(Hex)_2 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_2 (NeuAc)_4 (NeuGc)_3$	<i>paucimannose</i>
<b>2</b>	3619.8	0.1 09	$(Hex)_2 (HexNAc)_4 (Deoxihexose)_4 (NeuAc)_1 (NeuGc)_3$	-
<b>3</b>	3619.8	0.1 09	$(HexNAc)_2 (Deoxihexose)_3 (NeuAc)_2 (NeuGc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>4</b>	3619.8	0.1 09	$(Hex)_1 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_2 (NeuAc)_3 (NeuGc)_1 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>5</b>	3619.8	0.1 09	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>6</b>	3619.8	0.0 73	$(Hex)_1 (HexNAc)_5 (Deoxihexose)_4 (NeuGc)_1 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>7</b>	3619.8	0.0 73	$(Hex)_2 (HexNAc)_5 (Deoxihexose)_3 (NeuAc)_1 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>8</b>	3621.7	- 1.8 3	$(Hex)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_3 (NeuGc)_5$	<i>paucimannose</i>
<b>9</b>	3621.8	- 1.8 7	$(Hex)_2 (HexNAc)_3 (Deoxihexose)_3 (NeuGc)_5$	-
<b>10</b>	3621.8	- 1.8 7	$(HexNAc)_1 (Deoxihexose)_2 (NeuAc)_1 (NeuGc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>11</b>	3621.8	- 1.8 7	$(Hex)_1 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 (NeuGc)_3 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>12</b>	3621.8	- 1.8 7	$(Hex)_2 (HexNAc)_1 (NeuAc)_3 (NeuGc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>13</b>	3621.8	- 1.9 1	$(Hex)_2 (HexNAc)_4 (Deoxihexose)_2 (NeuGc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>14</b>	3621.8	- 1.9 1	$(Hex)_3 (HexNAc)_4 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_1 (NeuGc)_1 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>
<b>15**</b>	3621.8	- 1.9 1	$(Hex)_4 (HexNAc)_4 (NeuAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	<i>híbrido/complexo</i>

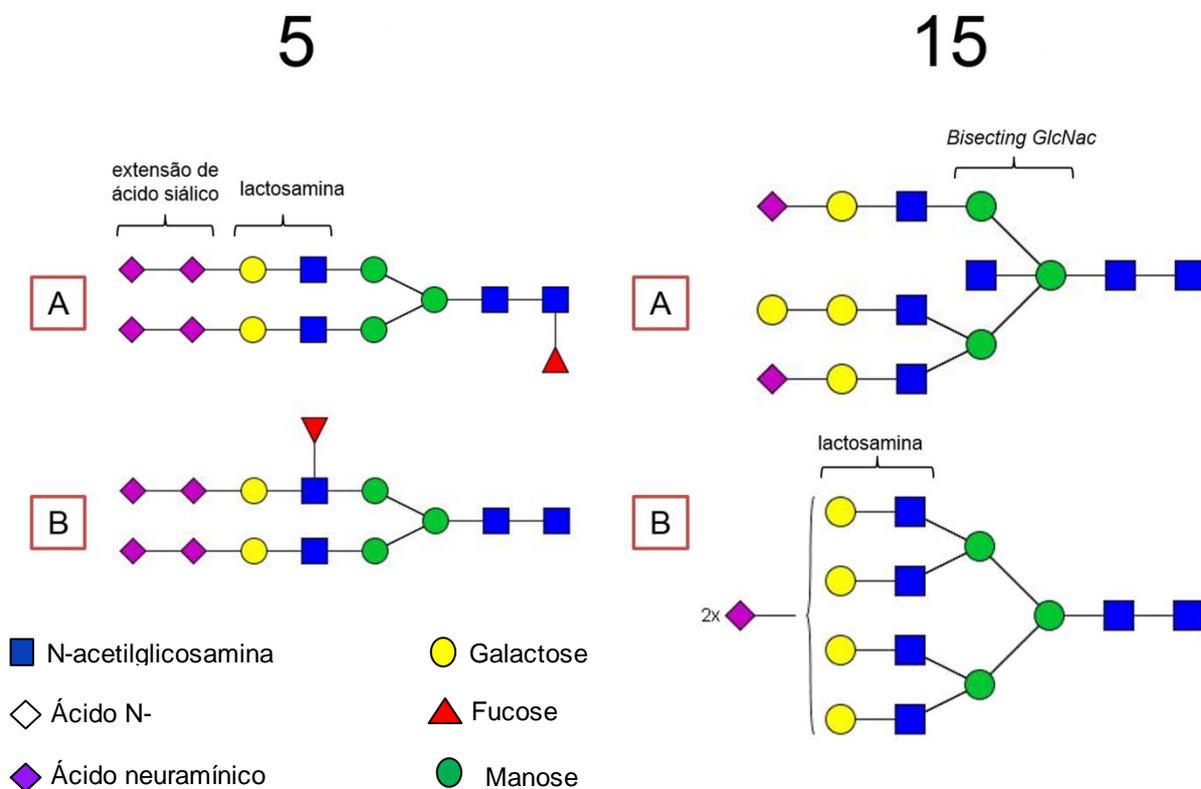
\*NeuGc e NeuAc são representantes de uma família de monossacarídeos denominada ácido siálico..

\*\*A composição de número 15 já foi descrita em algumas glicoproteínas (de acordo com o banco de dados UniCarbKB), uma delas oriunda do ovo de pomba.

A análise das composições listadas na Tabela 3 considera não apenas o *match* entre a massa observada e as massas das composições listadas, mas também outros critérios que foram previamente considerados. A ausência de classificação de uma composição é resultado da ausência do *core* dos N-glicanos (definido pela presença de pelo menos três hexoses e duas hexosaminas); desta forma as composições 2 e 9 foram descartadas, uma vez que, de acordo com este critério, não se tratam de N-glicanos.

A classificação *paucimanose* se refere a um tipo de glicosilação muito específico que, até o momento, foi descrito apenas em invertebrados; por esta razão as composições 1 e 8 foram descartadas (Tabela 3). Os dados da primeira análise N-glicômica do veneno de *B. jararaca*, publicado por Zelanis *et al.* (2012), revelaram uma alta semelhança entre o padrão de glicosilação observado em mamíferos e aquela observada em glicoproteínas do veneno desta serpente. Por esta razão, neste estudo, para a análise das composições, esse fato foi considerado para excluir composições com elevado número de deoxihexoses, que são pouco frequentes em mamíferos, levando ao descarte das composições 1, 3, 4, 6, 7, 10 e 13. Posteriormente as composições 11, 12 e 14 foram descartadas, pois o ácido siálico NeuGc (ácido N-glicolilneuramínico) não havia sido descrito no N-glicoma do veneno de *B. jararaca*. Concluindo, na primeira análise das composições listadas pelo Glycomod (Tabela 3), apenas as de número 5 e 15 foram consideradas plausíveis, em primeira instância, no contexto da análise do N-glicoma dos venenos do grupo Jararaca.

Considerando registros de N-glicanos de composições semelhantes já reportados na literatura, para cada composição foram consideradas duas possibilidades de organização dos monossacarídeos nas estruturas (Figura 27).



**Figura 27.** Possíveis estruturas do N-glicano de massa monoisotópica 3704,96 Da, encontrado no veneno de *B. alcatraz*, de acordo com as composições de número 5 e 15 sugeridas pelo Glycomod (Tabela 3). As estruturas da lactosamina, extensão de ácido siálico (ácido neuramínico) e *Bisecting GlcNAc* foram assinaladas nas estruturas.

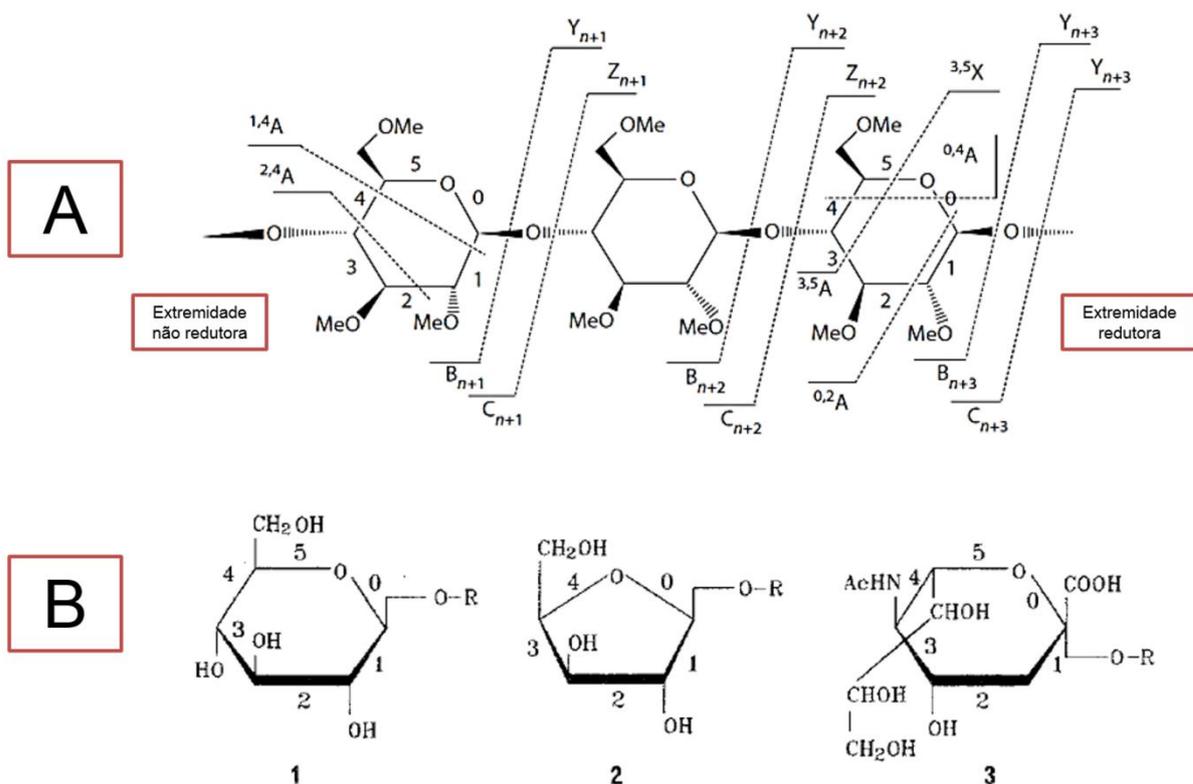
A existência de quatro unidades de ácido neuramínico na composição 5 fez com que a suposição da extensão de ácido siálico nas antenas do glicano fosse considerada. Em mamíferos, a ocorrência mais comum é a presença de um único ácido siálico em cada extremidade das antenas, mas há evidências que comprovam este tipo de extensão em determinadas glicoproteínas de mamíferos (Varki e Schauer, 2009).

A diferença entre as estruturas A e B (composição de número 5) reside apenas na posição da fucose dentro da estrutura, onde em A esta se encontra ligada à primeira N-acetilglicosamina do core, e em B ligada à N-acetilglicosamina da

lactosamina. Para diferenciar estas duas possíveis estruturas é preciso analisar as massas esperadas na fragmentação de cada uma delas (Figura 27).

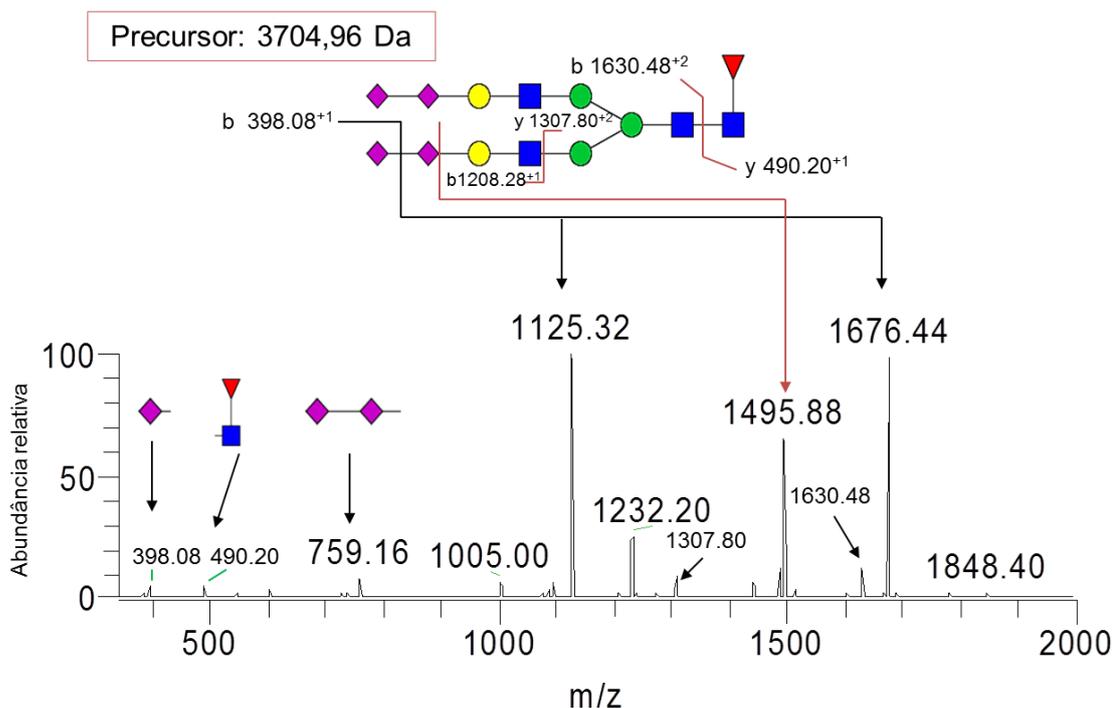
As estruturas A e B da composição de número 15 diferem quanto à disposição das unidades de hexose e N-acetilhexosamina (Figura 27). A estrutura A foi descrita no banco de dados e foi considerada para a primeira análise dessa composição. Tanto para a composição 5 quanto para a de número 15, caberiam muitas outras estruturas, mas como abordagem inicial apenas estas foram consideradas para simplificar a análise deste glicano.

Embora o programa Glycomod classifique os monossacarídeos apenas como hexoses, hexosaminas e deoxihexose, uma vez que seus estereoisômeros apresentam a mesma massa, dados da literatura mostram que inferências podem ser feitas de acordo com a posição de cada monossacarídeo na estrutura. Hexoses pertencentes a antenas de N-glicanos do tipo complexo correspondem a galactoses, e o mesmo acontece para a N-acetilhexosamina determinada pelo programa. Na classe das deoxihexoses, a fucose é o monossacarídeo mais comum, e sua presença no core de N-glicanos só é possível de ser identificada pela análise utilizada quando esta ligação ocorre na posição 6 da N-acetilglicosamina terminal da extremidade redutora. As identificações das hexoses, hexosaminas e deoxihexoses presentes nas estruturas deste trabalho partiram destas considerações. Para a análise dos fragmentos foi utilizada a nomenclatura de fragmentação de glicanos estabelecida por Domon e Costello (1988) (Figura 28), que segue o padrão utilizado para a fragmentação de peptídeos.



**Figura 28.** Nomenclatura de fragmentação de polímeros de carboidratos segundo Domon e Costello (1988). Painel A: Nomenclatura dos íons utilizando como referência as extremidades redutora e não redutora. Fonte: Reinhold *et al.*, 2010. Painel B: Numeração dos átomos de carbono de hexoses (1), pentoses (2) e ácido siálico (3). Fonte: Domon e Costello (1988).

Após a consideração do ponto de partida (as estruturas das composições de número 5 e 15) o espectro de  $MS^2$  do N-glicano de massa 3704,96 Da foi analisado em detalhes (Figura 29), considerando as clivagens descritas na Figura 29. A avaliação da composição e estrutura de glicanos permetilados por espectrometria de massas utiliza a diferença de massas observadas entre o íon precursor e os fragmentos gerados e a visualização dos íons da série b/y. A aplicação dessas informações sobre o espectro de  $MS^2$  mostra que dentre as quatro possibilidades cogitadas no início da análise (Figura 27) apenas a estrutura A da composição 5 está presente no N-glicoma de *B. alcatraz*.



**Figura 29.** Média de 22 espectros de massa ( $MS^2$ ) do N-glicano de massa 3704,96 Da. A análise das diferenças entre a massa do precursor e dos fragmentos e a identificação dos íons da série b/y mostrou que a estrutura A da composição 5 (Figura 27) está presente nas glicoproteínas do veneno de *B. alcatraz*. O íon b de m/z 1208,28 não pode ser visualizado no espectro devido a sua baixa intensidade relativa, mas a ampliação da faixa de m/z 1200-1300 permite sua visualização.

No caso do espectro de  $MS^2$  mostrado na Figura 29, os dois íons mais intensos (m/z 1125,32<sup>+3</sup> e m/z 1676,44<sup>+2</sup>) são íons da série y e representam a perda do ácido siálico terminal de uma das antenas do N-glicano. O íon da série b proveniente dessa fragmentação (m/z 398,08) pode ser visualizado no espectro, mas com menor intensidade.

O íon y de m/z 1495,88<sup>+2</sup> é resultado da perda do dímero de ácido siálico de uma das antenas, e o íon b dessa fragmentação de m/z 759,16<sup>+1</sup> também pode ser visualizado. A observação do íon y de m/z 490,20<sup>+1</sup> é a evidência para a localização da fucose na primeira N-acetilglicosamina do core, e a existência do íon y m/z 1630,4<sup>+2</sup> (que corresponde à perda da extremidade redutora contendo uma fucose na posição 1,6) corrobora essa informação.

Os íons da série y frequentemente apresentam maiores intensidades relativas do que os íons da série b, embora estes últimos sejam muito mais informativos

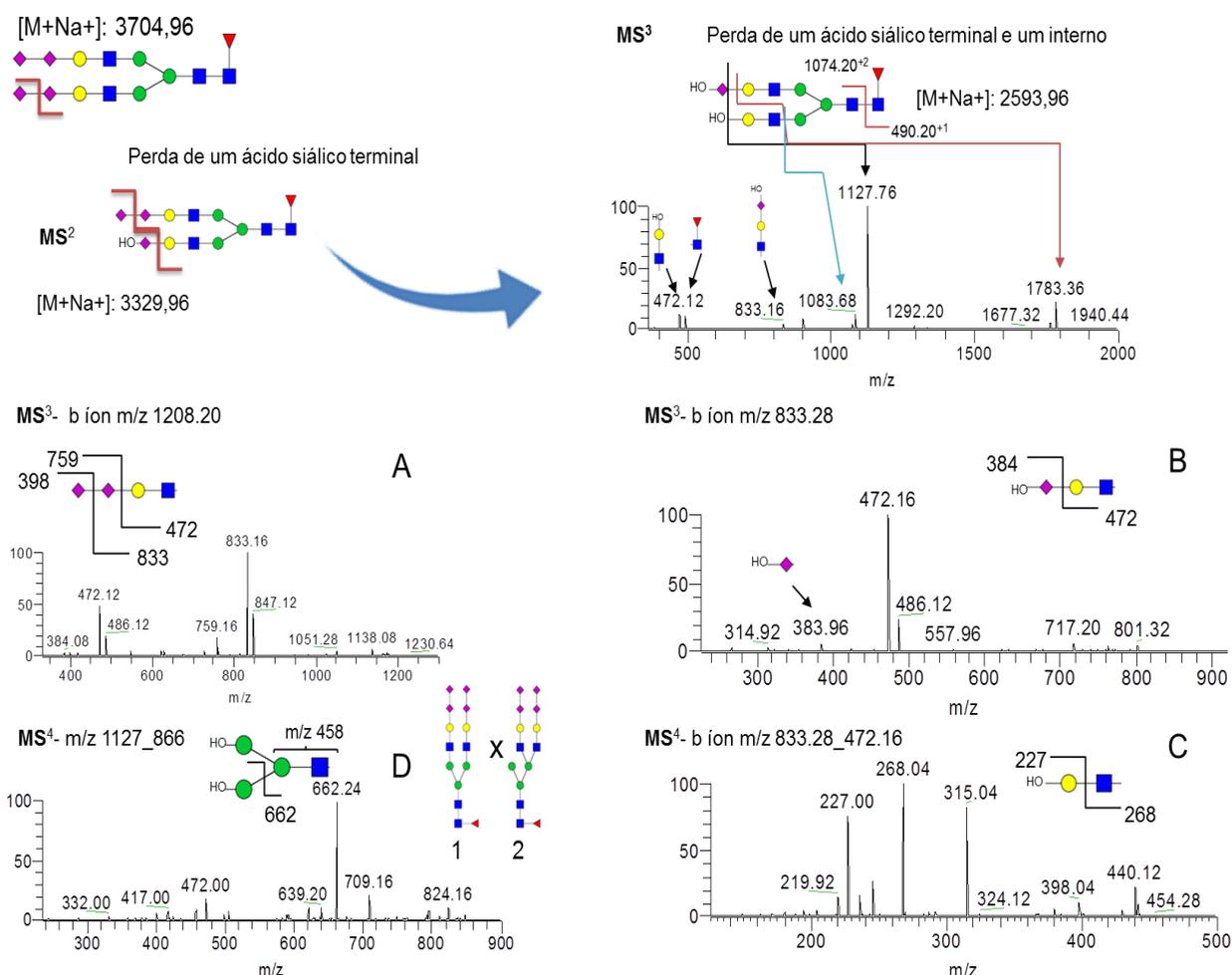
(Ashline *et al.*, 2005). Dentre os íons da série b observados, um dos mais importantes para a caracterização da estrutura deste glicano é o de  $m/z$  1208,28<sup>+1</sup>, que corresponde a uma das antenas da estrutura e auxilia na conclusão de que a deoxihexose não se encontra ligada à antena e sim ao *core* de N-glicanos.

