**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LUCIANA BERTHOLIM NASCIBEN

**Análise proteômica da atividade proteolítica
do HF3, uma metaloproteinase do
veneno da *Bothrops jararaca*,
no plasma humano e de serpente.**

Versão original da Dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

28/08/2014

LUCIANA BERTHOLIM NASCIBEN

Análise proteômica da atividade proteolítica
do HF3, uma metaloproteinase do
veneno da *Bothrops jararaca*,
no plasma humano e de serpente.

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

2014

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

Nasciben, Luciana Bertholim
N244a Análise proteômica da atividade proteolítica do HF3, uma
metaloproteinase do veneno da *Bothrops jararaca*, no plasma
humano e de serpente / Luciana Bertholim Nasciben. -- São Paulo,
2014.
169p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Serrano, Solange Maria de Toledo

1. Proteínas : Bioquímica 2. Metaloproteinases 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 "Análise proteômica da atividade proteolítica do HF3, uma metaloproteinase do veneno de Bothrops jararaca, no plasma humano e de serpente", **protocolo nº 881/12**, sob a responsabilidade de Solange Maria de Toledo Serrano e Luciana Bertholim Nasciben – 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 08/02/2012.

We certify that the research entitled "Proteomic analysis of the proteolytic activity of HF3, a metalloproteinase from the venom of Bothrops jararaca, upon human and snake plasma", **protocol number 881/12**, under the responsibility of Solange Maria de Toledo Serrano and Luciana Bertholim Nasciben – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research – is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 02/08/2012.

Vigência do Projeto: 03/2012 – 07/2013 Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada	Nº de animais/espécie 3 serpentes Bothrops jararaca (M, F)
--	---

São Paulo, 14 de fevereiro de 2012

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise proteômica da atividade proteolítica do HF3, uma metaloproteinase do veneno da Bothrops jararaca, no plasma humano e de serpente

Pesquisador: Solange Maria de Toledo Serrano

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 19892213.7.0000.5473

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 439.773

Data da Relatoria: 10/10/2013

Apresentação do Projeto:

O veneno da serpente Bothrops jararaca (conhecida popularmente como jararaca) contém uma proteína denominada HF3 (fator hemorrágico 3). Esta proteína é responsável por muitos dos efeitos do envenenamento. Este trabalho pretende estudar quais proteínas do plasma, a parte líquida e clara do sangue, são afetadas pela atividade do HF3. Para isso será adicionada a proteína HF3 ao plasma humano in vitro, ou seja, os testes serão realizados em tubos de ensaio.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral projeto é analisar o degradoma (repertório de substratos) in vitro do HF3 sobre proteínas do plasma humano e analisar a especificidade primária do HF3 (sequência de aminoácidos consenso adjacentes ao sítio de clivagem) por meio de uma biblioteca de peptídeos derivada de proteínas plasmáticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos para doadores. As pessoas envolvidas neste estudo doarão 10 ml de sangue total, coletado por profissional habilitado através de punção venosa, e não serão expostas a técnicas cirúrgicas ou teste de fármacos. Todos os ensaios serão realizados in vitro.

Não haverá benefício direto, já que se trata de pesquisa básica voltada para o estudo das alterações do conteúdo proteico do plasma após incubação com uma protease.

Endereço: Rua Pedro Vicente, 625

Bairro: Canindé

CEP: 01.213-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3775-4569

Fax: (11)3775-4570

E-mail: cep_ifsp@ifsp.edu.br

Continuação do Parecer: 439.773

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem clara e objetiva e não há problema relacionado à questão ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão adequados.

Recomendações:

O tamanho citado da amostra é nove, mas, como triplicatas do material coletado não são consideradas novas amostras, convém corrigir o N = 3, considerando que os doadores indicados na metodologia são três.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto deve ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

nove

SAO PAULO, 29 de Outubro de 2013

Assinador por:
Vera Lucia Saikovitch
(Coordenador)

Endereço: Rua Pedro Vicente, 625

Bairro: Canindé

CEP: 01.213-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3775-4569

Fax: (11)3775-4570

E-mail: cep_ifsp@ifsp.edu.br

Ao meu pai Leonildo, pela sua força e exemplo de vida
À minha mãe Lucia, pelo sua dedicação e amor incondicionais
Ao meu anjo companheiro Vitor

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Solange Serrano, pela sua orientação neste trabalho, pela sua confiança e amizade, e especialmente por ter acreditado no meu trabalho e me acolhido novamente em seu grupo.

Aos queridos amigos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA):

Dr. André Zelanis, pela sua colaboração, orientação e por sempre compartilhar seus ricos conhecimentos em espectrometria de massas e degradômica;

Ms. Ana Karina de Oliveira, por ter cedido o HF3 utilizado neste estudo, pela sua infinita paciência e disposição em ajudar nos experimentos, e pela sua amizade;

Dra. Amanda Asega e Dra. Milene Menezes, pelos ensinamentos, pelo apoio, pela ajuda e pela amizade. É muito bom poder contar com vocês!

Eduardo Kitano, pelo auxílio e ensinamentos nos experimentos de espectrometria de massas;

Dra. Aline Lopes, Dra. Ana Helena Pagotto, Débora Andrade, Edson Takeshi, Ms. Gabriela Dias, Ismael Lima e Ms. Pollyanna Campos. Cada um de vocês contribuiu de alguma maneira para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço imensamente por tê-los encontrado e por ter feito parte deste grupo!

Aos pesquisadores, pós-graduandos, estagiários e funcionários do LETA.

Ao Dr. Alexandre Tashima, pelos seus ensinamentos e pelo auxílio na análise bioinformática com o programa Peaks Studio.

À Dra. Kathleen Grego, do laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela coleta da amostra de sangue de *Bothrops jararaca* utilizada neste estudo.

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

Ao Dr. Alexander Henning Ulrich, Dra. Flávia Carla Meotti e Dr. Mauricio da Silva Baptista pelas sugestões apresentadas durante meu exame de qualificação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (processos 98/14307-9, 11/16623-1, e 13/07467-1).

Agradeço também a Deus e aos meus pais, Lucia e Leonildo, pelo seu amor, dedicação e por terem me ensinado que o conhecimento é o nosso bem mais valioso.

Ao meu irmão Leandro, por ser meu companheiro e por ser alguém com quem sempre poderei contar.

Ao meu amor Vitor, por ser o meu grande incentivador e por estar ao meu lado em todos os momentos.

RESUMO

Bertholim, L. **Análise proteômica da atividade proteolítica do HF3, uma metaloproteinase do veneno da *Bothrops jararaca*, no plasma humano e de serpente.** 2014. 169 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A hemorragia gerada por metaloproteinases de venenos de serpentes é um fenômeno complexo que resulta na ruptura de capilares e extravasamento de sangue. O HF3 (fator hemorrágico 3) é uma metaloproteinase da classe P-IIIa, extremamente hemorrágica, isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Análises de sua atividade proteolítica sobre proteínas isoladas mostraram que componentes do plasma e da matriz extracelular são hidrolisados pelo HF3. Estudos que utilizaram abordagens proteômicas para analisar os efeitos do HF3 na derme e plasma de camundongos evidenciaram novos alvos desta metaloproteinase, incluindo proteínas intracelulares, extracelulares e plasmáticas. Entretanto, os mecanismos envolvidos na alta atividade hemorrágica apresentada pelo HF3, principalmente no que se diz respeito ao papel da clivagem de proteínas plasmáticas no contexto da hemorragia, ainda não são conhecidos. Assim, o objetivo principal deste estudo foi analisar o degradoma do HF3 no plasma humano. Paralelamente, também realizamos a análise da atividade do HF3 sobre as proteínas do plasma da *B. jararaca*. Para tanto, abordagens para a depleção das proteínas mais abundantes e enriquecimento de proteínas pouco abundantes do plasma humano foram utilizadas visando minimizar o intervalo de concentração dinâmica de proteínas, e assim permitir a avaliação da atividade proteolítica do HF3 sobre um amplo espectro de proteínas, e possibilitar a

detecção dos produtos de degradação por espectrometria de massas. Dessa forma, quatro amostras de plasma humano foram utilizadas neste estudo: plasma total, plasma depletado de albumina, plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes e plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes. A incubação das amostras de plasma humano com o HF3 foi realizada na proporção enzima:substrato 1:100 (p/p), por 2 h a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, as frações peptídica e proteica foram analisadas. A identificação dos peptídeos presentes na fração peptídica do plasma, por espectrometria de massas, revelou os produtos oriundos da hidrólise de proteínas pelo HF3, e permitiu a análise dos pontos de clivagem. O efeito do HF3 sobre o plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes também foi analisado por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, seguida de digestão de proteínas *in gel* com tripsina, e identificação das proteínas presentes em bandas diferenciais, por espectrometria de massas. Considerando todas as abordagens utilizadas neste estudo, 62 proteínas plasmáticas foram identificadas como tendo sido clivadas pelo HF3. Algumas destas proteínas corroboram estudos anteriores e outras são consideradas como candidatas a substrato desta metaloproteinase. Dentre os novos alvos, destacam-se proteínas da cascata da coagulação sanguínea e do sistema complemento, além de inibidores de proteinases, sugerindo que esta metaloproteinase pode agir de maneira desregulada, não sendo inibida pelos inibidores plasmáticos, e causando o desequilíbrio da hemostasia. A atividade do HF3 sobre as proteínas do plasma da *B. jararaca* foi verificada pela sua incubação com o plasma total, resultando na geração de poucos peptídeos que, no entanto, não resultaram em identificação de substratos da metaloproteinase por espectrometria de massas. Em conjunto, nossos dados reforçam achados prévios sobre o repertório de substratos do HF3 no plasma humano,

apontam novos substratos e fornecem pistas para a compreensão da atividade hemorrágica do HF3.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*, degradômica, espectrometria de massas, HF3, plasma, proteômica.

ABSTRACT

Bertholim, L. **Proteomic analysis of the proteolytic activity of HF3, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*, upon human and snake plasma.** 2014. 169 p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases is a complex phenomenon resulting in capillary disruption and blood extravasation. HF3 (hemorrhagic factor 3) is an extremely hemorrhagic, P-IIIa class metalloproteinase, isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. The analysis of its proteolytic activity on isolated proteins showed that plasma and extracellular matrix proteins are hydrolyzed by HF3. Studies using proteomic approaches to analyze the effects of HF3 in the mouse skin and plasma showed new targets of this metalloproteinase, including intracellular, extracellular and plasma proteins. However, the mechanisms involved in the hemorrhagic process generated by HF3, particularly the role of the cleavage of plasma proteins in the context of the hemorrhage, remain not fully understood. Thus, the main objective of this study was to analyze the degradome of HF3 in human plasma. In parallel, we also carried out the analysis of the activity of HF3 on *B. jararaca* plasma. For this purpose, approaches for the depletion of the most abundant proteins and for the enrichment of low abundant proteins of the human plasma were used to minimize the dynamic range of protein concentration, in order to assess the proteolytic activity HF3 on a wide spectrum of proteins, and to detect the degradation products by mass spectrometry. Thus, four samples of human plasma were used in this study: whole plasma, albumin-depleted plasma, plasma depleted of the 20 most abundant proteins, and plasma

enriched of low abundance proteins. Incubation of these samples with HF3 was carried out at a 1:100 (w/w) enzyme-to-substrate ratio, for 2 h, at 37°C. After the incubation time, the protein and peptide fractions were analyzed. The identification of peptides present in the plasma peptide fraction by mass spectrometry revealed the products from the hydrolysis of proteins by HF3 and allowed the analysis of the cleavage sites. The effect of HF3 on the sample of plasma enriched of low-abundance proteins was also analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by in gel protein digestion with trypsin of differential bands and identification by mass spectrometry. Considering all the approaches used in this study, 62 plasma proteins were identified as cleaved by HF3. Some of these proteins corroborate previous studies and others are considered as substrate candidates of HF3. Among the new targets, there are proteins of the coagulation cascade and of the complement system, as well as plasma proteinase inhibitors, suggesting that this metalloproteinase escapes inhibition and may act in an unregulated fashion causing the imbalance of hemostasis. The activity of HF3 on *B. jararaca* plasma proteins was analyzed by its incubation with whole plasma, as described above, and resulted in the generation of a low number of peptides, which, however, did not result in the identification of any substrate by mass spectrometry. Taken together, our data confirm previous findings on the repertoire of substrates of HF3 in the human plasma and suggest new substrate candidates that may contribute to the understanding of the hemorrhagic effect of HF3.

Key words: *Bothrops jararaca*, degradomics, hemorrhagic factor 3, mass spectrometry, plasma, proteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da classificação das SVMPs.

Figura 2. Linha do tempo dos estudos de caracterização do HF3.

Figura 3. Intervalos de concentração de 70 proteínas do plasma humano.

Figura 4. Ilustração dos métodos utilizados neste estudo.

Figura 5. Perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida do plasma humano submetido à cromatografia na resina Blue Sepharose CL-6B.

Figura 6. Perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida do plasma humano submetido à cromatografia na resina ProteoPrep 20.

Figura 7. Perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida do plasma humano submetido ao enriquecimento de proteínas pouco abundantes com ProteoMiner.

Figura 8. Esquema das estratégias analíticas envolvidas neste estudo.

Figura 9. Perfil eletroforético em gel de SDS-polacrilamida das amostras de plasma incubadas com HF3.

Figura 10. Perfil eletroforético em gel de SDS-polacrilamida da amostra de P(enrq) incubada com HF3.

Figura 11. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(T) após incubação com o HF3. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

Figura 12. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(depA) após incubação com o HF3. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

Figura 13. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(dep20) após incubação com o HF3. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

Figura 14. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(enrq) após incubação com o HF3. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

Figura 15. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq), após incubação com o HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Figura 16. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq), após incubação com o HF3. Identificação por *Peaks*.

Figura 17. Diagrama de Venn das proteínas identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do plasma (todos os tratamentos e plasma total) após incubação com o HF3 e consideradas alvos da proteinase. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

Figura 18. Diagrama de Venn das proteínas identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do plasma após incubação com o HF3 e consideradas alvos da proteinase. Combinação dos resultados obtidos nos experimentos realizados com o P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq). Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

Figura 19. *Heat maps* das ocorrências relativas de aminoácidos em porcentagem e ocorrência de aminoácidos em sítios de clivagem em relação à sua abundância natural, nas posições P6-P6', verificados a partir da identificação dos peptídeos

gerados pela atividade proteolítica do HF3 sobre proteínas plasmáticas. Identificação por *Mascot/TPP*.

Figura 20. *Heat maps* das ocorrências relativas de aminoácidos em porcentagem e ocorrência de aminoácidos em sítios de clivagem em relação à sua abundância natural, nas posições P6-P6', verificados a partir da identificação dos peptídeos gerados pela atividade proteolítica do HF3 sobre proteínas plasmáticas. Identificação por *Peaks*.

Figura 21. Atividade proteolítica do HF3 sobre proteínas isoladas (componentes C3 e C4 do sistema complemento, plasminogênio e protrombina).

Figura 22. Sequência de aminoácidos do fibrinogênio humano (cadeias alfa, beta e gama) indicando os peptídeos identificados como produto de hidrólise pelo HF3.

Figura 23. Perfis de especificidade primária do HF3 verificados a partir de sua incubação com uma biblioteca de peptídeos tripsínica de proteínas do plasma.

Figura 24. Perfil eletroforético do plasma de *B. jararaca* após o tratamento com a resina Blue Sepharose CL-6B em gel de SDS-poliacrilamida.

Figura 25. Perfil eletroforético do plasma de *B. jararaca* incubado com o HF3 em gel de SDS-polacrilamida.

Figura 26. Sequência de aminoácidos do plasminogênio indicando as regiões em foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3.

Figura 27. Sequência de aminoácidos da protrombina indicando as regiões em foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3.

Figura 28. Sequência de aminoácidos do alfa-2-antiplasmina indicando as regiões em foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3.

Figura 29. Sequência de aminoácidos do fator V da cascata de coagulação indicando as regiões em foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3.

Figura 30. Sequência de aminoácidos do fator XIII (cadeia A) da cascata de coagulação indicando as regiões em foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3.

Figura 31. Sequências de aminoácidos do cininogênio de alto peso molecular e de baixo peso molecular, indicando as regiões em que foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3.

Figura 32. Substratos do HF3 identificados no plasma humano.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de proteínas presentes nas faixas diferenciais das amostras de P(enrq) controle e tratada com HF3.

Tabela 2. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(T) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Tabela 3. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(T) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*.

Tabela 4. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(depA) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Tabela 5. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(depA) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*.

Tabela 6. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(dep20) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Tabela 7. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(dep20) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*.

Tabela 8. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(enrq) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Tabela 9. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(enrq) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMs – disintegrina e metaloproteinase, do inglês *A Disintegrin And Metalloproteinase*

ADAMTSs – disintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina, do inglês *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*

BCA – ácido bicinconínico

BJ46a – inibidor de metaloproteinases isolado do soro de *B. jararaca*

BPP – peptídeo potenciador de bradicinina, do inglês *Bradykinin-Potentiating Peptide*

CHAPS – 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato

CID – dissociação induzida por colisão, do inglês *Collision Induced Dissociation*

CRISP – proteínas secretórias ricas em cisteína, do inglês *Cysteine-Rich Secretory Protein*

CTL – lectina do tipo C, do inglês *C-type Lectin*

DC – domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas

DDA – aquisição dependente de dados, do inglês *Data Dependent Acquisition*

DM43 – inibidor de metaloproteinases isolado do soro de *Didelphis marsupialis*

DTT – ditioneitol

FDR – taxa de falso-positivo, do inglês *False Discovery Rate*

FTMS – espectrometria de massas com transformada de *Fourier*, do inglês *Fourier Transform Mass Spectrometry*

HCD – dissociação induzida por colisão de maior energia, do inglês *Higher Energy Collision Dissociation*

HSF – fator sérico Habu, do inglês *Habu Serum Factor*, da serpente *Trimeresurus flavoviridis*

HUPO – *Human Proteome Organization*

IAA – iodoacetamida

LAAO – L-aminoácido oxidase

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

M.H.D. – dose mínima hemorrágica, do inglês *Minimum Hemorrhagic Dose*

MMPs – metaloproteinases de matriz, do inglês *Matrix Metalloproteinases*

P(dep20) – plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes com a coluna de imunoafinidade ProteoPrep 20

P(depA) – plasma depletado de albumina com a resina Blue Sepharose CL-6B

P(enrq) – plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes com ProteoMiner

P(T) – plasma total

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PICS: *Proteomic Identification of protease Cleavage Sites*

PLA2 – fosfolipase A2

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonila

Q-TOF – Quadrupolo –Tempo de Vão

SDS – dodecil sulfato de sódio

SVMP – metaloproteinases de veneno de serpente, do inglês *Snake Venom Metalloproteinase*

SVSP – serinoproteinases de veneno de serpente, do inglês *Snake Venom Serine Proteinase*