Não obstante à identificação de evidências para a definição da estrutura A da composição 5 como estrutura real (não mais putativa) para a massa monoisotópica observada, a existência concomitante da estrutura B foi averiguada pela busca de íons b que confirmassem que esta pudesse estar presente na amostra. Os valores utilizados para a busca no espectro foram: o íon b correspondente à antena do glicano contendo a deoxihexoses ( $m/z$  1383<sup>+1</sup>), a perda da N-acetilglicosamina da extremidade redutora sem a unidade de fucose (uma diferença de massa de 293), e o íon de  $m/z$  646<sup>+1</sup> (que corresponde à unidade de lactosamina ( $m/z$  472<sup>+1</sup>) mais uma fucose ligada à N-acetilglicosamina). Todavia, nenhuma destas evidências foi encontrada, o que suporta a sugestão de que apenas a estrutura A está presente no veneno de *B. alcatraz*.

A metodologia de MS<sup>n</sup> permite a contínua seleção de íons oriundos da fragmentação de um precursor e a submissão destes à fragmentação, de forma que para a análise de glicanos esta característica é extremamente interessante. Esta abordagem permite a resolução de topologias de modo prático, por meio da fragmentação sequencial e acompanhamento das perdas de massa entre íon precursor e fragmentos. Entretanto, para alguns íons específicos existe a dificuldade de se obter bons espectros de massa devido às baixas intensidades relativa, fato muito frequente na análise de íons da série b.

No caso do N-glicano de massa 3704,96 Da, a estratégia de MS<sup>n</sup> rendeu espectros de massas de qualidade apenas até o MS<sup>3</sup>, e após este *round* de

fragmentação a queda na qualidade da aquisição tornou inviável a continuação deste procedimento. Como alternativa optamos por selecionar no MS<sup>2</sup> a estrutura do glicano após a perda de um ácido siálico terminal (perda de 375 Da) e para o MS<sup>3</sup> foi selecionado para fragmentação o íon correspondente à perda do outro ácido siálico terminal e mais um interno (perda de 361 Da) (Figura 30). O processo de permetilação permite a distinção de hidroxilas que estavam envolvidas em ligações glicosídicas, que após fragmentação geram extremidades hidroxilas livres, e as que estavam livres e foram permetiladas.



**Figura 30.** Espectro de massas (MS<sup>3</sup>) do glicano de massa 3704,96 Da após a perda de três unidades de ácido siálico. Painel A: MS<sup>3</sup> do íon b de m/z 1208 que corresponde à antena íntegra. Painel B: MS<sup>3</sup> do íon b de m/z 833 correspondente à antena após a perda do ácido siálico terminal. Painel C: MS<sup>4</sup> do íon y de m/z 472 que corresponde à lactosamina encontrada nas antenas do glicano. Painel D: íon de m/z 866 correspondente ao core de N-glicanos após a perda da extremidade redutora e antenas. Esta fragmentação ilustra que as manoses do core (conhecidas como braços 6 e

3) são ocupadas cada uma por uma antena, ilustrando que a estrutura 1 é a que está presente na amostra.

A partir do momento que a estrutura das antenas foi determinada, surgiu uma questão adicional a ser resolvida: se as antenas do glicanos se encontravam ligadas a apenas uma manose (Figura 30, painel D, estrutura 2) ou se as duas manoses contém uma antena cada (Figura30, painel D, estrutura 1). Pela análise da fragmentação do íon de  $m/z$  866 (exposto no painel D) é possível concluir que as perdas de massa observadas são explicadas apenas pela existência da estrutura 1.

De forma semelhante à descrita para o glicano 3704,96 Da, a composição e estrutura dos demais N-glicanos identificados nas glicoproteínas do veneno de *B. alcatraz* foram determinadas por meio da técnica de espectrometria de massas MS<sup>n</sup>) e o resultado final está contido na Tabela 4. As Tabelas 5 e 6 contém as listas de N-glicanos identificados, respectivamente, nos venenos de *B. insularis* e *B. jararaca*.

**Tabela 4.** Lista de N-glicanos identificados no veneno de *B. alcatraz*. Os valores de massa e  $\Delta$  (delta) foram determinados pelo programa Glycomod. Abreviações: Hex: hexose, HexNAc: N-acetilhexosamina, NeuAc: ácido siálico, NeuGc: ácido N-glicolilneuramínico, Man: manose, GlcNAc: N-acetilglicosamina.

Nº	m/z	z	z=+1	Massa (Da)	$\Delta$ (Da)	N-glicano	Classe	Banco de dados*	
1	1277.84	2	2532.68	2448.215	-0.597	$(Hex)_1 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
						$(Hex)_2 (HexNAc)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
2	1292.76	2	2562.76	2478.225	-0.527	$(Hex)_1 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_1 (NeuGc)_1 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
						$(Hex)_3 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_4 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
3	1318.28	3	3908.84	3823.888	-0.11	$(Hex)_3 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_4 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
4	1380.08	2	2737.16	2652.315	-0.217	$(Hex)_2 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
5	1399.76	3	4153.28	4069.014	-0.796	$(Hex)_3 (HexNAc)_3 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_4 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
6	1400.36	2	2777.72	2693.341	-0.683	$(Hex)_1 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
						$(Hex)_1 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_1 (NeuGc)_1 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
7	1415.28	2	2807.56	2723.352	-0.854	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	SVSP ( <i>Tropidechis carinatus</i> ) e fator de coagulação**
8	1481.88	2	2940.76	2856.414	-0.716	$(Hex)_3 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
9	1502.4	2	2981.8	2897.441	-0.703	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	LAO e SVSP ( <i>Calloselasma rhodostoma</i> ) **

10	1567.36	1	1567.36	1480.741	1.556	(Hex) <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (Deoxihexose) <sub>1</sub>	-	Sim	PLA2 ( <i>Apis mellifera</i> )
11	1595.40	1	1595.40	1510.752	-0.414	(Hex) <sub>2</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Rico em manose	Sim	<i>B. jararaca</i> ** <sup>±</sup>
12	1677.4	1	1677.4	1592.805	-0.467	(HexNAc) <sub>2</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Complexo	Sim	<i>B. jararaca</i> <sup>±</sup>
13	1682.96	2	3342.92	3258.615	-0.757	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (Deoxihexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>3</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Complexo	Sim	L-selectina ( <i>Homo sapiens</i> )
14	1776.44	2	3529.88	3445.699	-0.881	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (NeuAc) <sub>4</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Complexo	Não	-
15	1799.44	1	1799.44	1714.851	-0.473	(Hex) <sub>3</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Rico em manose	Sim	<i>B. jararaca</i> <sup>±</sup>
16	1863.48	2	3703.96	3619.788	-0.89	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (Deoxihexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>4</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Complexo	Não	<sup>±</sup> <i>Deinagkistrodon acutus</i>
17	1878.4	2	3733.8	3649.799	-1.061	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (Deoxihexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>3</sub> (NeuGc) <sub>1</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Complexo	Não	-
				3649.799	-1.061	(Hex) <sub>3</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (NeuAc) <sub>4</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>		Não	-
18	***1640.52	3	4875.56	-	-	(Hex) <sub>3</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> (Deoxihexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>6</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Complexo	-	<sup>±</sup> <i>Deinagkistrodon acutus</i>
19	***	-	5324.56	-	-	(Hex) <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>4</sub> (Deoxihexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>6</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Complexo	Não	-
20	1519.96	-	4517.93	4430.188	-1.37	(Hex) <sub>3</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> (Deoxihexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>5</sub> + (Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>	Complexo	Não	-

\* Informações referentes ao banco de dados UniCarbKB associado ao programa Glycomod. O cruzamento de informações entre o resultado fornecido pelo programa Glycomod e o banco de dados é feito exclusivamente pela composição dos glicanos, e dessa forma glicanos com diferentes estruturas e mesma composição de monossacarídeo são reconhecidos por uma única entrada no banco de dados.

\*\* As referidas composições apresentam muitas descrições em um variado número de glicoproteínas diferentes e em diferentes organismos que foram omitidas apenas para simplificação da tabela.

\*\*\* O programa Glycomod considera apenas glicanos que contenham no máximo cinco unidades de ácido siálico; a composição dessas estruturas com seis unidades de NeuAc foram confirmadas por espectrometria de massas. O íon de massa 6023,53 Da só foi identificado na abordagem quantitativa, e o valor inserido para massa do glicano foi estimada.

± Estruturas não depositadas no banco de dados. Referência: Lin *et al.*, 2011, Zelanis *et al.*, 2012.

**Tabela 5.** Lista de N-glicanos identificados no veneno de *B. insularis*. Os valores de massa e  $\Delta$  (delta) foram determinados pelo programa Glycomod. Abreviações: Hex: hexose, HexNAc: N-acetilhexosamina, NeuAc: ácido siálico, NeuGc: ácido N-glicolilneuramínico, Man: manose, GlcNAc: N-acetilglicosamina.

Nº	m/z	z	z=+1	Massa (Da)	$\Delta$ (Da)	N-glicano	Classe	Banco de dados*	
1	1277.32	2	2531.64	2448.215	-1.637	$(Hex)_1(HexNAc)_1(Deoxihexose)_1(NeuAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
						$(Hex)_2(HexNAc)_1(NeuAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
2	1292.84	2	2562.68	2478.225	-0.607	$(Hex)_1(HexNAc)_1(Deoxihexose)_1(NeuAc)_1(NeuGc)_1 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
						$(Hex)_3(HexNAc)_2(Deoxihexose)_1(NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
3	1317.96	3	3907.88	3823.888	-1.07	$(Hex)_3(HexNAc)_2(Deoxihexose)_1(NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
4	1379.84	2	2736.68	2652.315	-0.697	$(Hex)_2(HexNAc)_1(Deoxihexose)_1(NeuAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
5	1399.84	3	4153.52	4069.014	-0.556	$(Hex)_3(HexNAc)_3(Deoxihexose)_1(NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
6	1400.36	2	2777.72	2693.341	-0.683	$(Hex)_1(HexNAc)_2(Deoxihexose)_1(NeuAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
8	1481.8	2	2940.6	2856.414	-0.876	$(Hex)_3(HexNAc)_1(Deoxihexose)_1(NeuAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
9	1502.52	2	2982.04	2897.441	-0.463	$(Hex)_2(HexNAc)_2(Deoxyhexose)_1(NeuAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	LAAO e SVSP ( <i>Calloselasma rhodostoma</i> ) **
10	1567.32	1	1567.32	1480.741	1.516	$(Hex)_4(HexNAc)_2(Deoxihexose)_1$	-	Sim	PLA2 ( <i>Apis mellifera</i> )
11	1595.56	1	1595.56	1510.752	-0.254	$(Hex)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Rico em manose	Sim	<i>B. jararaca</i> <sup>±</sup> **

12	1676.36	1	1676.36	1592.805	-1.307	$(HexNAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	<i>B. jararaca</i> <sup>±</sup>
13	1683.04	2	3343.08	3258.615	-0.597	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_3 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	<i>L-selectina (Homo sapiens)</i>
14	1776.56	2	3530.12	3445.699	-0.641	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
15	1799.6	1	1799.6	1714.851	-0.313	$(Hex)_3 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Rico em manose	Sim	<i>B. jararaca</i> <sup>±</sup>
16	1863.6	2	3704.2	3619.788	-0.65	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	<sup>±</sup> <i>Deinagkistrodon acutus</i>
17				3649.799	-0.981	$(Hex)_3 (HexNAc)_2 (NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$		Não	-
	1878.44	2	3733.88	3649.799	-0.961	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_3 (NeuGc)_1 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
18	***1640.36	3	4875.08	-	-	$(Hex)_3 (HexNAc)_3 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_6 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	<sup>±</sup> <i>Deinagkistrodon acutus</i>
19	***		5324.08	-	-	$(Hex)_4 (HexNAc)_4 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_6 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
20	1520	3	4514	4430.188	-1.25	$(Hex)_3 (HexNAc)_3 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_5 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-

\* Informações referentes ao banco de dados UniCarbKB associado ao programa Glycomod. O cruzamento de informações entre o resultado fornecido pelo programa Glycomod e o banco de dados é feito exclusivamente pela composição dos glicanos, e dessa forma glicanos com diferentes estruturas e mesma composição de monossacarídeo são reconhecidos por uma única entrada no banco de dados.

\*\* As referidas composições apresentam muitas descrições em um variado número de glicoproteínas diferentes e em diferentes organismos que foram omitidas apenas para simplificação da tabela.

\*\*\* O programa Glycomod considera apenas glicanos que contenham no máximo cinco unidades de ácido siálico; a composição dessas estruturas com seis unidades de NeuAc foram confirmadas por espectrometria de massas. O íon de massa 5324.08 só foi identificado na abordagem quantitativa, e o valor inserido para massa do glicano foi estimada.

± Estruturas não depositadas no banco de dados. Referência: Lin *et al.*, 2011, Zelanis *et al.*, 2012.

**Tabela 6.** Lista de N-glicanos identificados no veneno de *B. jararaca*. Os valores de massa e  $\Delta$  (delta) foram determinados pelo programa Glycomod. Abreviações: Hex: hexose, HexNAc: N-acetilhexosamina, NeuAc: ácido siálico, NeuGc: ácido N-glicolilneuramínico, Man: manose, GlcNAc: N-acetilglicosamina.

Nº	m/z	z	z=+1	Massa (Da)	$\Delta$ (Da)	N-glicano	Classe	Banco de dados*	
1	1277.8	2	2532.6	2448.215	-0.68	$(Hex)_1 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
						$(Hex)_2 (HexNAc)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
2	1292.88	2	2562.76	2478.225	-0.53	$(Hex)_1 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_1 (NeuGc)_1 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
3	1318.04	3	3908.12	3823.888	-0.83	$(Hex)_3 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_4 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
4	1379.92	2	2736.84	2652.315	-0.54	$(Hex)_2 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
5	1399.76	3	4153.28	4069.014	-0.8	$(Hex)_3 (HexNAc)_3 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_4 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
6	1400.08	2	2777.72	2693.341	-1.24	$(Hex)_1 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
				2723.352	-0.61	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$		Sim	-
7	1415.4	2	2807.8	2723.352	-0.61	$(Hex)_1 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_1 (NeuGc)_1 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Não	SVSP ( <i>Tropidechis carinatus</i> ) e fator de coagulação**
8	1481.92	2	2940.84	2856.414	-0.64	$(Hex)_3 (HexNAc)_1 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Híbrido	Não	-
9	1502.44	2	2981.88	2897.441	-0.62	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	LAO e SVSP ( <i>Calloselasma rhodostoma</i> )**
10	1567.4	1	1567.4	1480.741	1.596	$(Hex)_4 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1$	-	Sim	PLA2 ( <i>Apis mellifera</i> )
11	1595.40	1	1595.40	1510.752	-0.41	$(Hex)_2 + (Man)_3 (GlcNAc)_2$	Rico em manose	Sim	<i>B. jararaca</i> **±

12	1677.28	1	1677.28	1592.805	-0.59	$(HexNAc)_2 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	<i>B. jararaca</i> <sup>±</sup>
13	1682.96	2	3342.92	3258.615	-0.76	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_3 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	<i>L-selectina (Homo sapiens)</i>
14	1776.48	2	3529.96	3445.699	-0.8	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Sim	-
15	1799.44	1	1799.44	1714.851	-0.47	$(Hex)_3 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Rico em manose	Sim	<i>B. jararaca</i> <sup>±</sup>
16	1863.62	2	3704.24	3619.788	-0.61	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	<sup>±</sup> <i>Deinagkistrodon acutus</i>
17	1878.4	2	3733.8	3649.799	-1.06	$(Hex)_2 (HexNAc)_2 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_3 (NeuGc)_1 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
				3649.799	-1.06	$(Hex)_3 (HexNAc)_2 (NeuAc)_4 + (Man)_3(GlcNAc)_2$		Não	-
18	<sup>***</sup> 1640.28	3	4874.84	-	-	$(Hex)_3 (HexNAc)_3 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_6 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	<sup>±</sup> <i>Deinagkistrodon acutus</i>
19	<sup>***</sup>	-	5324	-	-	$(Hex)_4 (HexNAc)_4 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_6 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-
20	1519.84	3	4513.52	4430.188	-1.73	$(Hex)_3 (HexNAc)_3 (Deoxihexose)_1 (NeuAc)_5 + (Man)_3(GlcNAc)_2$	Complexo	Não	-

\* Informações referentes ao banco de dados UniCarbKB associado ao programa Glycomod. O cruzamento de informações entre o resultado fornecido pelo programa Glycomod e o banco de dados é feita exclusivamente pela composição dos glicanos, e dessa forma glicanos com diferentes estruturas e mesma composição de monossacarídeo são reconhecidos por uma única entrada no banco de dados.

\*\* As referidas composições apresentam muitas descrições em um variado número de glicoproteínas diferentes e em diferentes organismos que foram omitidas apenas para simplificação da tabela.

\*\*\* O programa Glycomod considera apenas glicanos que contenham no máximo cinco unidades de ácido siálico, a composição dessas estruturas com seis unidades de NeuAc foram confirmadas por espectrometria de massas. O íon de massa 5324 Da só foi identificado na abordagem quantitativa, e o valor inserido para massa do glicano foi estimada.

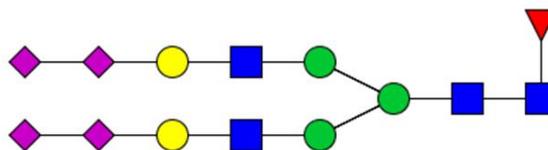
± Estruturas não depositadas no banco de dados. Referência: Lin *et al.*, 2011, Zelanis *et al.*, 2012.

O processo de fragmentação de carboidratos permitidos por CID (*collision-induced dissociation*) favorece a formação de íons da série b/y (Ashline *et al.*, 2005), que são fontes de informação para a avaliação topológica estrutural. Entretanto, a fragmentação dos íons b gera os íons da série a e x, que são importantes para a definição das ligações entre as unidades de monossacarídeos.

A análise de glicanos por espectrometria de massas apresenta inúmeras vantagens, tais como alta sensibilidade e especificidade, mas sua capacidade de caracterizar completamente uma estrutura de glicano ainda apresenta desafios que estão relacionados às características singulares dos polímeros de carboidratos (ramificação e isomeria). A distinção entre os anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  e a identificação de epímeros são caracterizações desafiadoras uma vez que não há diferença de massa entre os componentes que se deseja distinguir. Muitos esforços têm sido encorajados no sentido de caracterizar diferentes vias de fragmentação entre anômeros e, dessa forma, permitir que estes sejam diferenciados por meio da comparação de espectros de massas, entretanto, até o momento, nenhum padrão foi estabelecido (Ashline *et al.*, 2005).