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametil etileno-diamino

TPP – plataforma Trans-Proteomic Pipeline

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPs)	26
1.2 Fator Hemorrágico 3 (HF3).....	32
1.3 Inibidores naturais de metaloproteinases de venenos de serpentes	36
1.4 Biblioteca de peptídeos para determinação do sítio de clivagem de proteinases	37
1.5 Degradômica	39
1.6 Plasma e o <i>dynamic range</i> de proteínas.....	40
1.7 Estudo dos substratos do HF3	43
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 HF3 (Hemorrhagic Factor 3).....	45
3.2 Obtenção do plasma humano.....	45
3.3 Obtenção do plasma de <i>B. jararaca</i>	45
3.4 Quantificação de proteínas e peptídeos	46
3.5 Eletroforese de proteínas em gel SDS-poliacrilamida.....	46
3.6 Coloração de proteínas	47
3.7 Preparação do plasma humano para análise proteômica	48
3.7.1 Cromatografia de afinidade à resina Blue Sepharose CL-6B	48
3.7.2 Cromatografia de afinidade à resina ProteoPrep 20.....	49
3.7.3 Enriquecimento de proteínas com ProteoMiner.....	50
3.8 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma humano (degradoma).....	51
3.8.1 Incubação do plasma com o HF3.....	53
3.8.2 Separação das frações peptídica e proteica do degradoma.....	53
3.8.3 Análise da fração proteica do degradoma	53
3.8.3.1 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.....	53
3.8.3.2 Digestão <i>in gel</i> e identificação de proteínas por espectrometria de massas ..	54
3.8.4 Análise da fração peptídica do degradoma	57
3.8.4.1 Preparação da fração peptídica para identificação	57
3.8.4.2 Identificação de peptídeos por espectrometria de massas	58
3.8.5 Validação de alguns substratos do HF3 no plasma.....	61
3.8.6 Identificação dos peptídeos gerados pela clivagem do fibrinogênio isolado	61

3.9 Geração de uma biblioteca de peptídeos tripsínicos derivada do plasma humano para determinação da especificidade primária do HF3	62
3.9.1 Depleção de albumina do plasma humano utilizando Affi- Gel® Blue (BioRad)	62
3.9.2 Geração da biblioteca de peptídeos tripsínicos	63
3.9.3 Incubação da biblioteca de peptídeos com o HF3	64
3.9.4 Identificação de peptídeos por espectrometria de massas	65
3.10 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma de <i>B. jararaca</i>	67
3.10.1 Depleção de albumina do plasma e incubação com o HF3	67
3.10.2 Análise da fração peptídica do sobrenadante	67
3.10.3 Análise da fração proteica	68
4. RESULTADOS.....	69
4.1 Preparação do plasma humano para análise proteômica	69
4.1.1 Cromatografia de afinidade à resina Blue Sepharose CL-6B	70
4.1.2 Cromatografia de afinidade à resina ProteoPrep 20.....	71
4.1.3 Enriquecimento de proteínas pouco abundantes com ProteoMiner.....	72
4.2 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma humano (degradoma).....	74
4.2.1 Análise da fração proteica.....	77
4.2.2 Análise da fração peptídica	83
4.2.2.1 Critérios para a seleção de proteínas plasmáticas clivadas pelo HF3.....	84
4.2.2.2 Plasma total.....	85
4.2.2.3 Plasma depletado de albumina (Blue Sepharose CL-6B)	88
4.2.2.4 Plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes (ProteoPrep 20).....	91
4.2.2.5 Plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes (ProteoMiner)	95
4.2.2.6 Comparação dos resultados obtidos com as diferentes amostras de plasma	98
4.2.2.7 Comparação dos resultados obtidos pelas abordagens <i>Mascot/TPP</i> e <i>Peaks</i>	102
4.2.2.8 Mapeamento da especificidade enzimática primária do HF3 sobre proteínas plasmáticas	103
4.3 Validação de alguns substratos do HF3 no plasma	109
4.4 Identificação dos peptídeos gerados pela clivagem do fibrinogênio isolado pelo HF3	111
4.5 Mapeamento de sítios de clivagem do HF3 em uma biblioteca de peptídeos derivada do plasma humano	114
4.6 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma de <i>B. jararaca</i> (degradoma).....	117

4.6.1 Preparação do plasma de <i>B. jararaca</i> para análise proteômica	117
4.6.2 Análise das frações peptídica e proteica	118
5. DISCUSSÃO	120
5.1 Tratamentos do plasma humano para a análise degradômica.....	120
5.2 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma humano (degradoma).....	121
5.2.1 Análise da fração proteica.....	121
5.2.2 Análise da fração peptídica	123
5.2.2.1 Influência do método de preparação do plasma humano para a identificação de substratos do HF3 por análise peptidômica.....	124
5.2.2.2 Abordagens bioinformáticas	124
5.2.2.3 Análise da especificidade primária do HF3 na clivagem de proteínas plasmáticas	125
5.3 Substratos do HF3 no plasma humano	127
5.3.1 Confirmação de substratos já descritos na literatura	127
5.3.2 Novos substratos	130
5.4 Avaliação da especificidade primária do HF3 em uma biblioteca de peptídeos tripsínicos derivada do plasma humano	147
5.5 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma da <i>B. jararaca</i>	148
6. CONCLUSÕES	150
7. REFERÊNCIAS.....	154
ANEXOS	169

1. INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos constituem uma séria condição médica, que afeta principalmente a população de comunidades rurais em países tropicais e subtropicais. Estima-se que, por ano, ao menos 421.000 envenenamentos por serpentes ocorram no mundo todo, sendo que 20.000 casos resultam em morte (Kasturiratne et al, 2008). Entretanto, estimativas mais precisas acerca da mortalidade e morbidade permanente resultantes de acidentes ofídicos ainda são desconhecidas em muitas regiões do mundo, o que pode subestimar o real impacto deste problema de saúde pública (Gutiérrez et al., 2013). Tendo sido considerado uma condição endêmica em comunidades mais pobres e marginalizadas, o acidente ofídico foi incluído na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2009. No Brasil, são registrados 20.000 novos casos por ano, dos quais 90% são causados por serpentes do gênero *Bothrops*, que pertencem à família Viperidae (BRASIL, 2001).

Dada a importância dos acidentes ofídicos no âmbito da saúde pública de maneira global, os estudos envolvendo venenos de serpentes têm como finalidade não somente o aprimoramento dos tratamentos disponíveis em casos de acidentes, como também a elucidação de diversos mecanismos farmacológicos através da investigação da composição do veneno. Um exemplo clássico é a descoberta de um fator potenciador de bradicinina, isolado do veneno de *B. jararaca* (Ferreira, 1965), que deu origem ao medicamento captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, amplamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronariana.

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* causa, em sua maioria, lesões locais, como edema, bolhas e necrose, além de distúrbios da coagulação,

incluindo alterações da função plaquetária e hemorragia (BRASIL, 2001). Os venenos de serpentes constituem um desafio no que se diz respeito ao entendimento da relação entre seus componentes e os efeitos observados no envenenamento, e despertam grande interesse na comunidade científica. Estudos de análise transcriptômica da glândula de veneno de serpentes *B. jararaca* indicam que as principais famílias de toxinas presentes entre os transcritos são: metaloproteinases (SVMPs - *Snake Venom Metalloproteinases*), serinoproteinases (SVSPs - *Snake Venom Serine Proteinases*), fosfolipases A2 (PLA2 - *phospholipase A2*), lectinas do tipo C (CTL - *C-type lectins*), disintegrinas, L-aminoácido oxidases (LAAO - *L-amino acid oxidase*), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP - *cysteine-rich secretory proteins*), fatores de crescimento endoteliais vasculares (svVEGF - *snake venom nerve growth factor*), fatores de crescimento neurais (svNGF - *snake venom nerve growth factor*) e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP - *bradykinin-potentiating peptides*) (Cidade et al., 2006; Zelanis et al., 2012). Enzimas proteolíticas são abundantes no veneno da *B. jararaca*, sendo que 30% dos transcritos totais da glândula de veneno adulta correspondem a SVMPs enquanto que aqueles correspondentes a SVSPs chegam a 8% (Zelanis et al, 2012).

A concentração relativa de determinados membros das famílias de toxinas é um fator determinante da propriedade característica de cada veneno (Fox e Serrano, 2008a), e estudos anteriores demonstraram que a predominância de proteinases tem estreitas relações com a patogênese relacionada ao envenenamento, como sangramento, coagulação intravascular, edema, inflamação e necrose (Iwanaga et al., 1979; Bjarnason e Fox, 1994; Fox e Serrano, 2005; Kini, 2006).

1.1 Metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPs)

A hemorragia e a mionecrose estão entre os efeitos locais mais drásticos associados ao envenenamento não somente por serpentes do gênero *Bothrops*, como por membros da família Viperidae em geral. Em casos de envenenamento menos severos, a hemorragia restringe-se ao local da picada, ou acomete áreas maiores do membro afetado; porém, em casos de envenenamentos severos, sangramentos em órgãos distantes do local de envenenamento, como coração, pulmões, rins e cérebro podem ser observados (Ohsaka et al., 1978; Ownby et al., 1978; Bjarnason e Fox, 1994).

As SVMPs são as principais toxinas responsáveis pela hemorragia observada no quadro de envenenamento, devido, sobretudo, à atividade destas enzimas sobre componentes da matriz extracelular e da lâmina basal dos vasos sanguíneos (Gutierrez et al., 2005; Fox e Serrano, 2005), além do importante papel na patogênese pró-inflamatória local (Gutierrez et al., 2005; Moura-da-Silva et al., 2007).

As SMVPs são hidrolases que apresentam um íon inorgânico (geralmente zinco) coordenado pelas cadeias laterais dos três resíduos de histidina presentes na sequência H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H, altamente conservada nessas proteínas (Fox e Serrano, 2005; 2008b). Elas são membros da família M12 das metaloproteinases (*MEROPS database*), na subfamília das Reprolisinas (M12B). Esta denominação (*reprolysin* - do inglês *reptilian* e *reproductive*) foi atribuída por Bjarnason e Fox (1994), na primeira tentativa de classificação das metaloproteinases presentes nos venenos de serpentes, que se baseou nas similaridades estruturais entre as SVMPs (de répteis) e as ADAMs (do inglês *A Disintegrin And Metalloproteinase*), proteínas ligadas à reprodução humana. De forma geral, as SVMPs, as ADAMs, e também as ADAMTSs (do inglês *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin*

Motifs) têm em comum uma estrutura modular, contendo um domínio proteinase associado a domínios não catalíticos.

As ADAMs constituem uma grande família de *shedases* de mamíferos, que são ligadas à membrana celular, e são responsáveis pelo processamento de várias proteínas de superfície das células, incluindo formas latentes dos fatores de crescimento, citocinas e seus receptores (Black e White, 1998; Murphy, 2008). Diversos estudos demonstram que elas estão envolvidas em processos de fertilização e desenvolvimento, assim como processos patológicos como câncer, inflamação, asma e doença de Alzheimer (Mochizuki e Okada, 2007; Garton et al., 2006; Holgate et al., 2006; Murphy, 2008). As ADAMTSs constituem um grupo de proteínas solúveis que têm atividades biológicas envolvidas no processamento e degradação de proteínas de matriz, degradação de proteoglicanos, inibição da angiogênese, hemostasia, fertilidade e inflamação (Porter et al., 2005).

Com base nas estruturas das proteínas maduras e seus respectivos precursores, atualmente as SVMPs são divididas em 3 classes (P-I, P-II e P-III) conforme mostrado na Figura 1 (Fox e Serrano 2008b), que são divididas em subclasses de acordo com a estrutura apresentada no veneno, após sofrerem modificações pós-traducionais.

Figura 1. Esquema da classificação das SVMPs. A coluna da esquerda representa a estrutura da proteína nascente (precursor) e a coluna da direita representa a estrutura da proteína madura. Interrogações indicam que o produto processado não foi encontrado no veneno. P: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio; S: *spacer*, região espaçadora; *Dis-like*: domínio tipo-disintegrina; *Cys-rich*: domínio rico em cisteínas; Lec: domínio tipo-lectina. Fonte: Fox e Serrano, 2008b.

Na Figura 1, observamos que o primeiro elemento comum a todas as SVMPs é o peptídeo sinal, que guia a proteína nascente ao retículo endoplasmático e é removido durante o transporte para esta organela (Bjarnason e Fox, 1994; Fox e Serrano 2008b). Além do peptídeo sinal, análises de cDNA mostraram que a forma precursora (zimogênio) de todas as SVMPs contém um pró-domínio composto por aproximadamente 170 aminoácidos, contendo a sequência conservada P-K-M-C-G-V-T, que tem correlação com o motivo "*cysteine-switch*" encontrado nas MMPs (do inglês *Matrix Metalloproteinase*) e pode estar envolvido na inativação da enzima dentro das glândulas (Grams et al., 1993; Nagase e Woessner, 1999). Nas MMPs, o resíduo cisteinil se liga ao zinco presente no sítio ativo, prevenindo que água ou substratos acessem a região do sítio ativo e inibindo a catálise, até que o pró-domínio

seja desligado por um evento catalítico (Grams et al., 1993). Tanto o pró-domínio quanto o peptídeo sinal estão presentes apenas na forma nascente das SVMPs (precursores). Conforme mencionado anteriormente, todas as SVMPs possuem o domínio proteinase (catalítico) contendo a sequência consenso H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H onde ocorre a ligação do zinco, e também, na sua porção C-terminal, a sequência CI/VM, conhecida como *Met-turn* (Bode et al. 1993). Com a definição da primeira estrutura cristalográfica de uma SVMP da classe P-III, a VAP1 (*Vascular Apoptosis-Inducing Protein 1*), uma metaloproteinase dimérica da classe P-IIIc do veneno de *Crotalus atrox*, foram determinados, além do sítio de ligação do átomo de zinco, três sítios de ligação para íons Ca^{2+} na proteína (Takeda et al., 2006). Sequências de cDNA também mostraram a presença de uma região espaçadora (*spacer*) de aproximadamente 10 resíduos de aminoácidos na porção C-terminal do domínio metaloproteinase (Hite et al., 1992). As SVMPs apresentam diferenças com relação à presença da região espaçadora nas proteínas maduras (Fox e Serrano, 2008b).

A classe P-Ia é representada por SVMPs que apresentam apenas o domínio metaloproteinase (catalítico) na sua forma madura. Membros da classe P-II apresentam, em sua forma precursora, o domínio metaloproteinase seguido do domínio disintegrina, e podem ser subdivididos nas subclasses P-IIa a P-IIe; proteinases da subclasse P-IIa têm o seu domínio disintegrina liberado pós-traducionalmente, originando uma proteinase de estrutura semelhante àquelas da classe P-Ia e uma disintegrina; proteinases da subclasse P-IIb apresentam, em sua forma madura, os domínios metaloproteinase e disintegrina, unidos pela região espaçadora; proteinases da subclasse P-IIc, em sua forma madura, são semelhantes às proteinases da classe P-IIb, porém são diméricas; proteínas da subclasse P-IId apresentam a estrutura canônica da classe P-II, contudo o domínio metaloproteinase

nunca foi verificado no veneno, ao invés disso, especula-se que pós-traducionalmente haja a formação de disintegrinas diméricas; a subclasse P-IIe compreende disintegrinas diméricas cuja oligomerização se dá com base na associação dos domínios disintegrina de um gene precursor de disintegrinas (D-I; Figura 1) com disintegrinas provenientes de um precursor de estrutura da classe P-II (Fox e Serrano, 2008b).

SVMPs da classe P-III apresentam, em sua forma precursora, os domínios metaloproteinase, tipo-disintegrina e rico em cisteínas, e são subdivididas em P-IIla a P-IIId; membros da subclasse P-IIla mantêm os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas em sua forma madura, e membros da subclasse P-IIlc têm a mesma estrutura, porém na forma dimérica; membros da subclasse P-IIlb em sua forma madura liberam a porção correspondente aos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas (DC) por autólise; proteínas da subclasse P-IIId apresentam estrutura semelhante àquela verificada na classe P-IIla, entretanto dois domínios tipo-lectina são unidos pós-traducionalmente, por pontes de dissulfeto, ao domínio rico em cisteínas (Fox e Serrano, 2008b).

Disintegrinas são proteínas pequenas (40-90 aminoácidos), ricas em resíduos de cisteína e geradas, conforme descrito anteriormente, pelo processamento proteolítico de SVMPs precursoras da classe P-II (Kini e Evans, 1992; Calvete et al., 2005), embora recentemente tenham sido encontradas sequências de cDNA que codificam apenas disintegrinas (Okuda et al., 2002). Elas possuem uma sequência de envolvida na interação com integrinas, R-G-D, na região conhecida como *loop* de disintegrina, e que está envolvido com a inibição da agregação plaquetária mediada por integrinas e interações célula-matriz extracelular (Calvete et al., 2005). Os domínios disintegrina e tipo-disintegrina apresentam similaridade nas sequências

de aminoácidos, porém, os domínios tipo-disintegrina apresentam a sequência E-C-D em uma posição análoga àquela ocupada pela sequência R-G-D nas disintegrinas e possuem dois resíduos adicionais de cisteínas com diferente arranjo de pontes dissulfeto (Jia et al., 1997, Calvete et al., 2005). Ensaio de neutralização por anticorpos mostraram que o domínio-tipo disintegrina da jararhagina, uma SVMP da classe P-III do veneno da *B. jararaca*, possui regiões de ligação ao colágeno (Tanjoni et al., 2010).

O domínio rico em cisteínas da porção C-terminal das SVMPs da classe P-III foi assim nomeado em razão da abundância de resíduos de cisteína (13 no total) em sua estrutura. As atividades biológicas atribuídas a este domínio residem na sua habilidade em interagir com outras proteínas, como colágeno, fator de von Willebrand e integrinas (Fox e Serrano, 2008b). Os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas não foram encontrados em suas formas isoladas em venenos de serpentes, e algumas evidências indicam que a funcionalidade atribuída à associação dos dois domínios (DC) encontra-se na região do domínio rico em cisteínas (Jia et al., 1997, 2000; Kamiguti et al., 2003; Serrano et al., 2006; Fox e Serrano, 2008b; Menezes et al., 2008, 2011).

A habilidade de produzir hemorragia no local da picada é uma assinatura patológica característica do envenenamento por serpentes da família Viperidae, e a atividade hemorrágica foi identificada em metaloproteinases das classes P-I, P-II e P-III (Fox e Serrano 2005). Logo, esta característica não está necessariamente relacionada com a presença dos domínios não catalíticos na proteinase madura, embora a habilidade das SVMPs da classe P-III em gerar hemorragia seja muito mais acentuada quando comparada às outras classes (Fox e Serrano 2008b).

1.2 Fator Hemorrágico 3 (HF3)

O HF3 (fator hemorrágico 3) foi isolado do veneno da serpente *B. jararaca*, juntamente com outras duas metaloproteinases hemorrágicas (HF1 e HF2), por Assakura et al. (1986). É uma metaloproteinase da classe P-III, subclasse P-IIIa, altamente glicosilada, que apresenta massa molecular aproximada de 70 kDa, em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. O cDNA que codifica o precursor do HF3 é composto por 606 resíduos de aminoácidos, incluindo três sítios de putativos de N-glicosilação no domínio metaloproteinase e dois no domínio rico em cisteínas, e massa molecular calculada de 46,31 kDa para a forma madura (Silva et al., 2004). Seu pró-domínio contém a sequência putativa P-K-M-C-G-V-T que se assemelha ao motivo "cysteine-switch" encontrado nas MMPs (Grams et al., 1993; Nagase e Woessner, 1999), e o domínio metaloproteinase apresenta, além do motivo consenso para a ligação do átomo de zinco, H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H, no seu sítio catalítico, o resíduo de metionina conservado localizado na porção C-terminal, que é parte da sequência *Met-turn* (Bode et al. 1993). No domínio tipo-disintegrina, a sequência RGD encontrada nos domínios disintegrina é substituída pela sequência SECD (Silva et al., 2004).