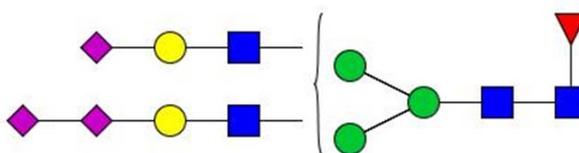
Deixando de lado os anômeros envolvidos em cada ligação ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), os esforços deste estudo se concentraram na tentativa de resolver as posições das ligações entre os monossacarídeos das antenas dos glicanos. Como exemplos serão mostradas as considerações e análises para definição das ligações entre os monossacarídeos encontrados nas antenas dos N-glicanos de número 13 e 16 (Tabela4; Figura 31).

16



m/z 1863 – massa: 3704 Da

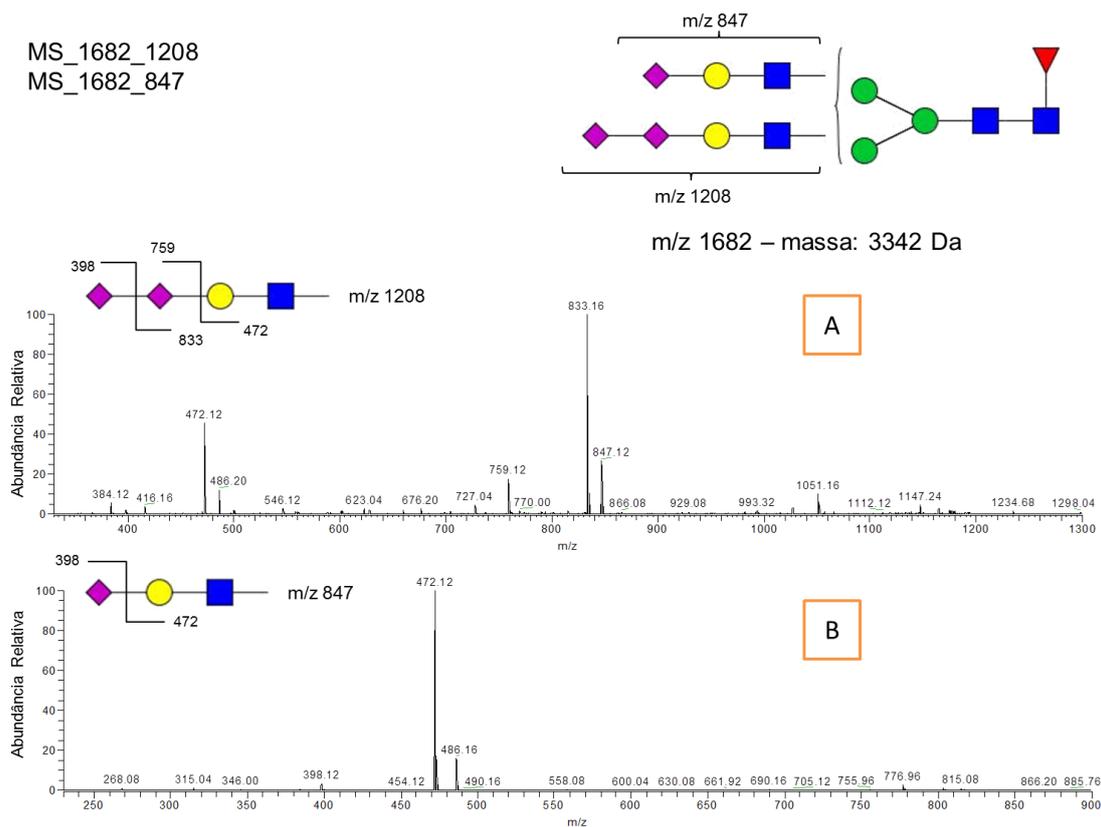
13



m/z 1682 – massa: 3342 Da

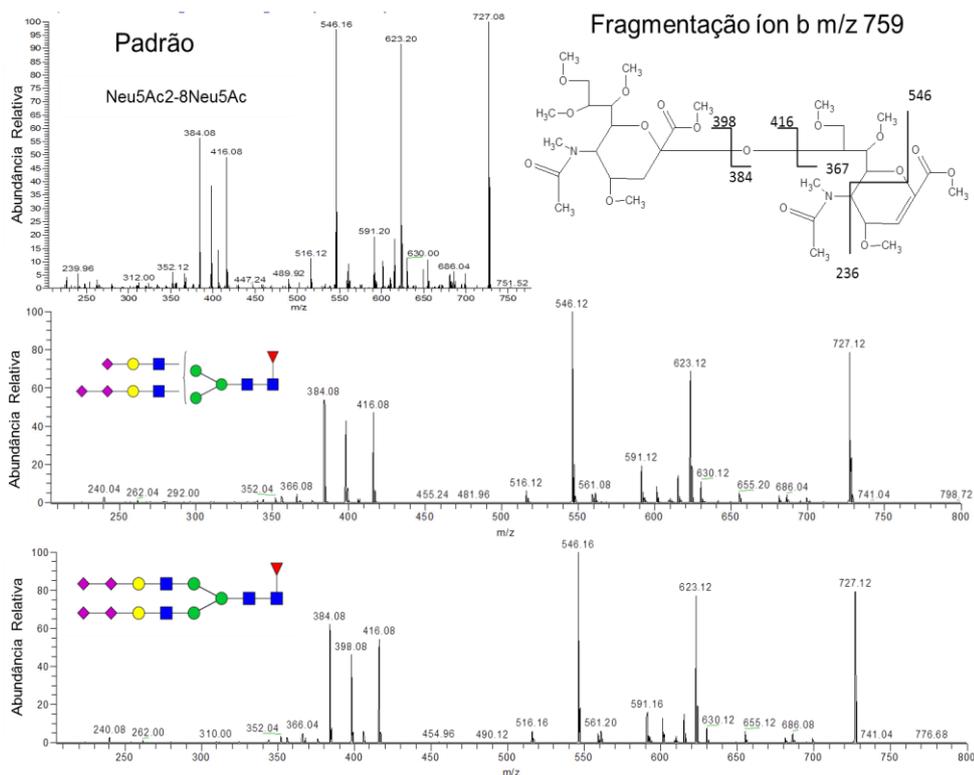
**Figura 31.** Topologias das estruturas de N-glicanos de número 13 e 16 encontradas nos venenos do grupo Jararaca.

A primeira etapa dessa análise incluiu a fragmentação das antenas, no caso da estrutura 16 foi ilustrada no painel A da Figura 30. Diferentemente desta estrutura, a estrutura 13 apresenta duas antenas diferentes, e não é possível distinguir a qual braço do N-glicano (braço 6 ou braço 3) cada uma estava previamente ligada, dessa forma as estruturas das antenas são mostradas após colchetes. A Figura 32 ilustra a fragmentação dos íons b das duas antenas encontradas no N-glicano 13.



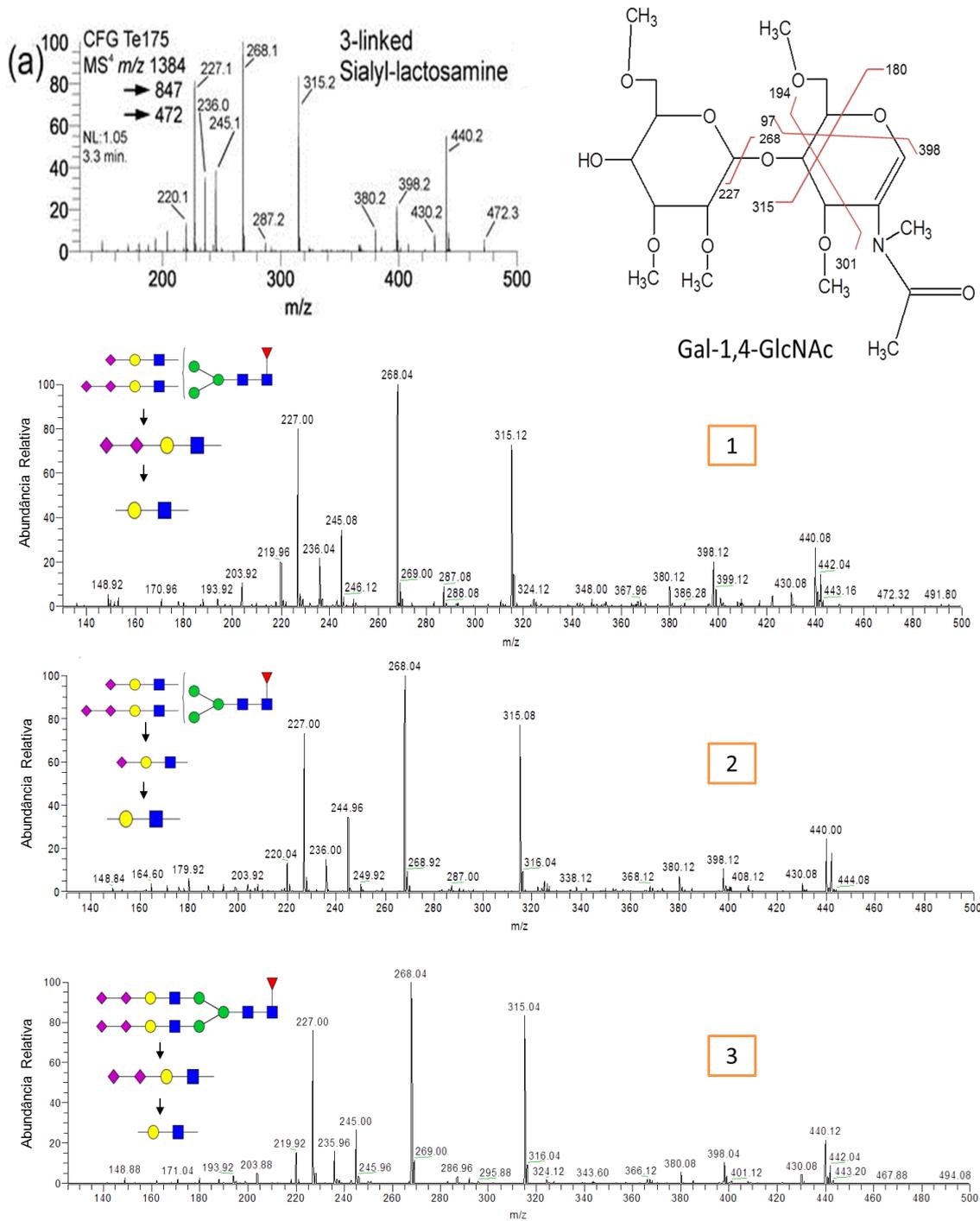
**Figura 32.** Espectros de massas das antenas encontradas no N-glicano de massa 3342 Da, encontrado nos três venenos do grupo Jararaca. Painel A contém o espectro de MS3 da antena de m/z 1208. Painel B contém o espectro de MS3 da antena de m/z 847.

A comparação entre a fragmentação da antena de m/z 1208 do N-glicano 16 (Figura 30, Painel A) e a fragmentação do mesmo íon encontrado no N-glicano 13 (Figura 32, Painel A) sugere que estas são iguais nas duas estruturas. A presença do dímero de ácido siálico também foi analisada nas duas estruturas (Figura 33) e a comparação com um modelo (NeuAc-2,8-NeuAc) fornecido pelo Dr. David Ashline (Glycomics Center, University of New Hampshire) levou à conclusão que a ligação entre os monômeros dos dímeros é a mesma em ambas as estruturas e que o padrão de fragmentação é muito semelhante ao observado na análise do modelo (Figura 33).



**Figura 33.** Comparação entre os espectros de massa ( $MS^3$ ) dos dímeros de ácido siálico encontrados nos N-glicanos 13 e 16 e o padrão NeuAc-2,8-NeuAc.

Após a determinação da ligação entre as unidades de ácido siálico encontradas na extremidade não redutora destes N-glicanos como sendo NeuAc-2,8-NeuAc, faltava a determinação das ligações envolvidas entre os monossacarídeos das unidades de lactosamina (Gal-GlcNAc) e entre a lactosamina e o dímero de ácidos siálicos. Para estas caracterizações os íons de  $m/z$  472 observados nos espectros de  $MS^3$  da Figura 33 foram fragmentados (Figura 34) e comparados com os espectros de fragmentação de lactosaminas contendo ácido siálico, disponíveis no artigo de Ashline *et al.* (2014).



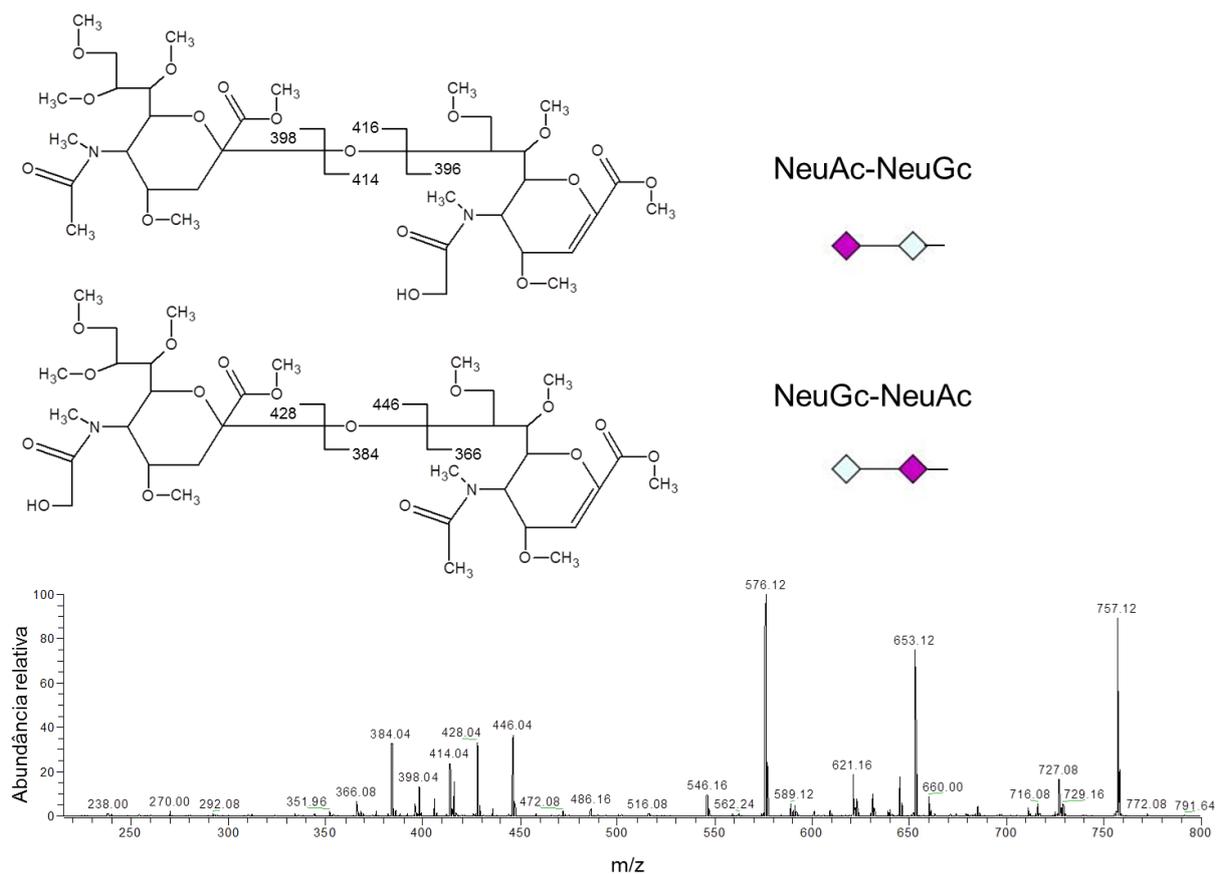
**Figura 34.** Análise das posições das ligações envolvidas entre as unidades de ácido siálico e as unidades de lactosamina das antenas dos N-glicanos. O item a contém o padrão para a ligação NeuAc-2,3-Gal-1,4-GlcNAc descrito por Ashline et al. (2014). O espectro de massas 1 se refere a fragmentação do íon 472 proveniente da fragmentação do íon de m/z 1208 do N-glicano nº13. O espectro de massa 2 se refere a fragmentação do íon 472 proveniente da fragmentação do íon de m/z 847 do N-glicano nº13 (Tabela 4). O espectro de massas 3 se refere à fragmentação do íon e m/z 1208 do N-glicano nº16 (Tabela 4). No canto esquerdo de cada espectro é mostrada a via de fragmentação para a análise do íon 472.

Dessa forma concluiu-se que o N-glicano nº16 apresenta duas antenas de estrutura NeuAc-2,8-NeuAc-2,3-Gal-1,4-GlcNAc, e o N-glicano nº13 apresenta uma antena NeuAc-2,8-NeuAc-2,3-Gal-1,4-GlcNAc e outra antena NeuAc-2,3-Gal-1,4-GlcNAc.

O mesmo procedimento foi realizado para a identificação das outras estruturas, e em todas as análises dos três venenos do grupo Jararaca, o resultado foi o mesmo, e indicou a presença do dímero de ácido siálico na posição 2,8, e a ligação desta estrutura com a lactosamina na posição 2,3.

Embora inicialmente a consideração da ausência de NeuGc tenha sido feita, durante a análise de MS<sup>n</sup> três estruturas (2, 7 e 17) apresentavam controvérsias entre as massas observadas e as composições putativas sugeridas pelo programa Glycomod. Uma análise mais apurada dos espectros de MS<sup>2</sup> destas revelou a presença de um íon de m/z 789, que corresponde à presença de NeuGc nos dímeros de ácido siálico, em todas elas. Dessa forma, os íons que não concordavam com a composição sem NeuGc foram explicados pelas composições contendo NeuGc. A explicação para essa ocorrência é a existência de isóbaros entre as estruturas de N-glicanos.

Isóbaros são estruturas que apresentam a mesma massa, mas que diferem quanto à sua composição. A Figura 35 apresenta o espectro de massas do íon b m/z 789 presente nas três estruturas que contém NeuGc.



**Figura 35.** Espectro de massas da fragmentação do íon b m/z 789 que corresponde ao dímero de ácido siálico contendo uma unidade de NeuGc. As massas observadas são explicadas pela presença de dois tipos de dímeros, um onde o NeuAc é o monossacarídeo terminal e outro onde o NeuGc é o monossacarídeo terminal.

Este é o primeiro registro da ocorrência de NeuGc em uma glicoproteína de veneno de serpente. As informações dos espectros de MS<sup>3</sup> (Figura 35) mostra que não apenas o NeuGc está presente nas amostras, mas também dois tipos de dímeros de ácido siálico contendo NeuGc, que diferem na posição em que o NeuGc se encontra. Os íons de m/z 398 e 384 correspondem à NeuAc na extremidade da antena e na penúltima posição respectivamente, enquanto que os íons m/z 428 e m/z 414 que representam NeuGc na extremidade e na penúltima posição respectivamente.

#### 4.5.2. Análise Quantitativa

Uma vez que diferenças qualitativas significativas não foram observadas, as análises do N-glicoma dos venenos do grupo Jararaca se voltaram para a verificação de diferenças quantitativas utilizando 10% do material inicial para a técnica de LC-MS. Como método de separação, foi empregada uma resina de interação hidrofílica, que separa as estruturas com base na massa molecular de cada uma. O conhecimento prévio das estruturas (proveniente da análise qualitativa) permitiu que a massa de cada N-glicano marcado com 2AA (ácido aminobenzóico) fosse calculada e as áreas referentes a cada pico cromatográfico calculadas. O método de detecção de fluorescência permite acompanhar a eluição dos N-glicanos no espectro de massas, mas devido à carga negativa do composto utilizado para marcação (2AA) a análise foi realizada no modo negativo.

A Figura 36 mostra o perfil cromatográfico dos N-glicanos marcados com 2AA e a Tabela 7 contém os valores de massa observados para cada N-glicano e suas respectivas áreas normalizadas nos três venenos.

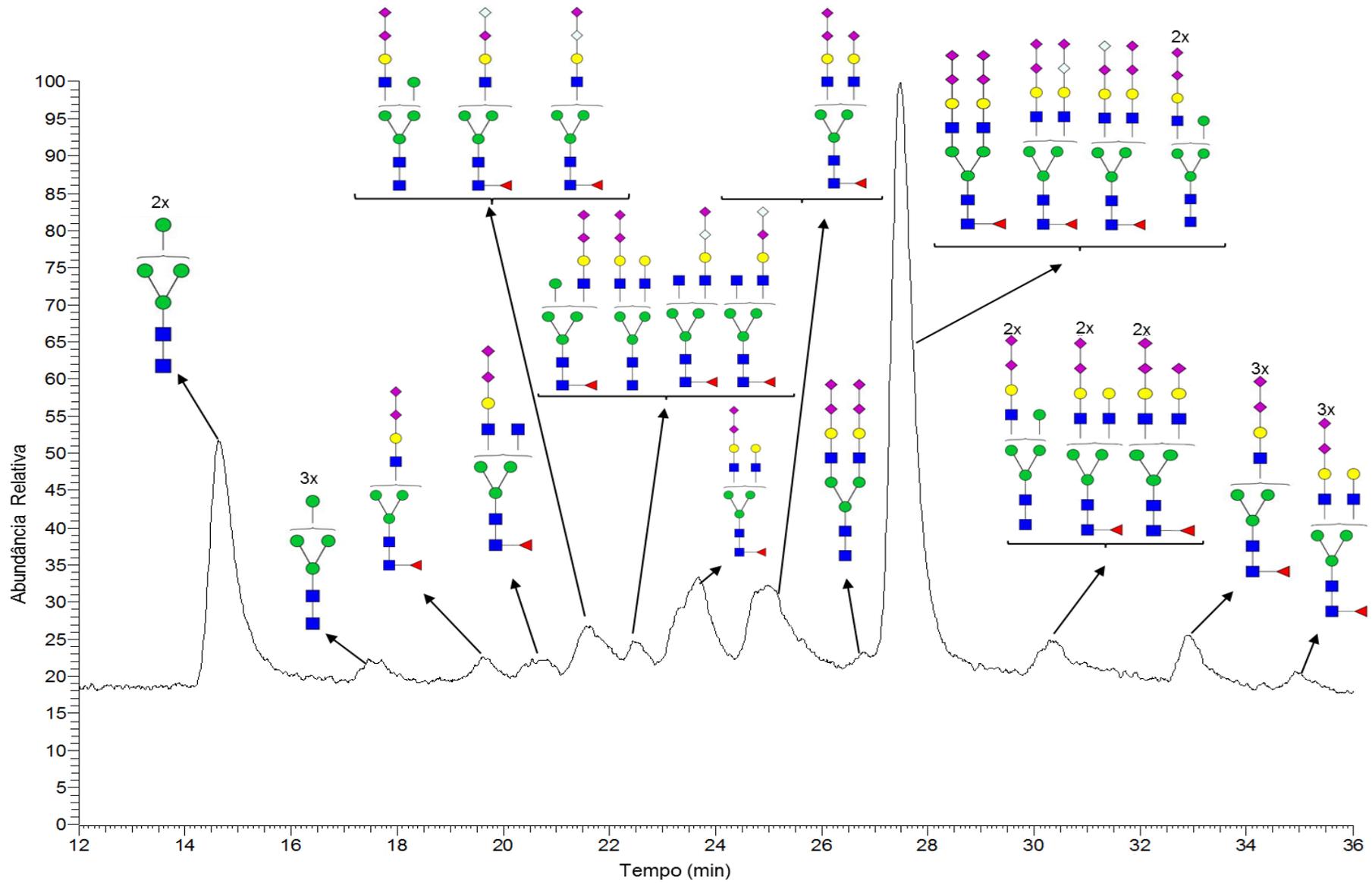
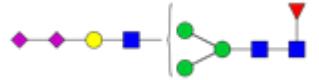
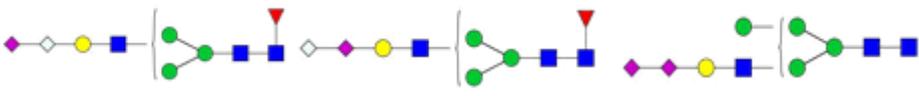
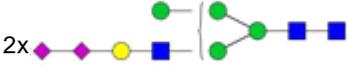
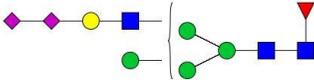
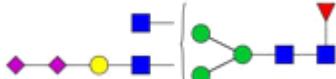
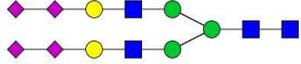
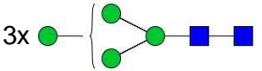
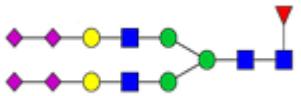
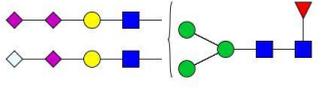
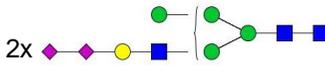
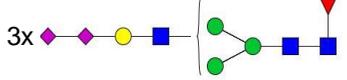
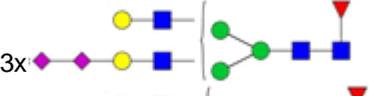
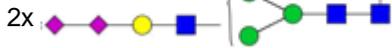


Figura 36. Cromatograma de íons de N-glicanos do veneno de *B. alcatraz* por LC-MS.

**Tabela 7.** Valores observados na análise de LC-MS dos N-glicanos liberados das glicoproteínas presentes nos venenos do grupo Jararaca. Os valores de área normalizada correspondem à divisão dos valores de área obtidos no *extracted ion chromatogram* para cada íon analisado pela área total de todos os picos presentes em cada amostra.

Nº	Modo Negativo			N-glicanos	Área normalizada		
	m/z	z	z=-1		<i>B. alcatraz</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>B. insularis</i>
1	1061.34	2	2123.68		0.014531555	0.027369445	0.016959511
2	1069.34	2	2139.68		0.001372762	0.001569032	0.00293996
3	1615.85	2	3232.7	2x 	0.001737577	0.001430909	0.001550635
4	1142.34	2	2285.68		0.014532173	0.017792465	0.022179733
5	1717.35	2	3435.7	2x 	0.028129932	0.035881612	0.032646372
6	1162.84	2	2326.68		0.030529082	0.044146544	0.018144769

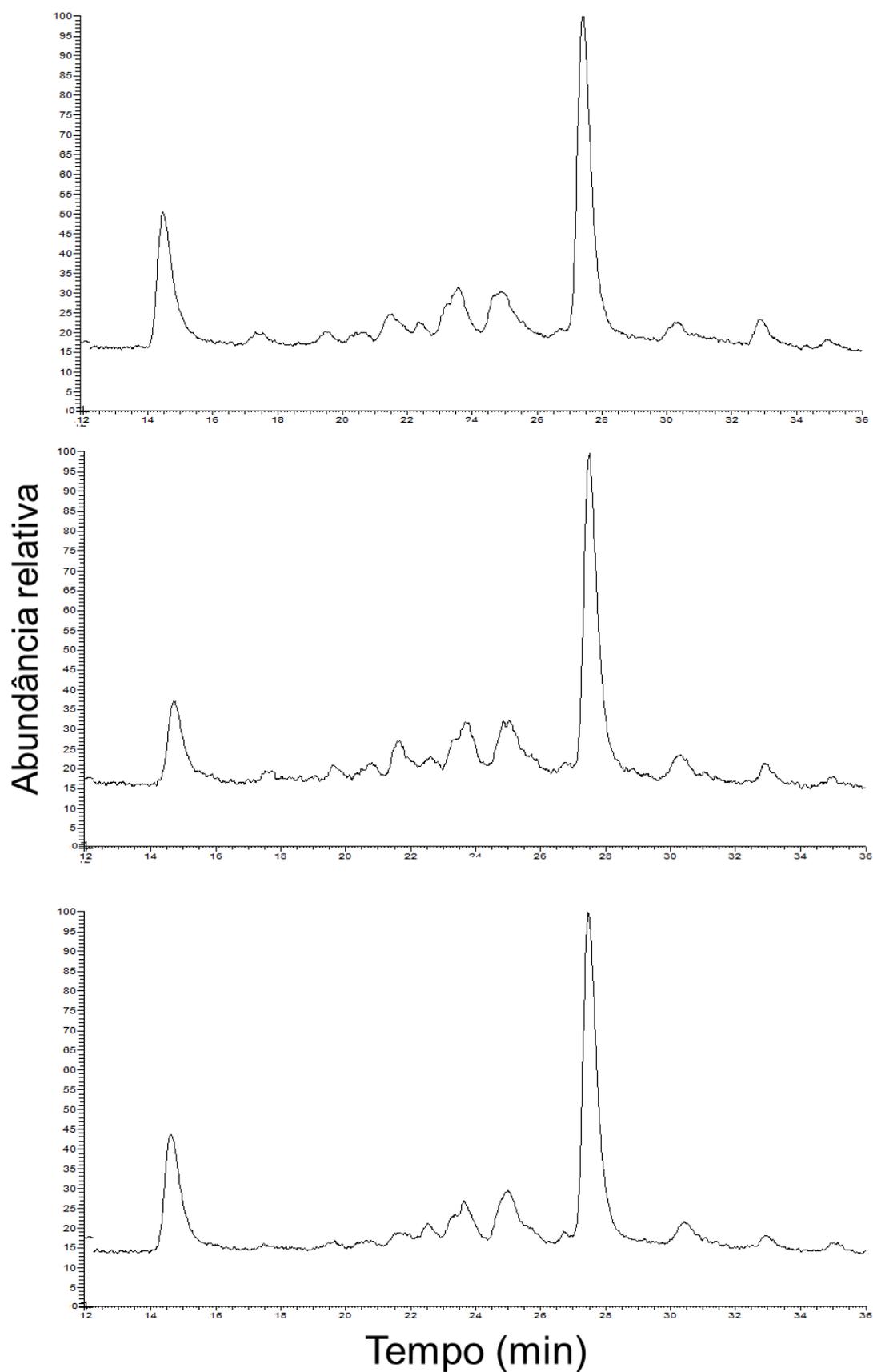
7	1170.84	2	2342.68		0.002127469	0.001902359	0.00315357
8	1223.34	2	2447.68		0.009615893	0.016748675	0.01456822
9	1243.84	2	2488.68		0.085373051	0.079989514	0.08510437
10	-	-	-		-	-	-
11	1354.34	1	1354.34		0.214209441	0.129397994	0.192262314
12	-	-	-		-	-	-
13	1389.34	2	2779.68		0.080777296	0.084657734	0.090960202

14	1461.84	2	2924.68		0.013070213	0.010894667	0.015450502
15	1516.34	1	1516.34		0.013250923	0.011225997	0.005721167
16	1534.84	2	3070.68		0.369034097	0.385616395	0.397946131
17	1545.85	2	3092.7		0.071008085	0.064740692	0.065664595
							
18	1338.68	3	4018.04		0.030867971	0.024245827	0.021441224
19	1460.34	3	4383.02		0.013551	0.01408946	0.011626002
20	1241.67	3	3727.01		0.00628148	0.048300679	0.004834294
Total					1	1	1

As estruturas sem valores representam N-glicanos que só foram identificados na análise qualitativa.

A visualização dos perfis de N-glicanos nos três venenos do grupo Jararaca pela análise qualitativa (Figura 26) já indicava uma grande similaridade entre os N-glicomas, entretanto foi pela análise quantitativa que a elevada similaridade pode ser visualizada de forma mais clara. Resumidamente, os três N-glicomas partilham das mesmas estruturas e estas apresentam a mesma abundância relativa. Embora a análise qualitativa tenha indicado a ausência da estrutura 7 (Tabela 5) no veneno de *B. insularis*, a abordagem quantitativa mostrou que ela está presente neste veneno, e em abundância similar à observada nos demais venenos analisados.

A Figura 37 ilustra os perfis cromatográficos obtidos pela análise quantitativa por LC-MS dos N-glicomas dos venenos do grupo Jararaca.



**Figura 37.** Comparação entre os perfis cromatográficos dos N-glicanos encontrados nos venenos do grupo Jararaca. Colocar os dados da cromatografia

Embora a Figura 36 ilustre apenas o perfil obtido na análise da amostra de *B. alcatraz*, a Figura 37 contém o alinhamento dos perfis das três venenos, e ilustra que não há diferenças significativas entre eles.

As abundâncias relativas foram determinadas por meio da divisão da área obtida pelo *extracted ion chromatography*, utilizando o intervalo de  $m/z$  que compreende o pacote isotópico de cada estrutura, pela soma das áreas de todas as estruturas identificadas. Desta forma a abundância das estruturas de glicanos (contida na Tabela 7) foi considerada em termos de % após a normalização dos dados, conforme descrito por Gbormittah *et al.* (2014).

## 5. Discussão

### 5.1. Proteomas dos venenos do grupo Jararaca

No primeiro estudo sobre o veneno de *B. alcatraz* foram caracterizadas algumas atividades biológicas (DL50, dose mínima hemorrágica, dose mínima coagulante e atividade caseinolítica) e foram relatadas algumas diferenças entre este e o veneno de *B. jararaca*, de espécimes adultos, sendo a principal destas a atividade coagulante do plasma humano, que é cerca de dez vezes mais alta no veneno de *B. alcatraz* (Furtado, 2005)

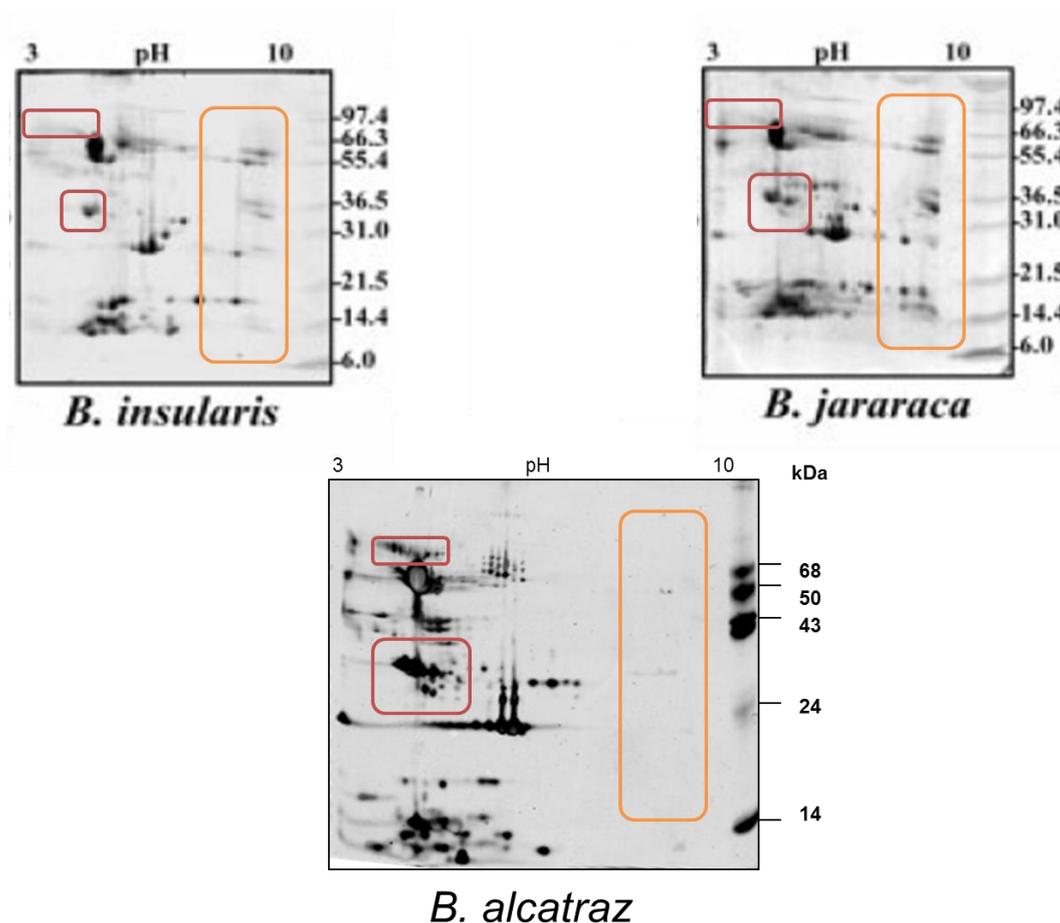
Desde sua descrição em 2002, a espécie *B. alcatraz* é referida como similar a indivíduos juvenis de *B. jararaca*, por seus caracteres morfológicos (tamanho menor) e pela dieta, composta por pequenos animais (Marques *et al.*, 2002). A elevada atividade coagulante de seu veneno mostra um paralelo com a atividade coagulante do veneno de filhotes de *B. jararaca*, que é cerca de dez vezes mais alta do que no veneno de adultos (Zelanis *et al.*, 2010). Furtado (2005) concluiu que as elevadas atividades proteolítica e coagulante do veneno de *B. alcatraz* podem ser uma resposta adaptativa à restrita dieta a qual esta espécie é submetida ao longo de toda a vida.

Desta forma, considerando estes dados, no presente estudo buscou-se, primeiramente, comparar os perfis eletroforéticos do veneno de *B. alcatraz* com os venenos de *B. jararaca* (adulto e filhote) e o veneno de *B. insularis* (adulto) por eletroforese. O perfil eletroforético do veneno de *B. alcatraz* difere daquele dos venenos de *B. jararaca* (adulto e filhote) tanto em condições redutoras como não redutoras, sendo que nesta última as diferenças são mais evidentes (Figura 8).

A maior disponibilidade de venenos de indivíduos adultos dirigiu as análises subsequentes para uma avaliação da composição dos venenos do grupo Jararaca

(*B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca*) com um olhar sobre as diferenças que poderiam ser avaliadas por metodologias analíticas. Este interesse no grupo Jararaca é reflexo do excelente modelo que estes animais representam para a análise da relação veneno e dieta na evolução das serpentes.

A avaliação do veneno de *B. alcatraz* por eletroforese bidimensional permitiu uma visualização mais detalhada em seu perfil de proteínas. Como resultado principal desta análise houve a visualização de spots diferenciais entre as amostras de veneno coletadas no Instituto Butantan, na presença e na ausência de inibidores de proteinases, sugerindo que os spots diferenciais foram gerados por atividade proteolítica (Figura 10). Estes resultados corroboram um estudo anterior de nosso grupo que mostrou que algumas proteínas dos venenos de *Bothrops* são susceptíveis à hidrólise durante o processo de preparação e análise por espectrometria de massas, como mostrado pela análise do peptidoma (Tashima *et al.*, 2012), enquanto que no presente estudo, é mostrado pela primeira vez este efeito no perfil eletroforético bidimensional do veneno. Por separar as proteínas de uma mistura de acordo com o ponto isoelétrico e massa molecular, a eletroforese bidimensional permite a visualização mais ampla de diferenças entre proteomas. A comparação dos perfis de proteínas do veneno de *B. alcatraz* por eletroforese bidimensional, com aqueles de *B. jararaca* e *B. insularis*, evidencia mais diferenças do que havia sido observado pela eletroforese unidimensional (Figura 38).



**Figura 38.** Análise comparativa dos venenos do grupo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. alcatraz*) por eletroforese bidimensional. Os perfis de *B. jararaca* e *B. insularis* são provenientes do trabalho de Paes-Leme *et al.* (2009). Os retângulos em vermelho delimitam as regiões de massa molecular e *pI* em que um maior número de spots são visualizados na amostra de *B. alcatraz*. Os retângulos em laranja indicam as regiões de massa molecular e *pI* em que um maior número de spots são visualizados nas amostras de *B. insularis* e *B. jararaca*.

Apesar das diferenças observadas entre os perfis eletroforéticos dos venenos do grupo Jararaca, o padrão de distribuição de *spots* segue aquele observado em outras análises de venenos do gênero *Bothrops* (Paes-Leme *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2009; Zelanis *et al.*, 2011). Este padrão pode ser descrito como presença de um maior número de spots na região de *pI* entre 4 e 7, e massas moleculares entre 20 kDa e 70 kDa e abaixo de 14 kDa.