O HF3 é uma SVMP extremamente hemorrágica que apresenta a dose mínima hemorrágica (M.H.D. – do inglês *Minimum Hemorrhagic Dose*) de 15 ng na derme de coelho e de 160 ng na derme de camundongo (Assakura et al., 1986; Oliveira et al., 2009). O HF3 apresenta atividade proteolítica sobre a caseína e o fibrinogênio, com atividades específicas de 17 ± 0.006 U/mg e 1.3 ± 0.17 U/mg, respectivamente (Oliveira et al., 2009) e *in vitro* gera diferentes perfis de degradação de proteínas do plasma e proteínas da matriz extracelular, importantes para a manutenção da integridade dos vasos capilares e hemostasia, como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, fator de

Willebrand, colágenos IV e VI, laminina e Matrigel™ (Oliveira et al, 2010). Apesar de o HF3 não demonstrar atividade proteolítica sobre o colágeno tipo I, a interação entre estas proteínas foi observada em ensaios de ligação em fase sólida e SPR (do inglês *Surface Plasmon Resonance*). Ainda, ensaios de ligação em fase sólida também revelaram que o HF3 interage com fibrinogênio, fibronectina, laminina e colágeno do tipo VI (Oliveira et al, 2010). O HF3 também é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e tem efeito pró-inflamatório, estimulando a fagocitose por macrófagos mediada pela integrina $\alpha M\beta 2$ (Silva et al., 2004).

Estudos que avaliaram a funcionalidade dos domínios não catalíticos do HF3 demonstraram que a proteína recombinante composta pelos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas (DC) inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno e também estimula a fagocitose por macrófagos mediada pela integrina $\alpha M\beta 2$ (Silva et al., 2004). Em outro modelo de resposta inflamatória, Menezes et al. (2008) testaram por microscopia intravital, a habilidade da proteína DC e também do domínio rico em cisteínas na forma recombinante, em fusão com a glutathione S-transferase (GST-DC e GST-C), em promover o rolamento de leucócitos na microcirculação. Este estudo demonstrou a importância do domínio rico em cisteínas no disparo de eventos pró-inflamatórios mediados pela integrina $\alpha M\beta 2$. O estudo também demonstrou que peptídeos correspondentes à região hipervariável (HVR – do inglês *Hyper Variable Region*) do domínio rico em cisteínas do HF3 também podem ativar o rolamento de leucócitos. Mutações sítio-dirigidas foram utilizadas para identificar se resíduos de aminoácidos carregados, presentes nos domínios tipo-disintegrina/rico em cisteínas (DC), seriam importantes para sua funcionalidade. Para tanto, os resíduos de Glu e Asp presentes no *loop* disintegrina do HF3 (região que abriga a tríade de aminoácidos E-C-D), bem como três resíduos de Lys presentes na

região HVR do HF3 foram substituídos por Ala. Como resultado, apenas a proteína DC contendo a mutação D/A (GST-DC-D-469A) foi obtida na forma recombinante em *Escherichia coli* e esta perdeu parcialmente a habilidade de inibir a agregação plaquetária e induzir o aumento de rolamento de leucócitos na microcirculação de camundongos (Menezes et al., 2011).

Recentemente nosso grupo utilizou ainda algumas abordagens proteômicas para avaliar a atividade proteolítica do HF3 na derme e plasma de camundongos (Paes-Leme et al., 2012). Este estudo *in vivo* demonstrou a degradação de várias proteínas da matriz extracelular (colágenos e proteoglicanos), além de proteínas citossólicas e do citoesqueleto, e ativação de collagenases, no processo hemorrágico gerado pelo HF3. Outro achado interessante deste estudo foi o fato de que algumas proteínas plasmáticas de fase aguda foram detectadas como diminuídas ou aumentadas, como resultado do efeito do HF3 (alfa-2-macroglobulina, pró-trombina, fibrinogênio, alfa-1-antitripsina, fator B do complemento, hemopexina e transtirretina) (Paes Leme et al, 2012). Neste estudo, uma série de novas proteínas que são degradadas no processo hemorrágico foram descritas, e os resultados serviram de base para o estabelecimento de novas linhas de investigação em nosso grupo.

A Figura 2 ilustra a evolução dos estudos sobre a caracterização do HF3, ao longo do tempo.

Figura 2. Linha do tempo dos estudos de caracterização do HF3.

1.3 Inibidores naturais de metaloproteinases de venenos de serpentes

As SVMPs têm papel importante nos efeitos locais e sistêmicos no envenenamento por serpentes viperídeas, porém, enquanto no lúmen da glândula de veneno, elas não afetam os tecidos das glândulas secretórias que produzem o veneno (Fox e Serrano, 2008b; Odell et al., 1998; Robeva et al. 1991). Alguns estudos sugerem que o pH ácido do lúmen das glândulas das serpentes que produzem o veneno, juntamente com tripeptídeos contendo resíduos de ácido piroglutâmico, contribuem para inibição da atividade proteolítica das SVMPs na glândula de veneno (Odell et al., 1998; Robeva et al. 1991).

Nahas et al. (1983) haviam demonstrado um efeito inibitório do plasma de *B. jararaca* sobre a atividade coagulante de muitos venenos de serpente. Fatores anti-hemorrágicos foram isolados do plasma de várias espécies de serpentes, assim como diferentes espécies de mamíferos. De uma forma geral, eles inibem a atividade proteolítica das toxinas e, na maioria das vezes, a hemorragia (Weissenberg et al., 1992; Tanizaki et al., 1991; Omori-Satoh et al., 1997). De acordo com suas massas moleculares, estes fatores são agrupados em duas classes: proteínas de alta massa molecular (700-1000 kDa) e proteínas de baixa massa molecular (52-90 kDa). Dentre as proteínas de baixa massa molecular estão o *oprin* (isolado do gambá *Didelphis virginiana*), o DM43 (isolado do *D. marsupialis*) e o Fator Sérico Habu (HSF, isolado da serpente *Trimeresurus flavoviridis*) (Catanese e Kress, 1992; Neves-Ferreira et al., 2000; Yamakawa e Omori-Satoh, 1992).

Valente et al. (2001) conduziram um estudo para caracterização da proteína BJ46a, um inibidor de metaloproteinase de 46 kDa isolada do soro de *B. jararaca*. O inibidor BJ46a foi eficaz em inibir a atividade hemorrágica do veneno de *B. jararaca*

por injeção intradérmica em ratos. Além disso, BJ46a foi capaz de inibir a atividade proteolítica das SVMPs atrolisina C (classe P-I) e jararhagina (classe P-III) isoladas.

Em um estudo recente de nosso grupo foi avaliada a capacidade de dois inibidores de metaloproteinases (DM43, do plasma de *Didelphis marsupialis*, e alfa-2-macroglobulina, do plasma humano) de inibir a atividade proteolítica de SVMPs sobre o fibrinogênio e o colágeno VI, além da capacidade de DM43 de inibir suas atividades hemorrágicas. O HF3, e também a bothropasina (classe P-III) e a BJ-PI (classe P-I), isolados do veneno da *B. jararaca*, foram testados (Asega et al., 2014). Verificou-se que DM43 inibiu a atividade proteolítica da bothropasina e BJ-PI, mas não inibiu a atividade proteolítica do HF3; no entanto este inibidor não foi clivado por nenhuma das proteinases testadas. A alfa-2-macroglobulina não foi capaz de inibir nenhuma proteinase testada, além de ter sido clivada por elas. DM43 também foi capaz de inibir parcialmente a atividade hemorrágica da bothropasina, mas não inibiu a atividade hemorrágica do HF3.

A despeito do conhecimento de inibidores de proteinases presentes no plasma de algumas espécies de vertebrados, pouco se sabe sobre a susceptibilidade das proteínas plasmáticas de serpentes à ação de SVMPs, assim como a presença de atividade inibitória da BJ46a sobre o HF3.

1.4 Biblioteca de peptídeos para determinação do sítio de clivagem de proteinases

A determinação da especificidade primária de proteinases, ou seja, as sequências de aminoácidos presentes no sítio de clivagem do substrato e adjacentes a este, que são de sua preferência, tornou-se uma importante ferramenta para o

desenvolvimento de drogas inibidoras de proteinases (Schechter et al., 2005; Turk et al., 2006).

Estudos para a determinação da especificidade primária de SMVPs são em geral conduzidos utilizando-se peptídeos ou a cadeia B da insulina como substratos (Mandelbaum et al., 1976, Bjarnason e Fox, 1994). Apesar de ser útil para a avaliação do ponto de clivagem na cadeia peptídica, uma limitação destas abordagens é o número restrito de sequências peptídicas que estão disponíveis para hidrólise pelas SMVPs nestes substratos, não propiciando uma avaliação ampla das preferências de especificidade primária P e P' (Schechter e Berger, 1967).

Recentemente Shilling e Overall (2008) descreveram uma nova técnica para a determinação de sítios de clivagem de proteinases em misturas complexas. Esta técnica baseia-se no uso de uma biblioteca de oligopeptídeos naturais, derivados do proteoma em estudo, que é submetida à atividade de proteinases, cuja especificidade se quer verificar. Analisando-se as sequências peptídicas clivadas, parâmetros como preferência de ligação peptídica e sequência consenso de clivagem da(s) proteinase(s) podem ser rapidamente determinados.

Paes Leme et al. (2011) mapearam a especificidade da SVMPs bothropasina (classe P-III), atrolisina-C (classe P-I), leucurolisina-A (classe P-I) e BaP1 (classe P-I). Utilizando a metodologia descrita por Schilling e Overall (2008), foi gerada uma biblioteca de peptídeos do plasma humano, obtida pela incubação do mesmo com tripsina, e que foi submetida à proteólise pelas SVMPs. A análise dos perfis de especificidade demonstraram interessantes diferenças nas preferências dos sítios P e P', sugerindo diferenças funcionais entre estas proteinases. Os resultados deste estudo em geral confirmaram os estudos prévios, que mostravam que o resíduo de Leu é preferido na posição P1' para todas as SVMPs estudadas. Entretanto, a

avaliação mais detalhada dos perfis de preferência de ligações peptídicas para clivagem por estas SVMPs mostrou uma diferença sutil que pode estar relacionada às diferenças estruturais apresentadas por estas proteinases. Neste estudo, todas as SVMPs da classe P-I apresentaram preferência por resíduos de aminoácidos ao longo dos sítios P4 a P4'. Entretanto, a bothropasina, da classe P-III, mostrou menor seletividade de resíduos para a clivagem da ligação peptídica. Desta forma, é interessante especular que, em termos gerais, a diferença entre as SVMPs das classes P-I e P-III, com relação à preferência de substrato ao nível dos subsítios P e P', pode se refletir na preferência por determinados substratos proteicos e no perfil de proteólise que pode ser limitada, ou degradação completa. Esta especulação é interessante, entretanto, investigações adicionais devem ser feitas baseadas na evolução deste trabalho de Paes Leme et al. (2011).