Apesar das diferenças de perfil eletroforético, observadas entre os três venenos do grupo Jararaca, a análise qualitativa da distribuição dos grupos de proteínas identificados, pela análise dos venenos por digestão com tripsina e LC-MS/MS, entre as classes de toxinas (Figura 12), mostrou que estes apresentam

composição semelhante entre si, indicando que as diferenças observadas nos perfis eletroforéticos podem ser reflexo de um número diferente de proteoformas de toxinas, que podem diferir, principalmente quanto ao grau de glicosilação.

A metodologia de análise proteômica quantitativa *label free* empregada neste trabalho teve como objetivo a avaliação mais profunda dos proteomas dos venenos do grupo Jararaca, para procurar explicar as diferenças entre as atividades biológicas destes venenos, já que a análise qualitativa não mostrou diferenças significativas entre eles.

A comparação entre os venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca* (Figura 13) revelou que o primeiro apresenta maior abundância de metaloproteinases e fosfolipases A2. No caso das SVMPs, por exemplo, o grupo de proteínas cuja primeira proteína é a E3UJL9, está presente no veneno de *B. alcatraz* em quantidade 11 vezes mais alta do que no veneno de *B. jararaca*. Já a classe das fosfolipases A2 apresenta abundância entre 2 e 3 vezes mais alta no veneno de *B. alcatraz*.

A comparação da atividade fosfolipásica por Narvaes (2007) entre os venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca* mostrou que o primeiro apresenta maior atividade do que o segundo, e o resultado do presente estudo corrobora esta informação, já que foram encontradas estas diferenças quantitativas entre o conteúdo de fosfolipases A2 destes venenos. A atividade fosfolipásica do veneno de *B. alcatraz* foi também avaliada por Moraes *et al.* (2012) e associada à atividade miotóxica do mesmo. A elevada proporção de SVMPs no veneno de *B. alcatraz* e sua elevada atividade coagulante, similar a do veneno de filhotes de *B. jararaca*, sugere que esta classe de toxinas seja a responsável por tal efeito proeminente em *B. alcatraz*. Esta observação é condizente com o trabalhos de Zelanis *et al.* (2010, 2011), que

demonstraram que o veneno de filhotes de *B. jararaca* apresenta maior conteúdo de SVMPs e que estas são os componentes responsáveis pela atividade coagulante do veneno, principalmente aquele gerada pela ativação dos fatores II e X da coagulação.

A comparação entre os venenos de *B. insularis* e *B. jararaca* (Figura 14) mostra que um menor número de proteínas foi considerado estatisticamente significativo entre estas amostras, mostrando por outra abordagem a maior semelhança entre estes dois venenos, do que com o veneno de *B. alcatraz*. Neste caso as diferenças encontradas entre os venenos residem na maior proporção de algumas metaloproteínases no veneno de *B. insularis*, entretanto essa diferença se mostra menos acentuada do que no caso da comparação entre *B. jararaca* e *B. alcatraz*.

Já a comparação entre *B. alcatraz* e *B. insularis* (Figura 15) revelou que estes venenos apresentam diferenças quantitativas de grupos de proteínas da classe das lectinas tipo-C, que são mais abundantes em *B. insularis*. As fosfolipases A2 e metaloproteínases estão presentes em maior abundância no veneno de *B. alcatraz*, de forma similar ao que foi verificado pela comparação com o veneno de *B. jararaca*. Considerados em conjunto os resultados da análise quantitativa mostraram que o veneno de *B. alcatraz*, relativamente aos outros venenos do grupo Jararaca apresenta maior abundância de metaloproteínases e fosfolipases A2 e menor abundância de lectinas tipo-C e serinoproteínases.

## **5.2. N-terminoma**

### **5.2.1. Modificações do N-terminal**

Os venenos de serpentes são misturas complexas que têm como principais componentes elementos de origem proteica que são reconhecidos como os agentes responsáveis pelas características observadas em casos de envenenamento. Tal complexidade advém principalmente do grande número de proteoformas de toxinas existentes, que apresentam substituições de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, além de modificações pós-traducionais.

Estudos de processamentos de mRNAs e modificações pós-traducionais já mostraram que o paradigma “um gene um polipeptídeo” é incorreto, pois a partir de uma única sequência de DNA múltiplos produtos proteicos podem ser formados (Gooley e Parcker, 1997).

Ainda que os venenos sejam alvos de estudos há anos por diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo, a quantidade de sequências disponíveis no banco de dados de proteínas até o momento ainda não fornece informações suficientemente detalhadas sobre diversos aspectos de seus componentes, como modificações co-traducionais e pós-traducionais, e este fato resulta na ausência de uma anotação verdadeiramente funcional do proteoma de venenos de serpentes. Outro importante ponto que ainda não foi esclarecido sobre venenos é o processamento dos zimogênios de proteases e de proteínas precursoras de peptídeos biologicamente ativos, que permanece pouco estudado.

Um dos pontos importantes no processo de anotação funcional de um proteoma é a caracterização dos N-terminais de seus componentes, que pode fornecer informações sobre a localização subcelular, modificações co-traducionais ou pós-traducionais e indicações sobre o tempo de meia-vida das proteínas (Mogk e Bukau, 2010). Estudos envolvendo a análise de N-terminais de proteínas já permitiram inclusive o estabelecimento da denominada Regra do N-terminal (N-end

rule, em inglês) (Bachmair *et al.*, 1986). A *N-end rule* divide os aminoácidos nas categorias de estabilizantes e desestabilizantes, permitindo avaliar estimativas da meia vida de proteínas. Essa regra se mostrou conservada desde eubactérias até seres humanos (Mogk e Bukau, 2010).

Na categoria de modificações co-traducionais as mais conhecidas são a acetilação do N-terminal e a remoção do resíduo de metionina da posição 1 da proteína nascente (Polevoda e Sherman, 2000), enquanto que na análise de modificações pós-traducionais pode-se avaliar se há sítios importantes de clivagem ou domínios essenciais para atividade biológica, ou aminoácidos modificados na porção N-terminal. Logo, o conhecimento da porção N-terminal de uma proteína permite a avaliação de importantes características funcionais de uma proteína.

Neste trabalho, utilizamos o veneno “fresco” de *B. alcatraz* (isto é, não submetido à liofilização, e extraído na presença de inibidores das principais classes de proteases de serpentes, e mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) para uma análise de N-terminais naturais nele presentes, e suas possíveis modificações co-traducionais e pós-traducionais. Até o momento não encontramos nenhum estudo em que tenham sido utilizadas abordagens de enriquecimento de N-terminais naturais de venenos de serpente, de forma que este trabalho buscou contribuir com a descrição dos N-terminais naturais que são encontrados no veneno de *B. alcatraz*. O termo N-terminal natural é utilizado porque no banco de dados disponível, muitos transcritos de toxinas anotados apresentam uma análise bioinformática de sua estrutura primária, para predição de domínios e processamentos posteriores à tradução. Todavia, tais informações são virtuais, já que na maior parte dos casos não apresentam validação experimental.

Sobre estes dados, a observação mais importante deste estudo é o fato de que a grande maioria dos N-terminais de toxinas de *B. alcatraz* não apresentavam modificação alguma no resíduo N-terminal, já que foram alvos da reação de dimetilação. Para tal análise foram considerados todos os N-terminais modificados, independentemente do fato do peptídeo corresponder ou não à posição 1 das proteínas maduras. Estes resultados concordam com o estudo de Forte *et al.* (2011), onde foi demonstrado que acetilação de N-terminais de proteínas inibe a transferência destas para o retículo endoplasmático rugoso (REG), que é via obrigatória para proteínas secretadas.

A acetilação do N-terminal de proteínas é um evento irreversível e comum em eucarióticos (Mogk e Bukau, 2010, Hwang *et al.*, 2010, Forte *et al.*, 2011), que ocorre durante o processo de tradução e é catalisado por N-terminal acetil transferases (NATs) utilizando acetil Coenzima A como doador do grupo acetil (Arnesen, 2011). O significado biológico dessa proeminente modificação co-traducional em proteínas celulares é cercado de controvérsias até mesmo nos dias atuais (Arnesen, 2011, Mogk e Bukau, 2010). A alta prevalência (50-80% das proteínas eucarióticas são acetiladas) (Forte *et al.*, 2011) fornece indícios de que tal modificação possui uma função muito importante para a célula, entretanto, a definição precisa da vantagem da manutenção desse processo em seres vivos e suas implicações não são bem conhecidas.

Nos vários estudos sobre a acetilação de N-terminais foram relatados diferentes significados para tal modificação covalente. Estudos iniciais indicavam que a acetilação do N-terminal era um mecanismo de proteção contra proteólise e que fornecia maior estabilidade para a proteína *in vivo*. Essa observação pode ser explicada pelo fato da acetilação do N-terminal impedir o mecanismo de

ubiquitinação do N-terminal e, portanto, impedir a degradação proteica por este mecanismo (Arsenen, 2011).

Estudos posteriores mostraram alguma correlação entre o processo de acetilação e a atividade proteica para algumas poucas proteínas e em uma aparente contradição mostraram que a acetilação pode representar um sinal para a degradação (Mogk e Bukau, 2010, Arsenen, 2011). Outro ponto discutido é a alta frequência da acetilação em eucariotos e uma possível atuação como controle do *turn over* de proteínas, em que a acetilação ocorre na grande maioria das proteínas, mas apenas aquelas cujo *folding* foi inadequado terão a acetilação exposta e, nesse caso, serão encaminhadas à degradação (Mogk e Bukau, 2010).

O trabalho de Forte *et al.* (2011) mostrou que a acetilação do resíduo N-terminal inibe o endereçamento de proteínas secretadas para o REG. No trabalho foram realizadas mutações no peptídeo sinal de proteínas secretadas que levaram à acetilação do N-terminal e manutenção destas proteínas mutadas no citosol indicando que quando há a acetilação as proteínas, estas não são enviadas para o REG mesmo na presença do peptídeo sinal. Desta forma, embora a análise inicial dos N-terminais identificados no veneno de *B. alcatraz* tenha revelado dois peptídeos acetilados, estes não foram validados para as considerações finais, visto que não foram identificados nas duas réplicas experimentais realizadas. A ausência de N-terminais acetilados nas proteínas do veneno de *B. alcatraz* é explicada pelo fato de que estas proteínas seguem a via de secreção, o que as condiciona a não apresentarem acetilações no N-terminal..

A presença de ácido piroglutâmico na extremidade N-terminal é uma modificação pós-traducional encontrada em muitas proteínas secretadas e cuja catálise é realizada pela glutaminil ciclase (Sykes *et al.*, 1999). A ciclização do N-

terminal de proteínas é um processo presente em muitas proteínas ativas (12,3% das proteínas com peptídeo sinal) (Liao *et al.*, 2003) e está presente em neuropeptídios, hormônios e citocinas (Huang *et al.*, 2005). A função desta modificação está relacionada com a proteção da porção N-terminal da ação de exopeptidases e/ou para prover a conformação proteica necessária para interação com receptores (Van Coillie *et al.*, 1998; Hinke *et al.*, 2000).

A identificação de toxinas com ácido piroglutâmico como resíduo N-terminal não é algo incomum, e para a classe dos BPPs esta é uma característica estrutural (Ferreira e Rocha e Silva, 1965; Camargo *et al.*, 2012). Takeya *et al.* (1989) descreveram a presença desta modificação em uma metaloproteinase de *Trimeresurus flavoviridis* e Aird *et al.* (1990) a descreveram na crotoxina, de *Crotalus durissus terrificus*. No presente estudo mostramos que a característica mais frequente dos N-terminais de proteínas do veneno de *B. alcatraz* é a ausência de modificações no primeiro resíduo das cadeias polipeptídicas, entretanto, alguns peptídeos provenientes do domínio disintegrina de SVMPS, o N-terminal de SVSPs e um peptídeo interno de svVEGF e CRISP foram identificados com um resíduo de ácido piroglutâmico no N-terminal. A identificação de glutaminil ciclases em venenos de serpentes (Pawlak e Kini, 2006) pode ser a explicação para a presença destas modificações, que podem ser necessárias pelo alto conteúdo de proteases nos venenos..

### **5.2.2. N-Terminais de SVSPs**

As serinoproteases de venenos de serpentes (SVSPs) são uma importante classe de enzimas envolvidas em diversos aspectos da patologia de envenenamentos por serpentes. Um dos mais interessantes aspectos dessa classe

de enzimas proteolíticas é a alta similaridade entre as estruturas primárias, secundárias e terciárias de seus membros, contudo, tal similaridade não se aplica sobre seus substratos naturais, já que enzimas muito similares quanto à estrutura primária apresentam diferentes substratos e interferem em diferentes processos biológicos. Como características gerais da classe podem ser citados seus diferentes níveis de glicosilação, ausência de processamento proteolítico além da remoção do propeptídeo (para conversão do zimogênio em enzima ativa) e a presença da tríade catalítica canônica (histidina, ácido aspártico e serina,) (Serrano e Maroun, 2005).

A análise N-terminômica do veneno de *B. alcatraz* mostrou que dentre os 17 N-terminais clássicos identificados, três correspondem a SVSPs. Destes, dois apresentam dimetilação no resíduo N-terminal, o que significa que no veneno tais extremidades encontram-se livres. Todavia, uma sequência foi identificada nas duas formas, ou seja, com dimetilação e ácido piroglutâmico no N-terminal, indicando que tal modificação também pode ocorrer em SVSPs.

As SVSPs apresentam uma sequência de resíduos de 6 aminoácidos (QKXSEL) que corresponde ao propeptídeo, cuja remoção é necessária para produção da proteína madura. Até hoje não se conhece a protease ou mecanismo responsável pela remoção deste e formação das enzimas ativas (Serrano e Maroun, 2005). No caso da quimotripsina, que é produzida na forma de quimotripsinogênio no pâncreas, este é ativado no estômago pela ação da tripsina. Um fato interessante nesta análise é a observação de dois tipos de N-terminais encontrados para a SVSP (acesso Uniprot T2HS34), na sequência VVGGDECNINEHR a proteína se inicia exatamente após o propeptídeo (QKSSEL) enquanto que na sequência ELVVGGDECNINEHR, dois resíduos do propeptídeo estão inclusos no N-terminal. Segundo a abordagem utilizada neste estudo, não foram encontrados peptídeos

correspondentes à propeptídeos de SVSPs. Dessa forma, não é possível sugerir se no processamento destas o propeptídeo é removido já nas vesículas de secreção das células glandulares ou no lúmen da glândula. Com a presença da enzima ativa no veneno ainda estocado na glândula, a inibição da atividade das SVSPs pode ser efetuada pelo pH levemente ácido do veneno (Odell *et al.*, 1998).

### **5.2.2. N-terminais de SVMPs**

As metaloproteinases estão entre os componentes mais abundantes de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e também são as toxinas que apresentam processamento pós-traducional mais complexo (Fox e Serrano, 2008). Elas são divididas em 3 categorias gerais de acordo com os domínios funcionais presentes e as estruturas dos precursores e suas respectivas formas maduras (Fox e Serrano, 2008). A Figura 39 contém a reprodução da classificação estabelecida com base no processamento dessas proteinases.



ao início do pró-domínio. Entretanto, nenhum peptídeo do N-terminal do domínio proteinase foi identificado. Sobre as modificações encontradas no N-terminal, apenas um peptídeo N-terminal do domínio disintegrina apresentou ácido piroglutâmico, enquanto que todos os demais apresentaram N-terminal bloqueado por dimetilação.

Da mesma forma que na análise das serinoproteinases, os N-terminais encontrados para as metaloproteinases mostraram algumas diferenças quanto ao resíduo de aminoácido encontrado na primeira posição. No caso da proteína P31985, foram encontrados 5 diferentes N-terminais correspondentes à região N-terminal de seu domínio disintegrina (Figura 40).

Sequências N-terminais identificadas	AGEECDGSPANPCCDAATCKLR
	EAGEECDGSPANPCCDAATCKLR
	ECDCGSPANPCCDAATCKLR
	EECDGSPANPCCDAATCKLR
	GEECDGSPANPCCDAATCKLR

**Figura 40.** Diferentes N-terminais identificados no veneno de *B. alcatraz* do domínio disintegrina da proteína P31985.

A identificação de peptídeos do pró-domínio no veneno não é um fato inédito e concorda com o trabalho de outros autores (Valente et al., 2009) que já relataram a presença de peptídeos do pró-domínio no veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, indicando que talvez o processamento das metaloproteinases ocorra no lúmen da glândula e não no REG como proposto inicialmente (Fox e Serrano, 2008). Ainda, da mesma forma que observado na categoria das serinoproteinases, na análise dos N-terminais de metaloproteinases foram encontrados peptídeos oriundos de processamentos alternativos durante a remoção do pró-domínio e dos outros

domínios (disintegrina, metaloprotease). Esta diferença no processamento pode ser resultado da ação de várias proteases diferentes no processamento das proteases do veneno, ou a remoção do pró-domínio seguida pela ação de aminopeptidases.

## 5.6. Peptidoma

A caracterização de venenos de serpentes é frequentemente realizada por abordagens proteômicas e transcriptômicas. Isso ocorre porque a análise do peptidoma enfrenta desafios adicionais àqueles existentes para a análise do proteoma, como a complexidade da busca de espectros de MS/MS sem a especificação de uma protease e o restrito banco de dados disponível (Zelanis *et al.*, 2010; Tashima *et al.*, 2012). Desta forma, embora o conhecimento disponível a respeito do proteoma de venenos de serpentes esteja crescendo a passos largos, a análise do peptidoma avança mais lentamente e informações fundamentais como a proporção destes componentes na amostra e sua complexidade permanecem pouco conhecidas (Tashima *et al.*, 2012). A análise qualitativa do peptidoma do veneno de *B. alcatraz* teve a intenção de avançar no conhecimento do peptidoma de venenos do gênero *Bothrops*.

Os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) foram descobertos no veneno de *B. jararaca*, mas posteriormente sua presença foi descrita em venenos de outros gêneros de serpentes como *Crotalus*, *Lachesis*, *Agkistrodon*, *Trimerisurus* e *Vipera* (ref original). A estrutura da proteína precursora destes peptídeos vasoativos foi descrita por Murayama *et al.* (1997) e compreende 7 BPPs organizados *in tandem*, bem como um peptídeo natriurético tipo-C na região C-terminal, e na porção intermediária uma região rica em histidinas e glicinas (pHpG).

Desde a sua descoberta, estudos foram realizados a fim de se desvendar a relação entre estrutura e atividade biológica dessas moléculas. Um estudo em particular, feito por Chi *et al.* (1985), mostrou que a remoção do resíduo de ácido piroglutâmico do N-terminal aumenta por um fator de 2 a atividade biológica do BPP, enquanto que alterações na região C-terminal da molécula reduzem drasticamente sua atividade. O estudo mostrou que os três resíduos da porção C-terminal de um BPP de *Agkistrodon halys Pallas*, de estrutura <EQGRPPGPPIP, ainda mantém a atividade biológica em 90% da atividade da molécula nativa.

Todavia, outros trabalhos mostram que a identificação do N-terminal contendo ácido piroglutâmico ou o C-terminal rico em prolina não é suficiente para a caracterização de peptídeos como pertencentes à classe dos BPPs. Esta observação foi feita comparando-se as atividades biológicas de novos peptídeos que foram caracterizados como BPPs devido à sua estrutura primária, mas cujas atividades biológicas mostraram resultados contraditórios (Mueller *et al.*, 2005; lanzer *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007; Tashima *et al.*, 2012).

No peptidoma do veneno de *B. alcatraz* foi possível observar a presença de um mesmo tipo de BPP, porém com diferentes extensões, e apresentando estruturas primárias que diferem daquelas canônicas já reportadas, que indicam diferentes processamentos da proteína precursora, variando nas porções N-terminal e C-terminal. Este fato que também foi reportado na análise do peptidoma do veneno da *B. jararaca* (Zelanis *et al.*, 2010; Tashima *et al.*, 2012).