1.5 Degradômica

O termo degradômica surgiu pela primeira vez para definir o repertório de substratos de uma proteinase em escala proteômica (McQuibban et al., 2000), e este conceito foi expandido por López-Otín e Overall (2002), quando definiram o termo degradômica como conjunto de abordagens proteômicas e genômicas que levam à identificação e caracterização de proteinases presentes em um organismo, incluindo os substratos que são alvos da proteinase e seus inibidores. Dois conceitos para o termo degradoma também foram propostos: o termo degradoma pode conotar o conjunto de proteinases que são expressas em um momento específico por uma célula, tecido ou organismo; ao mesmo tempo, o degradoma de uma proteinase é o repertório de substratos naturais completos de uma determinada enzima em uma célula, tecido ou organismo (López-Otín e Overall, 2002).

A caracterização dos substratos de uma proteinase por muito tempo baseou-se em experimentos isolados, guiados por hipóteses (*hypothesis-driven*), em que a proteína candidata era incubada com a proteinase e a hidrólise era avaliada; com o advento das técnicas proteômicas, a investigação de novos alvos de uma proteinase passou a poder ser feita em larga escala (*high throughput*), dentro de contexto celular, tecidual ou de um organismo (Schilling e Overall, 2007).

Nas últimas duas décadas algumas metodologias *high throughput* foram desenvolvidas para o estudo do repertório completo de substratos de uma determinada proteinase em uma célula, tecido ou organismo (degradoma), e algumas destas abordagens foram revisadas por Doucet e Overall (2008). Em geral, neste tipo de análise são utilizados métodos eletroforéticos aliados à espectrometria de massas, ou somente análise quantitativa por espectrometria de massas, utilizando ou não marcação isotópica.

Este trabalho de mestrado insere-se dentro do contexto da degradômica, já que foram utilizadas técnicas *high-throughput* para definição de alvos do HF3 no universo do proteoma plasmático.

1.6 Plasma e o *dynamic range* de proteínas

Um desafio intrínseco à proteômica baseada em espectrometria de massas é a grande diferença de concentração das proteínas em um determinado fluido, tecido ou célula, o chamado "*dynamic range*" das proteínas.

O proteoma do plasma contém 22 proteínas muito abundantes incluindo a albumina, imunoglobulinas, transferrina e haptoglobina, que constituem aproximadamente 99% do conteúdo proteico total do plasma. A fração remanescente é composta de proteínas muito pouco abundantes, incluindo fragmentos de proteínas

clivados proteoliticamente (Tirumalai et al., 2003; Nanjappa et al., 2013). Conforme mostrado na Figura 3, a albumina é a proteína mais abundante no plasma humano (com intervalo de concentração 35-50 mg/mL, resultado de sua síntese diária de 12 g no fígado e meia vida de aproximadamente 21 dias), enquanto que a interleucina-6 tem sua concentração em torno de 0-5 pg/mL. Portanto, estas duas proteínas diferem em abundância na ordem de 10^{10} no plasma humano (Anderson e Anderson, 2002).

Figura 3. Intervalos de concentração de 70 proteínas do plasma humano. A abundância das proteínas está mostrada em escala logarítmica estendendo-se por 12 ordens de magnitude. Fonte: Anderson e Anderson, 2002.

A *Human Proteome Organization* (HUPO) iniciou um projeto em 2002 que tem como objetivo determinar as proteínas constituintes do plasma ou soro humano (Omenn, 2004). O *Plasma Proteome Database* (www.plasmaproteomedatabase.org) foi criado como parte do projeto do proteoma do plasma humano e publicações recentes reportaram a identificação de 10.546 proteínas, das quais 3.784 foram detectadas em 2 ou mais estudos (Nanjappa et al., 2013).

Atualmente, a análise de peptídeos por espectrometria de massas pode atingir a sensibilidade na ordem de atomoles. Mas apesar da sensibilidade do equipamento ser importante, o *dynamic range* é ainda mais crucial, pois proteínas de maior abundância podem limitar o que pode ser observado num dado intervalo de concentração. Apesar de todos os esforços, o intervalo de concentração máximo para detecção atualmente é de 4 ordens de magnitude (Zubarev, 2013) e a tecnologia necessária para se caracterizar o proteoma completo de uma célula eucariótica ainda não foi alcançada. Atualmente, um alto grau de cobertura do proteoma de células eucarióticas é atingido após o fracionamento extensivo ao nível das proteínas ou peptídeos (Mann e Kelleher, 2008). Por este motivo, para a análise de misturas complexas como o plasma ou lisados celulares, ao menos um passo de fracionamento é sempre empregado antes da análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), além de técnicas de cromatografia por afinidade para depleção das proteínas mais abundantes ou enriquecimento de proteínas menos abundantes em um proteoma. Com o objetivo de catalogar o proteoma completo humano, ou ao menos desenhar um esboço do que seria a cobertura completa do proteoma, Kim et al. (2014) avaliaram o proteoma de 30 tecidos considerados histologicamente saudáveis, além de células primárias, por espectrometria de massas de alta resolução. Neste estudo, foram identificadas proteínas codificadas por 17.294 genes, o que corresponde a 84% de genes que codificam proteínas anotados no genoma humano. Para tanto, foi necessária fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, seguido de fracionamento dos peptídeos (gerados pela digestão das bandas proteicas por tripsina) por cromatografia líquida de fase reversa, para que então as frações fossem submetidas a LC-MS/MS.

1.7 Estudo dos substratos do HF3

Desde o seu isolamento do veneno de *B. jararaca* por Assakura et al. (1986), a elucidação das proteínas que são alvos do HF3 *in vivo* tem sido o foco central de estudos que visam entender o mecanismo envolvido no processo hemorrágico desencadeado por esta metaloproteinase. Análises da atividade proteolítica do HF3 sobre substratos isolados mostraram que proteínas do plasma e da matriz extracelular, importantes para a manutenção da integridade dos vasos capilares e hemostasia, como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, fator de Willebrand, colágenos IV e VI, laminina e Matrigel™ são hidrolisados pelo HF3 (Oliveira et al, 2010). Paes Leme et al. (2012) utilizaram pela primeira vez abordagens proteômicas para analisar os efeitos do HF3 sobre proteínas da derme e plasma de camundongos, o que evidenciou novos alvos intracelulares, extracelulares e proteínas plasmáticas. Entretanto, os mecanismos diretos e indiretos envolvidos na alta atividade hemorrágica apresentada pelo HF3, principalmente no que se diz respeito ao papel da clivagem de proteínas plasmáticas no contexto da hemorragia, ainda não estão totalmente elucidados. Diante do exposto, a análise da atividade do HF3 sobre proteínas do plasma pode contribuir para o entendimento do processo hemorrágico e da complexidade do envenenamento pela serpente *B. jararaca*, e possivelmente para o aperfeiçoamento do soro antiofídico.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi analisar o degradoma *in vitro* do HF3 sobre proteínas do plasma humano e da serpente *B. jararaca*. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Avaliar qualitativamente os alvos plasmáticos do HF3, no plasma humano, utilizando:
 - abordagens que visam minimizar o *dynamic range* do plasma
 - análise por espectrometria de massas
- Determinar o sítio de clivagem do HF3 utilizando uma biblioteca de peptídeos derivados do proteoma do plasma humano.
- Analisar qualitativamente os alvos plasmáticos do HF3, no plasma da serpente *B. jararaca*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 HF3 (Hemorrhagic Factor 3)

A amostra da metaloproteinase HF3 utilizada neste trabalho foi isolada do veneno da *B. jararaca* pela Ms. Ana Karina de Oliveira, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, de acordo com o procedimento descrito por Oliveira et al. (2009).

3.2 Obtenção do plasma humano

O uso do plasma humano foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, conforme CAAE 19892213.7.0000.5473. O sangue humano foi coletado de voluntários que afirmaram não terem feito o uso de medicamentos analgésicos por pelo menos dez dias, em tubo apropriado contendo solução de citrato de sódio na concentração final de 0,38%, e centrifugado a 1.000xg, por 10 min, a 4 °C para obtenção do plasma. O plasma foi em seguida submetido à quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976). Após a quantificação, alíquotas de 1,0 mL foram armazenadas em freezer -80°C até a sua utilização.

3.3 Obtenção do plasma de *B. jararaca*

O sangue da *B. jararaca* foi coletado no laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, e os todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética para o Uso de Animais, sob o protocolo 881/12. Amostras de sangue foram coletadas de três serpentes (um macho e duas fêmeas) em tubos separados contendo solução citrato de sódio na concentração final de 0,38%. Os quatro tubos foram centrifugados

a 1.200xg, por 10 min, a 4 °C para obtenção do plasma, que foram misturados em um pool que foi submetido a quantificação de proteínas pelo método de Bradford. Após a quantificação, alíquotas de 0,5 mL foram armazenadas em freezer -80°C até a sua utilização.

3.4 Quantificação de proteínas e peptídeos

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, utilizando o corante azul de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich). Uma curva padrão de soro albumina (Sigma-Aldrich) foi construída como referência de concentração proteica e as leituras foram realizadas em leitor de microplaca Vitor 3-1420 (Perkin Elmer) no comprimento de onda de 595 nm. A concentração final baseada na curva padrão foi expressa em mg/mL.

A dosagem de peptídeos com o *BCA Protein Assay Reagent* - ácido bicinconínico (Pierce) - foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As leituras no comprimento de onda de 562 nm foram realizadas na Leitora Multimodo FlexStation 3 (Molecular Devices) e a concentração foi expressa em mg/mL.

3.5 Eletroforese de proteínas em gel SDS-poliacrilamida

O preparo do gel de poliacrilamida, contendo SDS (dodecil sulfato de sódio), foi realizado segundo Laemmli (1970). Para o gel de SDS-poliacrilamida 12%, uma solução nas seguintes concentrações foi preparada: Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida 12%, bisacrilamida 0,3%, TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etileno-diamino) 0,1%, e persulfato de amônio 0,06%. O gel de SDS-poliacrilamida 10% continha acrilamida 10% e bisacrilamida 0,25%; o gel de SDS-poliacrilamida 8% continha acrilamida 8% e bisacrilamida 0,2%; os demais reagentes seguiram as

concentrações mencionadas acima. Esta solução foi aplicada em placas de tamanho 10 cm x 8,0 cm ou 16 cm x 20 cm e a sua polimerização se deu em temperatura ambiente.

O gel superior, ou de empacotamento, foi adicionado após a polimerização do gel de separação e continha acrilamida 4%, bisacrilamida 0,1% e tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, acrescido dos demais reagentes nas concentrações citadas acima.

Antes de serem aplicadas, as amostras foram submetidas à desnaturação e redução de pontes de dissulfeto em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo 2-mercaptoetanol 2% e SDS 2% (tampão desnaturante e redutor), mantidas sob aquecimento a 95 °C durante 5 min.

Como tampão de corrida foi utilizado Tris-HCl 0,025 M, contendo glicina 0,18 M, pH 8,3 e SDS 1%. As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando-se cubas verticais (*Electrophoresis System Hoefer™ miniVE*) e uma fonte elétrica (*Electrophoresis Power Supply EPS 601*, GE Healthcare), e desenvolvidas a temperatura ambiente a 150 V, 80 mA e 100 W, com duração de aproximadamente 2 h.

3.6 Coloração de proteínas

A coloração das bandas proteicas nos géis de SDS-poliacrilamida por prata foi realizada de acordo com Mortz et al. (2001), com algumas modificações. O gel foi incubado com as seguintes soluções, de forma sequencial: (1) solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,05%), por 30 seg em forno de micro-ondas e 5 min em temperatura ambiente; (2) etanol 35%, por 30 seg em forno de micro-ondas e 5 min em temperatura ambiente; (3) tiosulfato de sódio 0,02%, por 30 seg em forno de micro-ondas e 2 min em temperatura ambiente; (4) duas lavagens

com água MilliQ®, por 30 seg em forno de micro-ondas e 2 min em temperatura ambiente; (5) solução 0,2% de nitrato de prata contendo formaldeído 0,076%, por 30 seg em forno de micro-ondas e 5 min em temperatura ambiente; (6) lavagem com água MilliQ® por 1 min em temperatura ambiente. A etapa seguinte de revelação das bandas proteicas foi feita incubando-se o gel em solução de carbonato de sódio 6%, formaldeído 0,05%, e tiosulfato de sódio 0,0004%, até observar-se a coloração das bandas. Utilizou-se uma solução de metanol 50% e ácido acético 12% para interromper a reação.

A coloração das bandas proteicas com Coomassie Coloidal G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye - Thermo Fisher Scientific) foi realizada de acordo com Neuhoff et al., (1988). O gel de SDS-poliacrilamida foi submerso na solução contendo Coomassie Coloidal G-250 0,08% em metanol 25%, ácido fosfórico 1,6% e sulfato de amônio 8%, por 16 h, transferido para um tampão de neutralização (Tris 0.1 M, e pH ajustado para 6.5 com ácido fosfórico) por 3 min, submerso em metanol 25% por menos de 1 min e transferido para uma solução fixadora (sulfato de amônio 20% (p/v) em água) por 16 h.

3.7 Preparação do plasma humano para análise proteômica

3.7.1 Cromatografia de afinidade à resina Blue Sepharose CL-6B

A resina Blue Sepharose CL-6B (Sigma-Aldrich; Travis e Pannell, 1973; Subramanian, 1984) que consiste de Sepharose CL-6B com Cibacron Blue F3G covalentemente ligado, foi utilizada para a depleção de albumina do plasma humano.

O procedimento foi realizado utilizando-se um micro tubo com filtro. Na parte superior do microtubo com filtro, foi adicionado 0,5 mL de resina. As etapas

determinadas pelo fabricante de condicionamento, ligação e eluição de proteínas, e reconstituição da resina foram realizadas fracionando-se o volume total necessário em alíquotas de 0,5 mL, adicionados na parte superior do tubo com filtro que continha a resina, seguido de agitação manual moderada e centrifugação por 1 min a 150xg, com descarte ou armazenamento da solução eluída de acordo com a etapa. Sendo assim, as seguintes soluções foram adicionadas (1) condicionamento: 2,5 mL de água MilliQ® e 4,0 mL de tampão de ligação (HEPES 20 mM, pH 7,4), com descarte da solução eluída; (2) ligação: o duto de saída inferior do micro tubo contendo a resina foi fechado, e 40 µL de plasma diluídos em 310 µL de tampão de ligação foram carregados, e o tubo foi mantido a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min sob agitação. Após a centrifugação, o material eluído, correspondente ao plasma depletado de albumina foi armazenado; (3) eluição das proteínas ligadas à resina (eluato): 4 mL de NaCl 2M foram adicionados à resina, com armazenamento da solução eluída; (4) reconstituição: 1 mL de hidrocloreto de guanidina 6M e 4 mL de tampão de ligação, com descarte da solução eluída.

O plasma depletado de albumina e o eluato (proteínas que ficaram retidas na resina) foram quantificados pelo método de Bradford.

Alíquotas do plasma depletado de albumina e plasma total foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12%.

3.7.2 Cromatografia de afinidade à resina ProteoPrep 20

A depleção das 20 proteínas mais abundantes do plasma humano foi realizada com o ProteoPrep 20 Plasma Immunodepletion Kit (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 8 µL de plasma foram carregados na coluna previamente equilibrada com PBS pH 7,2; após 20 min de incubação com a resina,

em temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada e a fração não retida correspondia ao plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes. As proteínas retidas na coluna (eluato) foram eluídas com Glicina-HCl 0.1 M, pH 2.5, e Tween 20®.

Após os procedimentos de depleção, o plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes foi concentrado em Centricon YM-3 (Millipore) e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford.

Alíquotas do plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes, do eluato e do plasma total foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12%.

3.7.3 Enriquecimento de proteínas com ProteoMiner

O enriquecimento das proteínas pouco abundantes do plasma foi realizado com o *ProteoMiner Protein Enrichment Kit* (Bio-Rad) (Pernemalm et al., 2008). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 200 µL de plasma humano foi carregado à coluna previamente condicionada com PBS pH 7,4, e incubado por 2 h em temperatura ambiente. Após centrifugação, a fração não retida foi armazenada para posterior análise. As proteínas que ficaram retidas na resina foram eluídas com uréia 8 M contendo CHAPS 2%. Ao contrário dos métodos de tratamento do plasma mencionados anteriormente (Blue Sepharose CL-6B e ProteoPrep 20), no caso do ProteoMiner, as proteínas que ficaram retidas na coluna são aquelas de interesse para a análise, e esta fração foi denominada plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes.

Para a dessalinização do plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes, contendo os tampões de eluição mencionados acima, as proteínas em solução foram precipitadas pela adição de 8 volumes de acetona gelada e 1 volume de metanol gelado e armazenadas por 12 h a -20 °C. Em seguida, a amostra foi centrifugada por

10 min a 14000 *g* a 4 °C. O precipitado contendo as proteínas plasmáticas foi lavado com metanol gelado e ressuspendido em 60 µL de NaOH 100 mM e 340 µL de HEPES 50 mM, pH 7,5.

O plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes e o as proteínas não retidas na resina foram quantificadas pelo método de Bradford.

3.8 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma humano (degradoma)

Diferentes estratégias foram adotadas para avaliar o efeito do HF3 sobre as proteínas plasmáticas e um resumo dos métodos utilizados utilizada está representado na Figura 4.

Figura 4. Ilustração dos métodos utilizados neste estudo.

3.8.1 Incubação do plasma com o HF3

O plasma depletado de albumina (50 µg) (item 3.7.1), o plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes (50 µg) (item 3.7.2), o plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes (50 µg) (item 3.7.3) (no tampão da última etapa de preparação) e o plasma total (diluído 1:50 com HEPES 50 mM, pH 7,5; 200 µg) foram incubados com HF3 (100 µg/mL em acetato de amônio 250 mM contendo CaCl_2 1 mM) na proporção de 1:100 (p/p), por 2 h, a 37°C. As amostras de plasma controle em cada caso foram tratadas nas mesmas condições substituindo-se o HF3 pelo mesmo volume de acetato de amônio 250 mM contendo CaCl_2 1 mM.

3.8.2 Separação das frações peptídica e proteica do degradoma

Decorridas 2 h de incubação do plasma com HF3, a reação foi interrompida e as proteínas em solução foram precipitadas pela adição de 8 volumes de acetona gelada e 1 volume de metanol gelado e armazenadas por 12 h a -20 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 g a 4 °C. O sobrenadante continha a fração peptídica e o precipitado correspondia à fração proteica.

3.8.3 Análise da fração proteica do degradoma

3.8.3.1 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

Conforme descrito no esquema apresentado na Figura 4, uma das abordagens utilizadas para elucidarmos os efeitos do HF3 sobre o plasma humano foi a análise do perfil eletroforético de sua fração proteica em gel de SDS-poliacrilamida, após a incubação com o HF3 e precipitação de proteínas. Desta maneira, o precipitado proteico obtido após os procedimentos descritos no item 3.8.2 foi ressuspensionado em

NaOH 100 mM, e a uma amostra de 5 µg de proteínas do plasma incubado com HF3, ou de plasma controle, foi adicionado o tampão desnaturante e redutor (item 3.5), e esta foi aquecida a 95 °C por 5 min e submetida à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12%, com o emprego de placas de vidro de 10 x 10,5 cm.