O trabalho de caracterização de um BPP encontrado no veneno de *B. jararacussu* (Rioli *et al.*, 2008), de estrutura primária EARPPHPPIPPAP e denominado BPP-AP ilustra que diferentes C-terminais podem estar envolvidos com diferentes atividades biológicas. A caracterização da atividade biológica desse BPP

com C-terminal diferente foi feita utilizando microcirculação muscular e dérmica para avaliação do efeito local. Enquanto o BPP 11e (de sequência EARPPHPPIPP)) mostrou aumento no fluxo do rolamento e adesão dos leucócitos sem alterações na vasodilatação local, o novo BPP-AP mostrou aumento da vasodilatação local e apenas um discreto aumento no rolamento dos leucócitos.

Assim, mesmo que a relação estrutura-atividade não esteja elucidada, a existência de diferentes sequências nas regiões N-terminal e C-terminal pode ser uma forma de ampliação do espectro das atividades biológicas dos BPPs, pela geração de diferentes moléculas a partir da mesma proteína precursora.

Além dos BPPs, a análise do peptidoma do veneno de *B. alcatraz* mostrou a presença de vários outros peptídeos provenientes metaloproteinases e um peptídeo de fosfolipase A2. O estudo de Tashima *et al.* (2012) mostrou que na ausência de inibidores das principais classes de proteases presentes no veneno do gênero *Bothrops*, ou seja metaloproteinases e serinoproteinases, o peptidoma do veneno torna-se muito mais complexo pela presença de peptídeos provenientes da degradação de outros componentes do veneno, principalmente das L-aminoácido oxidases (LAAO).

Dentre os 94 peptídeos identificados pela busca em banco de dados (Peaks Studio) ou pela ferramenta SPIDER, 61 correspondem a sequências presentes em metaloproteinases. A grande abundância de fragmentos de metaloproteinases na fração peptídica do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* não foi observada no estudo de Tashima *et al.* (2012), porém o sistema de análise de LC-MS/MS utilizado para análise por espectrometria de massas no presente trabalho apresenta maior sensibilidade e capacidade de resolução.

Além dos peptídeos provenientes da sequência madura de metaloproteinases, outro ponto que se sobressai na análise é o elevado número de

peptídeos do pró-domínio dos precursores destas proteínas. Embora em menor abundância, alguns peptídeos provenientes do pró-domínio de metaloproteinases também foram identificados por Tashima *et al.* (2012).

Outro achado interessante foi o número de peptídeos (19 de um total de 50), identificados pela busca em banco de dados, e oriundos do domínio catalítico de metaloproteinases da classe P-II. Este fato sugere que estas enzimas sejam mais susceptíveis à hidrólise do que as das demais classes, e talvez explique o baixo número de metaloproteinases da classe P-II isoladas de venenos de serpentes.

## **5.4. Glicoproteoma**

### **5.4.1. Glicosilação de toxinas de venenos do grupo Jararaca**

A N-glicosilação é uma modificação pós-traducional descrita em muitas proteínas de venenos de serpentes (Lochnit e Geyer, 1995; Murayama *et al.*, 2003; Silva-Junior *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 1998; 2000; 2005; Silva *et al.*, 2004; Yamashiro *et al.*, 2014), e dessa forma a mudança no perfil eletroforético das proteínas do veneno submetidas à N-desglicosilação era esperada. Já a análise da O-desglicosilação dos venenos foi afetada pelo tratamento com a neuraminidase, necessário para propiciar o acesso das enzimas para remoção dos O-glicanos. Entretanto, a comparação dos perfis do tratamento com a neuraminidase (Figura 20) e o tratamento com as enzimas da O-desglicosilação (Figura 22) mostra que existem diferenças entre os perfis tratados, indicando que houve diferença na mobilidade das proteínas do veneno de *B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca* que podem ser atribuídas a remoção de O-glicanos.

Independente do tipo de tratamento com glicosidases considerado, é notável que após a reação com as glicosidases os venenos do grupo Jararaca se mostrem

mais similares entre si, indicando que a glicosilação é um fator de variabilidade entre as amostras.

#### **5.4.2. Cromatografia de afinidade à lectinas**

A análise por cromatografia de afinidade à lectinas teve como objetivo avaliar as classes de toxinas do ponto de vista de sua glicosilação, já que a metodologia de análise do N-glicoma não permite recuperar informações sobre os sítios ocupados por cada estrutura nas proteínas do veneno.

A análise qualitativa de todas as frações de proteínas com afinidade pela WGA, PNA e ConA mostrou que a distribuição das classes de toxinas foi semelhante para as três lectinas. Este fato pode estar relacionado com a composição dos N-glicanos, descrita no item 4.5, uma vez que as cadeias de N-glicanos dos três venenos do grupo Jararaca são compostas em sua maioria por dímeros de ácido siálico (reconhecidos pela WGA) e unidades de lactosamina (a galactose exposta de algumas cadeias poderia facilitar o reconhecimento pela PNA) e a manose do core e da estrutura de N-glicano de nº 11 (tipo rico em manose) podem prover condições para retenção dos N-glicanos pela ConA. Contudo, o perfil eletroforético das proteínas reconhecidas pela WGA (Figura 23) indicou o enriquecimento de proteínas em uma região de massa molecular correspondente a SVMP, SVSP e LAAO, sugerindo que os dímeros de ácido siálico estão presentes principalmente nestas classes.

Um resultado não esperado foi a identificação de proteínas não glicosiladas nas frações que mostraram afinidade pelas lectinas, ou seja, lectinas tipo-C e fosfolipases A2. No caso das lectinas tipo-C, uma explicação poderia residir no fato

de que a condição não desnaturante em que a cromatografia foi realizada poderia ter propiciado a interação destas com proteínas glicosiladas do veneno, de forma que ambas foram retidas pelas lectinas.

No caso das fosfolipases A2, trata-se de uma classe de toxinas da qual até o momento nenhuma proteoforma glicosilada foi encontrada no gênero *Bothrops*. Entretanto há o registro de uma isoforma glicosilada de fosfolipase A2 no veneno de *Tropidolaemus pitvipers* (Tsai *et al.*, 2012). Considerando as hipóteses que possam explicar a presença de fosfolipase A2 na fração retida pelas lectinas, tem-se a existência de complexos proteicos envolvendo fosfolipases A2 e proteínas glicosiladas, a interação proteína-proteína que não envolve o sítio de ligação a carboidrato entre a lectina e as fosfolipases A2, e a existência de proteoformas glicosiladas não descritas de fosfolipases A2.

A respeito de uma interação proteína-proteína entre a lectina PNA e a fosfolipases A2, há relatos de interações e formação de complexos estáveis entre lectinas e fosfolipase A2 de venenos na literatura (Buzzo, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2007). Os dados encontrados mostram que a interação é forte e capaz de modular a atividade enzimática e farmacológica da enzima. No estudo de Buzzo (2007) a interação entre uma fosfolipase A2 do veneno de *C. d cascavella* e outra de *B. jararacussu* com lectinas de algas acarretou no aumento da atividade enzimática da primeira e aumento na atividade antibacteriana de ambas as enzimas. O trabalho de Gomes *et al.* (2008) ilustrou a co-purificação de uma 2 do veneno de *B. jararacussu* juntamente com a lectina ligadora de galactose BjcUL.

## 5.5. N-glicoma

Embora o processo de adição das cadeias de glicanos tenha se mantido essencialmente o mesmo em todas as espécies, o processamento dessas cadeias



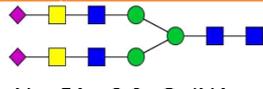
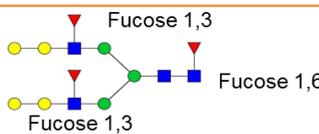
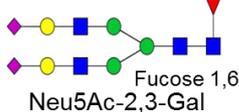
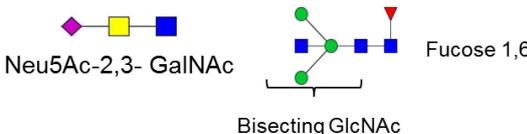
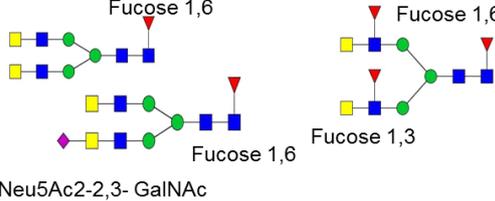
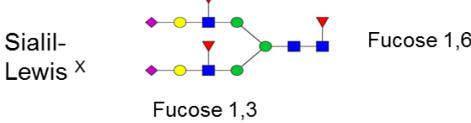
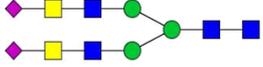
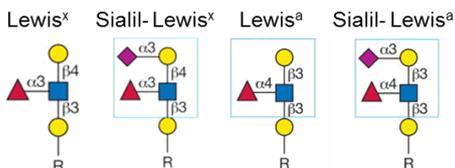
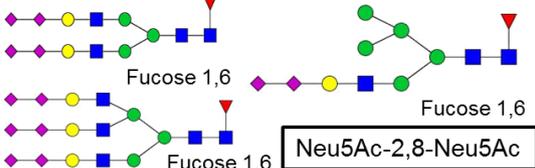
de processamento dos glicanos, processo que ocorrer ao longo de todo percurso (REG e Complexo de Golgi) da proteína até a sua secreção.

Ainda que os venenos de serpentes sejam fluidos biológicos ricos em glicoproteínas, o conhecimento sobre sua glicobiologia é restrito quando comparado àquele disponível sobre diversos proteomas e transcriptomas já publicados (*Lin et al.*, 2011). A análise do primeiro N-glicoma de um veneno do gênero *Bothrops* foi publicada por *Zelanis et al.* (2012), trabalho pioneiro que mostrou que não há diferenças entre os N-glicanos presentes no veneno de indivíduos juvenis e adultos de *B. jararaca*. Entretanto, a presente análise N-glicômica, revelou que o veneno de *B. jararaca* contém estruturas ainda não descritas.

A explicação para estas diferenças muito provavelmente é consequência da utilização de diferentes tempos de incubação para a remoção enzimática de N-glicanos das proteínas. *Zelanis et al.* (2012) utilizaram 18 horas de reação com a PNGase F, já neste estudo optamos por aumentar o tempo de reação para 48 horas.

Os dados dos N-glicomas dos venenos das espécies componentes do grupo Jararaca revelaram que estas compartilham o mesmo perfil de N-glicosilação. Como características destes N-glicanos destacam-se: 70 % das estruturas identificadas pertencem à classe de N-glicanos do tipo complexo, ocorrência de dímeros de ácido siálico na extremidade não redutora, ocorrência de *cores* modificados por fucose na posição 6 da GlcNAc, e identificação de estruturas contendo NeuGc.

Alguns estudos sobre a caracterização da porção de carboidratos de toxinas isoladas indicam uma variabilidade na composição de N-glicanos venenos de diferentes gêneros. A Figura 42 contém um resumo dos estudos de glicobiologia envolvendo amostras de venenos de serpentes, publicados até o momento.

Veneno (Toxina)	Estruturas	Referências
<i>Bothrops atrox moojeni</i> SVSP Batroxobin	 Neu5Ac-2,3- GalNAc	Tanaka <i>et al.</i> , 1992
<i>Naja Naja kaouthia</i> Cobra venom Factor (CVF)	 Fucose 1,3 Fucose 1,6	Gowda <i>et al.</i> , 1992
<i>Agkistrodon rhodostoma</i> SVSP Ancrod	 Fucose 1,6 Neu5Ac-2,3-Gal	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1992
<i>Vipera russelli</i> SVMP RVV-X	 Neu5Ac-2,3- GalNAc Bisecting GlcNAc Fucose 1,6	Gowda <i>et al.</i> , 1994
<i>Bothrops moojeni</i> SVSP Batroxobin	 Fucose 1,6 Fucose 1,6 Fucose 1,3 Neu5Ac2-2,3- GalNAc	Lochnit e Geyer, 1995
<i>Naja Naja kaouthia</i> Cobra venom Factor (CVF)	 Sialil- Lewis X Fucose 1,3 Fucose 1,6	Gowda <i>et al.</i> , 2001
<i>Tropidechis carinatus</i> Trocarin		Joseph <i>et al.</i> , 2003
<i>Vipera russelli</i> SVMP RVV-X	 Lewis <sup>x</sup> Sialil- Lewis <sup>x</sup> Lewis <sup>a</sup> Sialil- Lewis <sup>a</sup>	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Deinagkistrodon acutus</i> Veneno e Acutobin (SVSP)	 Fucose 1,6 Fucose 1,6 Fucose 1,6 Neu5Ac-2,8-Neu5Ac	Lin <i>et al.</i> , 2011 Wang <i>et al.</i> , 2014

**Figura 42.** Estruturas de N-glicanos descritas em venenos de serpentes. As estruturas de Lewis foram retiradas de Stanley e Cummings (2009).

Embora a variabilidade na N-glicosilação de proteínas presentes em venenos exista, alguns pontos podem ser considerados frequentes nos venenos de serpentes, como a presença majoritária de N-glicanos do tipo complexo, a presença

de fucose sempre na posição 6 da GlcNAc, a presença de unidades de ácido siálico na posição 3 de unidades de Gal ou GalNAc, e de antenas contendo unidades de lactosamina ou unidades de GalNAc-GlcNAc.

A proeminência de N-glicanos do tipo complexo nas amostras de venenos foi observada tanto em análises de toxinas isoladas quanto em venenos brutos. Embora na literatura não se encontre muitos registros de análises quantitativas sobre as proporções de classes de N-glicanos, qualitativamente é possível afirmar que o número de estruturas complexas é muito superior que o de estruturas híbridas ou do tipo rico em manose.

A abordagem quantitativa deste trabalho permitiu avaliar que, embora os N-glicanos do tipo rico em manose estejam em menor número, o N-glicano de número 11 (contendo 2 manoses) é o segundo mais abundante na amostra, compreendendo cerca de 20% da área total de N-glicanos das três amostras. Uma análise no banco de dados UniCarbKB revela que esta estrutura está presente em diversas proteínas, tendo sido descrita inclusive em glicoproteínas do veneno de *B. jararaca* (Zelanis *et al.*, 2012) e na glicoproteína CVF presente no veneno de *Naja Naja kaouthia* (Gowda *et al.*, 2001).

Os N-glicanos do tipo rico em manose são comumente associados ao processo de *fold*ing e controle de qualidade de proteínas (Fujikawa *et al.*, 2015, Jitsuhara *et al.*, 2002) enquanto os N-glicanos do tipo complexo costumam ser responsabilizados por estabilizar a conformação funcional da proteína (Jitsuhara *et al.*, 2002).

Embora o estudo de Lin *et al.* (2011) e o presente, demonstrem uma alta similaridade entre os N-glicomas dos venenos do grupo Jararaca e da serpente *Deinagkistrodon acutus*, a abundância das estruturas em cada amostra se mostra

muito diferente. Enquanto do N-glicoma do veneno de *D. acutus* a estrutura triantenária de nº 18 se mostra mais abundante, nosso trabalho apresenta que nos venenos do gênero *Bothrops* analisados é a estrutura biantenária de nº16 a mais abundante (Tabela 4-6).

A comparação destas estruturas com aquelas observadas nos trabalhos de Tanaka *et al.* (1992) e Lochnit e Geyer (1995), descritas na toxina Batroxobin (SVSP), presente no veneno de *B. moojeni*, demonstra que dentro do gênero *Bothrops* existem perfis de N-glicomas diferentes dos observados no grupo Jararaca.

Todavia, apesar das diferenças observadas na composição das antenas de N-glicanos, a posição 2,3 no penúltimo monossacarídeo (GalNAc em *B. moojeni* e Gal em *D. acutus* e no grupo Jararaca) parece ser regra para a adição das unidades de ácido siálico em toxinas de venenos de serpentes.

A adição de ácido siálico é feita por meio de enzimas denominadas sialiltransferases (SiaTs), e esta família de glicosiltransferases contém proteínas altamente específicas, de modo que uma SiaT responsável por adicionar o NeuAc na posição 3 de um monossacarídeo não é capaz de catalisar a mesma reação na posição 6 do mesmo monossacarídeo. Estudos têm demonstrado que alterações nas proporções entre as ligações  $\alpha$ 2,3 e  $\alpha$ 2,6 influenciam processos biológicos como endocitose, adesão e outros (Toegel et al., 2010).

Embora nenhuma análise da ligação entre as unidades de fucose e GlcNAc tenha sido considerada neste trabalho, o fato destas estruturas terem sido liberadas pela enzima PNGase F reflete que sua identidade é 1,6 e não 1,3, já que esta enzima não é capaz de clivar N-glicanos com fucose nesta última posição. N-glicanos com unidades de fucose na posição 6 da GlcNAc são amplamente

encontradas no reino animal, e no caso dos N-glicanos deste estudo a fucosilação do *core* foi encontrada em 80% das estruturas caracterizadas.

A presença desta modificação do *core* de N-glicanos interfere diretamente as propriedades conformacionais do braço 6 dos N-glicanos, o que pode afetar diretamente as interações entre proteínas e carboidratos (Stubbs *et al.*, 1996). Kojima *et al.* (1996) também estabeleceram que a presença destas unidades de fucose na posição 1,6 é importante para a adição de cadeias de ácido siálico em série, processo denominado polisialização, que inclui a adição dos dímeros de ácido siálico. Estas estruturas terminais pertencem a uma família denominada ácidos polisialícos (polySia) que muito frequentemente apresentam ligações  $\alpha 2,8$  e cujo papel biológico ainda não é compreendido (Varki e Schauer, 2009).

A presença destes dímeros de ácido siálico já foi reportada em proteínas presentes no leite, cérebro e no N-glicoma do veneno de *D. acutus* (Lin *et al.*, 2011; Varki e Schauer, 2009). O trabalho de Lin *et al.* (2011) envolveu a análise diversos N-glicomas de serpentes asiáticas e embora o grupo não tenha detalhado os resultados referentes a todos essas análises, eles concluem que a variabilidade é elevada e que alguns venenos apresentam estruturas únicas. Dentre esse N-glicomas únicos, eles descrevem os N-glicanos presentes no veneno de *D. acutus* e, ao comparar estes dados com o N-glicoma do plasma desta serpente e de outras, o grupo sugeriu que a N-glicosilação de toxinas é espécie-específica e veneno-específica.

Mesmo que não tenhamos definido os anômeros envolvidos nas ligações dos N-glicanos do grupo Jararaca, com base no trabalho de Junqueira-de-Azevedo *et al.* (2015) podemos sugerir que a ligação entre as unidades de ácido siálico são as mesmas descritas por Lin *et al.* (2011), ou seja NeuAc- $\alpha 2,8$ -NeuAc. Essa sugestão é

feita com base no conteúdo de transcriptomas de vários órgãos de um espécime de *B. jararaca* (Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2015), que indicam que as vias de glicosilação estão exacerbadas na glândula de veneno e que a enzima alfa sialiltransferase 8f foi expressa apenas nesta glândula.

Esta última observação faz com que a sugestão de Lin *et al.* (2011), de que a N-glicosilação de proteínas de veneno seria espécie específica, não seja totalmente verdadeira, já que o mesmo dímero de ácido siálico está presente nas amostras de veneno de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. alcatraz*. Entretanto, os dados de Junqueira-de-Azevedo *et al.* (2015) corroboram a observação deste grupo de que a N-glicosilação do veneno difere dos outros órgãos da serpente.

A respeito do papel biológico exercido pela presença deste dímero de ácido siálico, Lin *et al.* (2011) sugere que possa existir alguma interação importante das proteínas de veneno com células do sistema imune já que estas apresentam algumas lectinas da classe Siglecs família (*sialic acid binding immunoglobulin-like lectins*) com especificidade para este dímero.

Posteriormente, Wang *et al.* (2014) analisaram os efeitos da N-glicosilação no tempo de meia vida e atividade da Acutobin, uma serinoproteinase presente no veneno de *D. acutus* e cujo perfil de N-glicosilação se assemelha ao perfil observado para o veneno total. Como conclusões o grupo sugere que os N-glicanos presentes na Acutobin estão envolvidos na interação com fibrinogênio e que a presença dos dímeros de ácido siálico aumentam o tempo de meia vida desta toxina por evitar a exposição das unidades de galactose das estruturas de lactosamina. Após a perda de moléculas de ácido siálico, a exposição de unidades de galactose leva a retirada destas proteínas de circulação por macrófagos e hepatócitos por meio de receptores que reconhecem galactose (Wang *et al.*, 2014, Varki e Schauer, 2009).

A ampla ocorrência de monossacarídeos da família dos ácidos siálicos em glicanos das mais variadas fontes sugere que estes possam estar envolvidos na estabilização das proteínas e na sua interação com receptores (Varki e Schauer, 2009). Ácidos siálicos também podem estender o tempo de meia-vida de moléculas, proteger contra proteólise e participar de processos de sinalização transmembrana. As modificações que estes podem receber (tais como O-acetilação) ainda podem interferir em suas atividades. Além da descrição do dímero de ácido siálico, *Lin et al.*(2011) demonstrou que algumas estruturas de N-glicanos do veneno de *D. acutus* apresentam ácidos siálicos O-acetilados, e sugerem que a presença dessas unidades acetiladas pode interferir na interação destes N-glicanos com as Siglecs.

Da mesma forma como ocorre com as proteínas, nenhuma regra pode ser adotada para a interpretação da N-glicosilação de toxinas no contexto de seu papel biológico. A observação de diferentes N-glicosilações em diferentes gêneros de serpentes mostra que a plasticidade na construção dos venenos ao longo da evolução não se limitou às cadeias polipeptídicas das proteínas, mas também atuou sobre a glicosilação.

## 6. Conclusão

Diversos estudos têm sugerido que a duplicação de genes facilita a rápida evolução e a divergência na composição do veneno entre as espécies de serpentes, e que esses processos podem ser associados com respostas evolutivas na dieta, habitat e as interações entre predador e presa. No caso das espécies do grupo Jararaca amostradas neste estudo, o que se observou é que, apesar do fato de que em sua vida adulta *B. alcatraz*, *B. jararaca*, e *B. insularis* sigam diferentes caminhos em termos de presa e dieta, de forma geral, seus proteomas e peptidomas são bastante semelhantes com relação às cadeias polipeptídicas. Isto sugere que, apesar dos vários factores de pressão evolutiva, os proteomas de seus venenos e os subproteomas de glicoproteínas contêm um núcleo de componentes que definem a sua composição, que foi conservada durante a evolução, em paralelo a outros marcadores moleculares que determinam a sua classificação filogenética. Ainda, apesar da conservação das estruturas de N-glicanos entre os três venenos, os perfis eletroforéticos dos mesmos, na forma nativa e submetidos à desglicosilação, sugerem que as diferenças observadas residem no grau de glicosilação das toxinas. Nesta linha, é razoável supor que a glicosilação de componentes específicos do veneno pode ter fornecido uma novidade evolucionária para a adaptação da espécie para lidar com diferentes inibidores presentes em diferentes tipos de presas, em seus respectivos nichos ecológicos.

A glicosilação de proteínas é uma modificação pós traducional que requer uma complexa maquinaria de enzimas, a presença de motivos de sequências que dirigem as proteínas nascentes ao longo da rota de síntese, e que demanda energia em várias etapas para compor as diversas cadeias de glicanos e que devem estar em plena atividade quando da síntese de proteínas na glândula de veneno de

serpentes, especialmente depois de sua drenagem durante a picada para a captura de presas. Vários tipos de glicosiltransferases são responsáveis pela modificação de cadeias de carboidratos durante a síntese de proteica e, conseqüentemente, várias famílias de glicanos co-desenvolveram durante a evolução de organismos multicelulares. Em um estudo recente, a categoria Glicosilação de Proteínas foi um dos processos biológicos mais enriquecidos na análise de ontologia genética da glândula de veneno de *B. jararaca* em comparação com outros órgãos (Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2015). No futuro, será interessante comparar a composição do repertório de glicosiltransferases nas glândulas de veneno das serpentes do grupo Jararaca, a fim de compreender como o processo global de glicosilação é controlado e como evoluiu com relação à suas glicosidases e seus substratos.

## 7. Referências Bibliográficas

- AIRD, S.D.; AGGARWAL, S.; VILLAR-BRIONES, A.; TIN, M.M.Y.; TERADA, K.; MIKHEYEV, A.S. Snake venoms are integrated systems, but abundant venom proteins evolve more rapidly. **BMC Genomics**, v. 16(1), p. 647, 2015.
- AIRD, S.D.; YATES III, J.R.; MARTINO, P.A.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; KAISER, I.I. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. *Biochim. Biophys Acta*, 1040, p. 217–224, 1990.
- APWEILER, R., HERMJAKOB, H., SHARON, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of SWISS-PROT database. **Biochim Biophys Acta**, v. 1473, p. 4-8, 1999.
- ASHLINE, D.; SUDDHAM, S.; HANNEMAN, A.; REINHOLD, V. Congruent strategies for carbohydrate sequencing. 1. Mining Structural details by MSn. **Anal Chem**, v. 77, p. 6250-6262, 2005.
- ASHLINE, D.J.; HANNEMAN, A.J.; ZHANG, H.; REINHOLD, V.N. Structural documentation of glycan epitopes: sequential mass spectrometry and spectral matching. **J Am Soc Mass**, v. 25(3), p. 444-453, 2014.
- BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. In vivo Half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. **Science**, v. 234, p. 179-186, 1986.
- BARLOW, A.; POOK, C.E.; HARRISON, R.A.; WUSTER, W. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proc Biol Sci**, v. 276(1666), p. 2443-2449, 2009.
- BERNHEIMER, A.W.; LINDER, R.; WEINSTEIN, S.A.; KIM, K.S. Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of collett's snake, *Pseudechis colletti*. **Toxicon**, v. 25(5), p. 547-554, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROCKHAUSEN, I.; SCHACHTER, H.; STANLEY, P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. **Essentials of Glycobiology**. 2ª edição. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- BUZZO, S. C. (2008) Modulação da ação farmacológica de PLA2 botrópicas e crotálicas em presença de uma lectina isolada da alga marinha *Bryothamnion triquetrum*. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP.
- CALVETE, J.J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert review of proteomics**, v. 8(6), p. 739-758, 2011.
- CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**. v. 42(11), p. 1405-14, 2007.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B., *et al.* Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **J Proteomics**. v. 74(4), p. 510-527, 2011.
- CASEWELL, N.R., WAGSTAFF, S.C., WÜSTER, W., COOK, D.A., BOLTON, F.M., KING, S.I. *et al.* Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111(25), p. 9205-10, 2014.
- CASEWELL, N.R.; HARRISON, R.A.; WÜSTER, W.; WAGSTAFF, S.C. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: Echis) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. **BMC genomics**, v. 10(1), p. 564, 2009.
- CASTOE, T.A.; DE KONING, A.P.; HALL, K.T.; CARD, D.C.; SCHIELD, D.R.; FUJITA, M.K. The Burmese Python genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes. **PNAS**. v. 110(51), p. 20645-20650, 2014.
- CHI, C.W.; WANG, S.Z.; XU, L.G.; WANG, M.Y.; LO, S.S.; HUANG, W.D. Structure-Function on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Agkistrodon halys* Pallas). **Peptides**, v. 6, p. 339-342, 1985.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**. v. 29, p. 1279-1303, 1991.
- COMSTOCK, L.E.; KASPER, D.L. Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. **Cell**, v. 126(5), p. 847-50, 2006.
- COX, J. e Mann, M. Maxquant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol**, v. 26, p. 1367-72, 2008.
- DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. **Diet and snake venom evolution**. **Nature**, v. 379, p. 537-540.
- DESHIMARU, M.; TOMOHISA, O.; KIN-ICHI, N.; IKUO, N.; TAKAHITO, C.; YASUYUKI, S.; YASUYUKI, F.; MINEO, N.; IKUO, Y.; SHOSAKU, H.; MOTONORI, O. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. **FEBS Letters**. v. 397, p. 83-88, 1996.

- DOLEY, R. e KINI, R.M. Protein complexes in Snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 66(17), p. 2851-2871, 2009.
- DOMON, B.; COSTELLO, C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5(4), p. 397-409, 1988.
- DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. **Curr Opin Struct Biol**. v. 9(5), p. 585-590, 1999.
- EISENMANN, D.M. Wnt signaling, WormBook. **The C. elegans Research Community**, 2005.
- FERREIRA, S.H.; ROCHA-E-SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin-potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**. v. 15, p. 347-349, 1965.
- FOX, J.W. e SERRANO, S.M.T. Approaching the Golden Age of Natural product Pharmaceuticals from Venom Libraries: An overview of toxins and toxin-derivates currently involved in therapeutic or diagnostic applications. **Curr Pharm Des**, v. 13(28), p. 2927-2934, 2007.
- FOX, J.W. e 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. **The FEBS Journal**. v. 275, p. 3016-3030, 2008.
- FOX, J.W. e SERRANO, S.M.T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **J Proteomics**. v. 72, p. 200-209, 2009.
- FRY, B.G.; VIDAL, N.; NORMAN, J.A.; VONK, F.J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S.F. *et al.*, Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439 (7076), p. 584-588, 2006.
- FRY, B.G.; LUMSDEN, N.G.; WÜSTER, W.; WICKRAMARATNA, J.C.; HODGSON, W.C.; KINI, R.M. Isolation of a neurotoxin (alpha-cobrotoxin) from a 'non-venomous' colubrid: evidence for early origin of venom in snakes. **J Mol Evol**, v. 57, p. 446-452, 2003.
- FUJIKAWA, K.; SEKO, A.; TAKEDA, Y.; ITO, Y. Approaches toward High-Mannose-Type Glycan Libraries. **Chem Rec**. 2015.
- Furtado, M.F.D. Biological and immunological properties of the venom of *Bothrops alcatraz*, an endemic species of pitviper from Brazil. **Comp Biochem Physiol**, v.141, p. 117-123. 2005.
- GANS, C. e ELLIOT, W.B. Snake venoms: production, injection, action. **Adv Oral Biol**. v. 3, p. 45-81, 1968.
- GBORMITTAH, F.O.; LEE, L.Y.; TAYLOR, K.; HANCOCK, W.S.; ILIOPOULOS, O. Comparative Studies of the Proteome, Glycoproteome, and N-Glycome of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Plasma before and after Curative Nephrectomy. **J Proteome Res**, v. 13(11), p. 4889-4900, 2014.
- GIBBS, H.L. e MACKESSY, S.P. Functional basis of a molecular adaptation: prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus rattlesnakes*. **Toxicon**, v. 53, p. 672-679, 2009.
- GOMES, C.L.; KONNO, K.; CONCEIÇÃO, I.M.; IANZER, D.; YAMANOUYE, N.; PREZOTO, B.C. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure–function relationship of BPPs. **Biochemical Pharmacology**, v. 74(9), p. 1350-1360, 2007.
- GOMES, P. C., ÁVILA, R. A. M., MARIA, W. S., RICHARDSON, M., FORTE-DIAS, C. L., CHAVEZ-OLORTEGUI, C. The co-purification of a lectin (BJcuL) with phospholipases A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom by immunoaffinity chromatography with antibodies to crotoxin. **Toxicon**, 49, 1099-1108, 2008.
- GOWDA DC, GLUSHKA J, HALBEEK HV, THOTAKURA RN, BREDEHORST R, VOGEL CW. N-linked oligosaccharides of cobra venom factor contain novel alpha(1-3)galactosylated Le(x) structures. **Glycobiology**. v. 11(3), p. 195-208, 2001.
- GOWDA, D.C.; JACKSON, C.M.; HENSLEY, P.; DAVIDSON, E.A. Factor X-activating glycoprotein of Russell's viper venom. Polypeptide composition and characterization of the carbohydrate moieties. **J Biol Chem**. v. 269(14), p. 10644-50, 1994.
- GOWDA, D.C.; SCHULTZ, M.; BREDEHORST, R.; VOGEL, C.W. Structure of the major oligosaccharide of cobra venom factor. **Mol Immunol**, v. 29(3), p. 335-342, 1992.
- GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3969-3982, 2006.
- GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T. Snake venom metalloproteinases: biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. In: Mackessy SP, editor. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press/Taylor & Francis Group; Boca Raton, FL, p. 115–138, 2009.
- HART, G.W. e COPELAND, R.J. Glycomics Hits the Big Time. **Cell**, v. 143, p. 672-676, 2010.
- HARVEY, D.J. *et al.* **Current Protocols in Protein Science**, John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, p. 1-18, 2006.
- HINKE, S.A.; POSPISILIK, J.A.; DEMUTH, H.U.; MANNHART, S.; KUHN-WACHE, K.; HOFFMANN, T.; NISHIMURA, E.; PEDERSON, R.A.; MCINTOSH, C.H. Dipeptidyl peptidase IV (DPIV/CD26) degradation of glucagon. Characterization of glucagon degradation products and DPIV-resistant analogs. **J Biol Chem**, v. 275, p. 3827–3834, 2000.

- HUANG, K.F.; LIU, Y.L.; CHENG, W.J.; KO, T.P.; WANG, A.H. Crystal structures of human glutaminyl cyclase, an enzyme responsible for protein N-terminal pyroglutamate formation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 13117–13122, 2005.
- IACOB, R.E.; PERDIVARA I.; PRZYBYLSKI, M.; TOMER, K.B. Mass spectrometric characterization of glycosylation of Hepatitis C Virus E2 envelope glycoprotein reveals extended microheterogeneity of N-glycans. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 19(3), p. 428-44, 2008.
- IANZER, D.; KONNO, K.; MARQUES-PORTO, R.; PORTARO, F.C.V; STOCKLIN, R.; CAMARGO, A.C.M., *et al.* Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass Spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, v. 25(7), p. 1085-1092, 2004.
- IANZER, D.; SANTOS, R.A.; ETELVINO, G.M.; XAVIER, C.H.; DE ALMEIDA SANTOS, J.; MENDES, E.P. *et al.* Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 322(2), p. 795-805, 2007.
- IZIDORO, L.F; SOBRINHO, J.C.; MENDES, M.M.; COSTA, T.R.; GRABNER, A.N; RODRIGUES, V.M.; *et al.* Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. **BioMed Research International**. v. 2014, 19 pages, 2014.
- JITSUHARA, Y.; TOYODA, T.; ITAI, T.; YAMAGUCHI, H. Chaperone-like functions of high-mannose type and complex-type N-glycans and their molecular basis. **J Biochem**. v. 132(5), p. 803-11, 2002.
- JORGE-DA-SILVA Jr. N. e AIRD, S.D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comp Biochem and Physiol**. v. 128(3), p. 425-456, 2001.
- JOSEPH, J.S.; VALIYAVEETIL, M.; GOWDA, D.C.; KINI, R.M. occurrence of O-linked Xyl-GlcNAc and Xyl-GLC disaccharides in trocarin, a factor Xa homolog from snake venom. *J. of Thromb Haemost.* V. 1, p. 545-550, 2003.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; BASTOS, C.M.; HO, P.L.; LUNA, M.S.; YAMANOUYE, N.; CASEWELL, N.R. Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. **Mol Biol Evol**. v. 32(3), p. 754-66, 2015.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L. e 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(1–2), p. 279-291, 2002.
- KANG, T.S; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T.; SINHA, M.; KUMAR, R.P. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J**, v. 278(23), p. 4544-4576, 2011.
- KLEIFELD, O.; DOUCET, A.; AUF DEM KELLER, U.; PRUDOVA, A.; SCHILLING, O.; KAINTHAN, R.K., *et al.* Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 281-288, 2010.
- KOH, C.Y.; KINI, R.M. From snake venom toxins to therapeutics - cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59(4), p. 497-506, 2012.
- KOJIMA, N.; TACHIDA, Y.; YOSHIDA, Y.; TSUJI, S. Characterization of mouse ST8Sia II (STX) as a neural cell adhesion molecule-specific polysialic acid synthase. Requirement of core alpha1,6-linked fucose and a polypeptide chain for polysialylation. **J Biol Chem**. v. 271(32), p. 19457-63, 1996.
- KORDIS, D.; GUBENSEK, F. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. **Genes**. v. 261, p.43-52, 2000.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LANNOO, N.; Van DAMME, E.J.M. Review/N-glycans: The making of a varied toolbox. **Plant Science**, v. 239, p. 67-83, 2015.
- LEME, A.F.P.; KITANO, E.S.; FURTADO, M.F.; VALENTE, R.H., CAMARGO, A., HO, P.L. *et al.* Analysis of the subproteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. **Proteomics**, v. 9(3), p. 733-745, 2009.
- LEYMARIE, N. e ZAIA, J. Effective use of mass spectrometry for glycan and glycopeptides structural analysis. **Anal Chem**, v. 84(7), p. 3040-3048, 2012.
- LI, M.; FRY, B.G.; MANJUNATHA, K.R. Eggs-only diet: its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). **J.Mol.Evol.** v.60, p.81-89, 2005.
- LIAO, Y.D.; WANG, Y.J.L.; WANG, C.F.; CHANG, S.T.; HONG, Y.R.; CHEN, C. The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from *Rana pipiens*. **Nucleic Acids Res**, v.31, p. 5247-5255, 2013.
- LIN, C.W.; CHEN, J.M.; WANG, Y.M.; WU, S.W.; TSAI, I.H.; KHOO, K.H. Terminal disialylated multiantennary complex-type N-glycans carried on acutobin define the glycosylation characteristics of the Deinagkistrodon acutus venom. **Glycobiology**, v. 21(4), p. 530-542, 2011.

- LISZCZAK, G.; GOLDBERG, J.M.; FOYN, H.; PETERSSON, E.J.; ARNESEN, T.; MAMORSTEIN, R. Molecular basis for N-terminal acetylation by the heterodimeric NatA complex. **Nat Struct Mol Biol**, v. 20(9), p. 1098-105, 2013.
- LOCHNIT, G.; GEYER, R. Carbohydrate structure analysis of batroxobin, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. **Eur J Biochem**. v. 228(3), p. 805-16, 1995.
- LOMONTE, B.; TSAI, W.C.; UREÑA-DIAZ, J.M.; SANZ, L.; MORA-OBANDO, D.; SÁNCHEZ, E.E. et al. Venomics of New World pit vipers: Genus-wide comparisons of venom proteomes across Agkistrodon. **J Proteomics**, v. 96, p. 103-116, 2014.
- LOPES, D.M.; JUNIOR, N.E.G.; COSTA, P.P.C.; MARTINS, P.L.; SANTOS, C.F.; CARVALHO, E.D.F., et al. A new structurally atypical bradykinin-potentiating peptide isolated from *Crotalus durissus cascavela* venom (South American rattlesnake). **Toxicon**, v. 90, p. 36-44, 2014.
- LUCIANO, P.M.; SILVA, G.E.B.; AZEVEDO-MARQUES, M.M. Acidente botrópico fatal. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 42(1), p. 61-65, 2009.
- MACKESSY, S.P. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). **Comp Biochem Physiol**. v. 106 B(1), p. 181-189, 1993.
- MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. 2002. A jararaca da ilha da queimada grande. **Ciência hoje**. v. 31(186), p. 56-59, 2002.
- MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes Viperidae). **Herpetologica**, v. 58, p. 303-312, 2002.
- MARTINS, M.; ARAUJO, M.S.; SAWAYA, R.J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). **The Zoological Society of London**. v. 254, p. 529-538, 2001.
- MEBS, D. Toxicity in animals. Trends in evolution?. **Toxicon**, v. 39(1), p. 87-96, 2001.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S, Wen, F. H., Malaque, C. M. S., Haddad Junior, V. Animais peçonhentos no Brasil. **Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. 2ª edição, Editora Savier, cap. 4, 42-70, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª edição, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2001.
- MOGK, A.; BUKAU, B. When the beginning marks the end. **Cell Biology**, v. 327, p. 966-967, 2010.
- MORAES, D. S. Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothrops alcatraz* em preparações neuromusculares in vitro. (2011) 76 p. Dissertação de mestrado. Faculdade de ciências Médicas da Universidade de Campinas, Campinas.
- MORAES, D.S.; ABREU, V.A.; ROSTELATO-FERREIRA, S.; LEITE, G.B.; CRUZ-HOFLING, M.A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular activity of *Bothrops alcatraz* Snake venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**. V. 59, p. 294-299, 2012.
- MORELLE, W.; CANIS, K.; CHIRAT, F.; FAID, V.; MICHALSKI, J. The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. **Proteomics**, v. 6, p. 3993-4015, 2006.
- MORITA, T. C-type lectin-related proteins from snake venoms. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**. v. 4(4), p. 357-373. 2004b.
- MUELLER, S.; GOTHE, R.; SIEMS, W.D.; VIETINGHOFF, G.; PAEGELOW, I.; REISSMANN, S. Potentiation of bradykinin actions by analogues of the bradykinin potentiating nonapeptide BPP9α. **Peptides**, v. 26 (7), p. 1235-1247, 2005.
- MURAYAMA, N.; HAYASHI, M.A.; OHI, H.; FERREIRA, L.A.; FERNANDES, B.L.; YAMANE, T., et al. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94(4): p. 1189-1193, 1997.
- MURAYAMA, N.; SAGUCHI, K.; MENTELE, R.; ASSAKURA, M.T.; OHI, H.; FUJITA, Y. et al. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. **Biochim Biophys Acta**, v. 1652, p. 1-6, 2003.
- NARVAES, L. V. P. Isolamento de caracterização de toxinas do veneno de *Bothrops alcatraz* e aspectos coevolutivos com a dieta. (2007) 135 p. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NETTLESHIP, J.E. (2012). Structural Biology of Glycoproteins. **Glycosylation**, Dr. Stefana Petrescu (Ed.), InTech, 2012.
- NICOLETI AF, MEDEIROS CR, DUARTE MR, FRANÇA FO. Comparison of *Bothropoides jararaca* bites with and without envenoming treated at the Vital Brazil Hospital of the Butantan Institute, State of São Paulo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 43( 6 ), p. 657-661, 2010.

- NOVOTNY, M.V. e ALLEY JR., W.R. Recent trends in analytical and structural glycobiology. **Curr Opin Chem Biol**, v. 17(5), p. 832-40, 2013.
- ODELL, G.V.; FERRY, P.C.; VICK, L.M.; FENTON, A.W.; DECKER, L.S.; COWELL, R.L., et al. Citrate inhibition of snake venom proteases. **Toxicon**, v. 36(2), p. 1802-1806, 1998.
- OGAWA, T.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon**, v. 45(1), p. 1-14, 2005.
- OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y. et al. OHNO, M. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A2 isozymes for acquisition of diverse physiological functions. **Toxicon**. v. 34, p. 1229-1236, 1996.
- OLIVEIRA, S.C.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; CAMARGO, E.A.; MORGANTI, R.P., APARÍCIO, R., TOYAMA, D. O., BERIAM, L.O., NUNES, E.V., CAVADA, B.S., NAGANO, C.S., SAMPAIO, A.H., NASCIMENTO K.S. TOYAMA, M.H. (2008) Modulation of pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by BTL-2, an isolectin isolated from the Bryothamnion triquetrum red alga. **BMC Biochemistry** v. 1471-, p. 9-16, 2008.
- OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; GUIMARÃES, P.R.; ABREU, P.A.; DUTRA, D.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; RODRIGUES, C.R. et al. Identification and characterization of a new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. **Toxicon**. v. 51(4), p. 659-671, 2008.
- OLIVEROS, J.; VENNY, C. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. 2007.
- PAWLAK, J, KINI, RM. Snake venom glutaminyl cyclase. **Toxicon** 48: 278-286, 2006.
- PFEIFFER, G.; DABROWSKI, U.; DABROWSKI, J.; STIRM, S.; STRUBE, K.H.; GEYER, R. Carbohydrate structure of a thrombin-like serine protease from *Agkistrodon rhodostoma*. Structure elucidation of oligosaccharides by methylation analysis, liquid secondary-ion mass spectrometry and proton magnetic resonance. **Eur J Biochem**. V. 205(3), p. 961-78, 1992.
- POLEVODA, B.; SHERMAN, F. N $\alpha$ -terminal Acetylation of Eukaryotic proteins. **J Biol Chem**, v. 275(47), p. 36479-36482, 2000.
- RAO, R.S.P. e WOLLENWEBER, B. Do N-glycoproteins have preference for specific sequons? **Bioinformatics**, v. 5(5), p. 208-212, 2010.
- REINHOLD, V.N.; ASHLINE, D.J.; ZHANG, H. Unraveling the structural details of the glycoproteome by ion trap mass spectrometry. In: MARCH, R. E., TODD, J. F. J. **Practical Aspects of Trapped Ion Mass Spectrometry**. Boca Raton, FL: CCR Press, 2010.
- RICHARDS, D.P.; BARLOW, A.; WÜSTER, W. Venom lethality and diet: Differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (Echis). **Toxicon**, v. 59(1), p. 110-116, 2012.
- RIOLI, V.; PREZOTO, B.C.; KONNO, K.; MELO, R.L.; KLITZKE, C.F.; FERRO, E.S., et al. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. **FEBS Journal**, v. 275, p. 2442-2454, 2008.
- ROEPSTORFF, P. e FOHMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. **Biomed Mass Spectrom**. V. 11, p601, 1984.
- SASA, M. Diet and snake venom evolution: can local selection alone explain intraspecific venom variation?. **Toxicon**. v. 37, p. 249-252, 1999.
- SCHULZ, B.L. Beyond the Sequon: Sites of N-Glycosylation, **Glycosylation**, Dr. Stefana Petrescu (Ed.), InTech, 2012.
- SENIS, Y.A.; KIM, P.Y.; FULLER, G.L.; GARCÍA, A.; PRABHAKAR, S.; WILKINSON, M.C. Isolation and characterization of cotiaractivase, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of *Bothrops cotiara*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1764(5), p. 863-871, 2006.
- SERRANO, S.M.T. e MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology VS. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. v. 45, p. 1115-1132, 2005.
- SERRANO, S.M.T. The long Road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**. v. 62, p. 19-26, 2003.
- SERRANO, S.M.T.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.M.; et al. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur J Biochem**, v. 251, p. 845-853, 1998.
- 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, p. 501-510, 2005.
- SERRANO, S.M.T.; Oliveira, A.K.; Menezes, M.C.; Zelanis, A. The proteinase-rich proteome of *Bothrops jararaca* venom. **Toxin Reviews**, v. 33, p. 169-184, 2014.

- SERRANO, S.M.T.; SAMPAIO, C.A.M.; MENTELE, R.; FINK, E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ from the venom of *Bothrops jararaca*: purification and characterization. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 83, p. 438-444, 2000.
- SILVA, C.A.; ZULIANI, J.P.; ASSAKURA, M.T.; MENTELE, R.; CAMARGO, A.C.; TEIXEIRA, C.F. Activation of  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 322(3), p. 950-956, 2004.
- SILVA-JUNIOR, F.P.; GUEDES, H.L.; GARVEY, L.C.; AGUIAR, A.S.; BOURGUIGNON, S.C.; DI CERA, E.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. **Toxicon**, v. 50(1), p. 18-31, 2007.
- SOARES, S.G. e OLIVEIRA, L.L. Venom-sweet-venom: N-linked glycosylation in snake venom toxins. **Protein and Peptide Letters**, v. 16(8), p. 913-919, 2009.
- SOUSA, L.F.; NICOLAU, C.A.; PEIXOTO, P.S.; BERNARDONI, J.L.; OLIVEIRA, S.S. *et al.* Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7(9): e2442, 2013.
- SOUZA, G.H.M.; CATHARINO, R.R.; IFA, D.R.; EBERLIN, M.N.; HYSLOP, S. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification ant taxonomy. **J Mass Spectrom**, v. 43, p. 594-599, 2008.
- SPIRO, R.G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, 43R-56R, 2002.
- STANLEY, P.; CUMMINGS, R.D. Structures Common to Different Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, editors. **Essentials of Glycobiology**. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- STUBBS, H.J.; LIH, J.J.; GUSTAFSON, T.L.; RICE, K.G. Influence of Core Fucosylation on the Flexibility of a Biantennary N-Linked Oligosaccharide. **Biochemistry**. v. 35(3), p. 937-947, 1996.
- SYKES, P.A.; WATSON, S.J.; TEMPLE, J.S.; BATEMAN JR, R.C. Evidence for tissue-specific forms of glutaminyl cyclase. **FEBS Letter**, v. 455, p. 159-161, 1999.
- SZYMANSKI, C.M. e WREN, B.W. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nature Rev Microbiol*, v. 3(3), p. 225-237, 2005.
- TAKEYA, H.; ARAKAWA, M.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; OMORI-SATOH, T. Primary structure of H2-proteinase, a non-hemorrhagic metalloproteinase, isolated from the venom of the habu snake, *Trimeresurus flavoviridis*. **J Biochem (Tokyo)**, v. 106, p. 151-157, 1989.
- TANAKA, N.; NAKADA, H.; ITOH, N.; MIZUNO, Y.; TAKANISHI, M.; KAWASAKI, T.; TATE, S.; INAGAKI, F.; YAMASHINA I. Novel structure of the N-acetylgalactosamine containing N-glycosidic carbohydrate chain of batroxobin, athrombin-like snake venom enzyme. **J Biochem**. v. 112(1), p. 68-74, 1992.
- TASHIMA, A.K.; ZELANIS, A.; KITANO, E.S.; IANZER, D.; MELO, R.L.; RIOLI, V., *et al.* Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Mol Cel Proteomics**, v. 11, p. 1245-1262, 2012.
- TAYLOR, M. E., DRICAKAMER, K.. Concepts in Glycobiology. In: **Introduction to glycobiology**. Chapter 1. Oxford University Press, New York (2006).
- TEIXEIRA, C.F.P.; LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**. v. 42, p. 947-962, 2003.
- THARMALINGAM, T.; ADAMCZYK, B.; DOHERTY, M.A.; ROYLE, L.; RUDD, P.M. Strategies for the profiling, characterization and detailed structural analysis of N-linked oligosaccharides. **Glycoconj J**, v. 30(2), p. 137-46, 2012.
- THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms, **Toxicon**. v. 41(5), p. 541-557, 2003.
- THOMAS, R.G. e POUGH, F.H. The effects of rattlesnake venom on the digestion of prey. **Toxicon**. v. 17, p. 221-228, 1979.
- TOEGEL, S.; PABST, M.; WU, S.; GRASS, J.; GOLDRING, M.; CHIARI, C.; UNGER, F. Phenotype-related differential  $\alpha$ -2,6- or  $\alpha$ -2,3-sialylation of glycoprotein N-glycans in human chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**. v. 18(2), p. 240, 2010.
- TSAI, I H, CHANG, H C, CHEN, J M, CHENG, A C, KHOO, K H. Glycan structures and intragenic variations of venom acidic phospholipases A (2) from *Tropidolaemus pitvipers* **FEBS Journal**, 15, 2672-2682, 2012.
- VALENTE, R.H.; GUIMARÃES, P.R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A.G.; SOARES, M.R.; CHAPEAUROUGE, A. *et al.* *Bothrops insularis* venomomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J. Proteomics**. v. 72(2), p. 241-255, 2009.
- VALLIERE DOUGLASS, J.F.; EAKIN, C.M.; WALLACE, A.; KETCHEM, R.R.; WANG, W., TREUHEIT, M.J., BALLAND, A. Glutamine-linked and Non-consensus Asparagine-linked Oligosaccharides present in

- Human Recombinant Antibodies Define Novel Protein Glycosylation Motifs. **JBC**, 285, p. 16012-16022, 2010.
- VAN COILLIE, E.; PROOST, P.; VAN A.I.; STRUYF, S.; POLFLIET, DE M.I.; HARVEY D.J.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER G. Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV. **Biochemistry**, v. 37, p. 12672–12680, 1998.
- VAN DEN STEEN, P.; RUDD, P.M.; DWEK, R.A.; OPDENAKKER, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 33, p. 151-208, 1998.
- VANDERSCHAEGHE, D.; FESTJENS, N.; DELANGHE, J.; CALLEWAERT, N. Glycome profiling using modern glycomics technology: technical aspects and applications. **Biology Chemistry**, v. 391, p. 149-161, 2010.
- VARKI A. Evolutionary Forces Shaping the Golgi Glycosylation Machinery: Why Cell Surface Glycans Are Universal to Living Cells. **CSH Perspectives in Biology**, v. 3(6):a005462, 2011.
- VARKI, A.; FREEZE, H.H.; GAGNEUX, P. Evolution of glycan diversity. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. **Essentials of Glycobiology**. 2ª edição. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009
- VICOSO, B.; Emerson, J.J.; Zektser, Y.; Mahajan, S.; Bachtrog, D. Comparative sex chromosome genomics in snakes: differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation. **PLoS Biol**, v. 11(8), p. e1001643, 2013.
- VIDAL, N. Colubroid systematics: evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. **J Toxicol Toxin Rev**. v. 21, p. 21-41, 2002.
- VON HEIJNE, G. Signal Peptide. **J Membr Biol**, v. 201, p. 195-201, 1990.
- VONK, F.J.; CASEWELL, N.R.; HENKEL, C.V.; HEIMBERG, A.M.; JANSEN, H.J.; MCCLEARY, R.J. *et al.* The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. **PNAS**, v. 110(51), p. 20651-20656, 2013.
- WARRELL, D.A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375(9708), p. 77-88, 2010.
- WERMELINGER, L.S.; DUTRA, D.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; SOARES, M.R.; BLOCH, C.; ZINGALI, R.B. Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 19(12), p. 1703-1708, 2005.
- WILTON, D.C. e WAITE, M. Phospholipases, chapter 11 in D.E. Vance and J.E. Vance (Eds.) **Biochemistry**, Elsevier Science, 2002.
- WORMALD, M.R.; DWEK, R.A. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. **Structure**, v. 7(7), p. 155-60, 1999.
- YAMASHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.K.; KITANO, E.S.; MENEZES, M.C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; LEME, A.F.L.; SERRANO, S.M.T. Proteoforms of the platelet-aggregating enzyme PA-BJ, a serine proteinase from *Bothrops jararaca* venom, **Biochim Biophys Acta**, v. 1844(12), p. 2068-2076, 2014.
- YAMAZAKI, Y. e MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44(3), p. 227-231, 2004.
- ZAIA, J. Mass spectrometry and Glycomics. **OMICS**, v. 14(4), p. 401-418, 2010.
- ZELANIS, A. e TASHIMA, A.K. Unraveling snake venom complexity with 'omics' approaches: Challenges and perspectives, **Toxicon**, v. 87, p. 131-134, 2014.
- ZELANIS, A.; ANDRADE-SILVA, D.; ROCHA, M.M.; FURTADO, M.F.; SERRANO, S.M.T.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; HO, P.L. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6(3): e1554, 2012.
- ZELANIS, A.; TASHIMA, A.K.; ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.; CAMARGO, A.C.M.; HO, P.L.; SERRANO, S.M.T. Analysis of the Ontogenetic variation in the Venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **J Proteome Research**. v. 9(5), p. 2278-2291, 2010.
- ZIELINSKA, D.F.; GNAD, F.; SCHROPP, K.; WISNIEWSKI, J.R.; MANN, M. Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionary distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery. **Molecular Cell**, v. 46, p. 542-548, 2012.

## 8. Anexos

### 8.1. Tabelas Suplementares

**Tabela Suplementar 1.** Identificação de proteínas presentes no proteoma do veneno de *B. alcatraz* por digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS.

**Tabela Suplementar 2.** Quantificação label free das proteínas identificadas nos venenos do grupo Jararaca.

**Tabela Suplementar 3.** Quantificação label free das proteínas identificadas entre os venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*.

**Tabela Suplementar 4.** Quantificação label free das proteínas identificadas entre os venenos de *B. jararaca* e *B. insularis*.

**Tabela Suplementar 5.** Quantificação label free das proteínas identificadas entre os venenos de *B. alcatraz* e *B. insularis*.

**Tabela Suplementar 6.** Peptídeos identificados na análise peptidômica do veneno de *B. alcatraz*, por LC-MS/MS e análise pelo programa Peaks Studio (sequenciamento de novo).

**Tabela Suplementar 7.** Peptídeos identificados na análise peptidômica do veneno de *B. alcatraz*, por LC-MS/MS e análise pelo programa Peaks Studio (busca em banco de dados).

**Tabela Suplementar 8.** Lista de grupos de proteínas veneno de *B. alcatraz* identificados nas frações com afinidade pelas lectinas WGA, PN e ConA, por digestão com tripsina e LC-MS/MS, e análise pelo programa MaxQuant.

## Débora Andrade Silva

---

### Dados pessoais

**Nome** Débora Andrade Silva  
**Nascimento** 21/10/1988 - São Paulo/SP - Brasil  
**CPF** 365.585.398-02  
**Endereço eletrônico:** debora.dede@gmail.com

---

### Formação acadêmica/titulação

**2013** Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Orientador: Solange Maria de Toledo Serrano

**2008 - 2013** Graduação em Farmácia-Bioquímica.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Identificação dos N-glicanos presentes no veneno de *Bothrops jararacussu* por espectrometria de massas  
Orientador: Aline Soriano Lopes  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**2003 - 2006** Ensino Profissional de nível técnico em Técnico em Química.  
Escola Técnica Oswaldo Cruz, ETOC, Brasil

---

### Histórico profissional

#### 1. Instituto Butantan - IBU

---

##### Vínculo institucional

**2013 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estudante de Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

**2011 - 2012** Vínculo: Bolsista Cnpq, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**2008 - 2010** Vínculo: Bolsista Cnpq, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**2006 - 2008** Vínculo: Bolsista Fapesp TT 2 , Enquadramento funcional: Técnica de laboratório , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

---

## Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

1. Zelanis, A., **Andrade-Silva, D**, Rocha, M. M., Furtado, M. F., Serrano, S. M. T., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Ho, P L. A Transcriptomic View of the Proteome Variability of Newborn and Adult Bothrops jararaca Snake Venoms. Plos Neglected Tropical Diseases. , v.6, p.e1554 - , 2012.
2. Fry, B G., Scheib, H, Junqueira de Azevedo, I.L.M., **Silva, D. A**, Casewell, N R. Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. Toxicon (Oxford). , v.59, p.696 - 708, 2012.
3. Ching, A T. C., Paes Leme, A F., Zelanis, A, Rocha, M M. T., Furtado, M F D., **Silva, D A**, Trugilho, M. R. O., da Rocha, S L. G., Perales, J, Ho, P L., Serrano, S. M. T., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M. Venomics Profiling of Thamnodynastes strigatus unveils matrix metalloproteinases and other novel proteins recruited to the toxin arsenal of rear-fanged snakes.. Journal of Proteome Research (Print). , v.11, p.1152 - 1162, 2012.
4. Corrêa-Netto, C., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., **Silva, D. A.**, Ho, P L., Leitão-de-Araújo, M., Alves, M L M., Sanz, L, Foguel, D, Zingali, R B, Calvete, J J. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, Micrurus altirostris and M. corallinus. Journal of Proteomics. , v.28, p.1 - 15, 2011.
5. Ferreira, D. M., Darrieux, M., **SILVA, D. A.**, Leite, L. C. C., Ferreira, J. M. C., Ho, P. L., Miyaji, E. N., Oliveira, M. L. S.Characterization of Protective Mucosal and Systemic Immune Responses Elicited by Pneumococcal Surface Protein PspA and PspC Nasal Vaccines against a Respiratory Pneumococcal Challenge in Mice. Clinical and Vaccine Immunology. , v.16, p.636 - 645, 2009.
6. Campos, I, Darrieux, M, Ferreira, D, Miyaji, E, **Silva, D. A.**, Areas, A, Aires, K, Leite, L, Ho, P, Oliveira, M. Nasal immunization of mice with Lactobacillus casei expressing the Pneumococcal Surface Protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against Streptococcus pneumoniae challenge. Microbes and Infection. , v.10, p.481 - 488, 2008.

### Currículo Lattes

<http://lattes.cnpq.br/0554948941900699>