Apenas no caso do plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes com o kit ProteoMiner, a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12% foi feita em com placas de tamanho 16 cm x 20 cm, utilizando-se 50 µg de proteínas. As bandas diferenciais observadas no gel de SDS-poliacrilamida foram recortadas e submetidas à digestão *in gel* com tripsina e análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), em um espectrômetro do tipo Quadrupolo – Tempo de Vôo com fonte de ionização *nanospray* (Q-ToF Ultima, Waters), conforme descrito abaixo.

3.8.3.2 Digestão *in gel* e identificação de proteínas por espectrometria de massas

Digestão de proteínas *in gel*: a digestão de proteínas *in gel* foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Hanna et al., (2000) com algumas modificações, e seguiu as seguintes etapas: (1) lavagem e descoloração: os fragmentos de gel recortados foram incubados em 500 µL de uma solução de metanol 50%/ácido acético 5% em água MilliQ® por uma noite; (2) desidratação: os fragmentos de gel foram incubados em 200 µL de acetonitrila 100%, em duas etapas de 5 min. A solução de acetonitrila foi removida e o restante foi evaporado em um sistema de concentração a vácuo (*speed vac*, CHRIST); (3) alquilação e redução: cada fragmento de gel foi incubado por 30 min em 30 µL em ditiotretol 10 mM diluído em bicarbonato de amônio 100 mM. A solução foi aspirada com pipeta e foram adicionados 30 µL de

iodoacetamida 50 mM diluída em bicarbonato de amônio 100 mM, por 30 min; (4) troca de tampão: a solução alquilante foi removida e os fragmentos de gel foram submetidos à incubação, por 10 min, em 100 µL de uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM, seguida de imersão em 200 µL de acetonitrila 100% por 5 min. Estes passos foram repetidos uma vez e na última etapa de desidratação, a solução de acetonitrila foi removida por aspiração com pipeta e o restante foi evaporado em *speed vac*; (5) digestão por tripsina: aos fragmentos de gel foram adicionados 3 µL de uma solução de tripsina (50 ng/µL em bicarbonato de amônio 50 mM), em banho de gelo, por 30 min. Em seguida, uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada, em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel, e estes foram incubados a 37 °C por 18 h; (6) extração dos peptídeos: os peptídeos produzidos na digestão foram coletados por extração com solução de ácido fórmico 5%, seguida pela solução de ácido fórmico 5%/acetonitrila 50%. Os extratos de ambas as soluções foram combinados e reunidos em um micro tubo e concentrados em *speed vac*.

Os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 5 µL de ácido trifluoroacético 0,1% e submetidos a dessalinização utilizando ponteiras preenchidas com resina C18 (sistema ZipTip™, Millipore), de acordo com instruções do fabricante. A solução contendo os peptídeos eluídos após a etapa de limpeza foi submetida a secagem em *speed vac*.

Análise por LC-MS/MS: após a concentração em *speed vac*, os peptídeos foram ressuspensos em 20 µL de uma solução de ácido fórmico 0,1% e analisados em um espectrômetro de massas do tipo Quadrupolo – Tempo de Vôo com fonte de ionização *nanospray* (Q-ToF Ultima, Waters).

Uma alíquota de 4,5 µL da solução de peptídeos foi aplicada numa coluna de *trapping* (coluna C18; 180 µm x 20 mm, diâmetro interno e comprimento,

respectivamente, Waters) com fluxo de 5,0 $\mu\text{L}/\text{min}$, ajustado diretamente no programa do cromatógrafo nanoAcquity (Waters). Em seguida a mistura de peptídeos foi submetida à cromatografia líquida de fluxo nanométrico, utilizando coluna C18 capilar de 100 μm x 100 mm (Waters), sob fluxo de 600 nl/min e gradiente de 3% a 60% de acetonitrila (solvente B) em ácido fórmico (solvente A) em 15 minutos. A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 3,4 kV e 60 °C, respectivamente. O espectrômetro foi operado no modo *Data Dependent Acquisition* (DDA), utilizando uma varredura de massas na região de m/z de 200 a 2500, seguida da dissociação induzida por colisão dos 8 íons mais intensos. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 90 segundos.

Processamento dos espectros: Os dados brutos (*raw files*) referentes às análises de MS/MS no espectrômetro de massas Q-ToF Ultima foram processados utilizando o programa ProteinLynx™ versão 2.3 (Waters). Os arquivos resultantes (extensão *pk1*) foram gerados utilizando os seguintes parâmetros: deisotopização e centróide dos picos; a acurácia na determinação das massas foi baseada na utilização do íon de massa 784,823 como *lock mass* (proveniente do canal de MS do ácido fosfórico, utilizado como calibrante), com duas varreduras (*scans*) e uma tolerância de massa de 0,1 Da.

Busca em banco de dados e identificação das proteínas: os arquivos *mgf* (*mascot generic format*) foram utilizados para buscas em banco de dados utilizando o programa Mascot v. 2.4.1 (Perkins et al., 1999). O banco de proteínas restrito à taxonomia *Homo sapiens* foi adquirido pelo UniProtKB/Swiss-Prot (que é mantido pelo UniProt Consortium e acessível no site do <http://www.uniprot.org>), e contava com 46.083 sequências depositadas em fevereiro de 2014, incluindo as isoformas de proteínas. Como parâmetros de busca, foram determinados: máximo de 2 clivagens

perdidas pela tripsina; resíduos de cisteína carbamidometilados (+ 57,0 Da) (escolhidos como uma modificação fixa) e resíduos de metionina oxidados (+ 16,0 Da), acetilação do resíduo de qualquer aminoácido N-terminal (+42,0 Da) e deamidação de asparagina e glutamina (+1,0 Da) (escolhidos como uma modificação variável); tolerância de íon precursor e íon fragmentado de 0,3 Da. O programa Scaffold (versão Scaffold_4.3.4, Proteome Software Inc.) foi utilizado para validar as identificações de proteínas e peptídeos obtidas por espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Peptídeos com probabilidade >95% foram aceitos e proteínas com probabilidade >99%.

3.8.4 Análise da fração peptídica do degradoma

3.8.4.1 Preparação da fração peptídica para identificação

Outra abordagem utilizada para elucidarmos os efeitos do HF3 sobre o plasma humano foi a análise de sua fração peptídica por LC/MS-MS, após a incubação com o HF3 e precipitação de proteínas. Desta maneira, o sobrenadante resultante, correspondente à fração peptídica, foi seco em *speed vac*, submetido a uma etapa de remoção de detergentes, seguida de uma etapa de remoção de sais e outros contaminantes, e concentrado em *speed-vac*.

Remoção de detergentes por Macro Spin™ Columns (Harvard Apparatus):

Foram utilizadas as colunas de poli-hidroxietil aspartamida e o procedimento foi realizado conforme as instruções do fabricante. As etapas de condicionamento, equilíbrio, eluição e reconstituição da resina foram realizadas com a aplicação de alíquotas de 500 µL de várias soluções (vide abaixo), colocadas na parte superior do tubo que continha a resina, agitação manual moderada e centrifugação por 1 min a

1500 rpm, em cada etapa. A coluna foi condicionada com 500 µL de metanol, 1 mL de água MilliQ®, seguida de incubação por 1 h com 500 µL de fosfato monossódico 0,2 M contendo acetato de sódio 0,3 M. Em seguida, a coluna foi equilibrada com 1,5 mL de acetonitrila 85% + formato de amônio 20 mM. A amostra foi diluída em 400 µL de acetonitrila 85% + formato de amônio 20 mM e carregada na coluna. Após centrifugação, o líquido do tubo coletor foi descartado (contendo os solutos e detergentes não polares) e a resina foi lavada mais duas vezes com 250 µL de acetonitrila 85% + formato de amônio 20 mM. A eluição dos peptídeos foi feita com 250 µL de ácido fórmico 20 mM. A solução contendo os peptídeos eluídos foi submetida à secagem em *speed vac* e dessalinização.

Dessalinização com Sep-Pak Light C18 (Waters): As amostras peptídicas foram ressuspendidas individualmente em 400 µL de uma solução de ácido trifluoroacético 0,1% e aplicadas em colunas de extração em fase sólida Sep-Pak Light C18 seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante.

3.8.4.2 Identificação de peptídeos por espectrometria de massas

Análise por LC-MS/MS: após a concentração em *speed vac*, o precipitado obtido foi ressolubilizado em 20 µL de ácido fórmico 0,1% para a análise no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplado a um cromatógrafo EASY-nLC II (Thermo Scientific).

As colunas analíticas utilizadas na cromatografia líquida tinham dimensões de 75µm x 100 mm (diâmetro interno e comprimento, respectivamente) e foram preparadas no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, utilizando-se um capilar de sílica fundido (quartzo amorfo, Polymicro) e resina C18 de esfera de 5 µm (Phenomenex). O capilar foi cortado com o laser puller (Sutter Instrument Co.) e

preenchido com a resina C18 utilizando uma bomba de nitrogênio, empregando-se uma pressão de 1000 psi.

Uma alíquota de 10 µL da solução de peptídeos foi aplicada na coluna analítica e os seguintes parâmetros foram utilizados na cromatografia líquida e aquisição de dados pelo espectrômetro de massas: fluxo de 300 nL/min e um gradiente de 5 a 40% de acetonitrila (solvente B) em ácido fórmico 0,1%, (Solvente A) durante um total de 90 min. A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 1,5 kV e 200 °C, respectivamente, e o espectrômetro foi operado no modo DDA, no qual uma varredura de massas na região de m/z de 400 a 2000 é realizada, com resolução de 60.000 no modo FTMS, seguida de dissociação induzida por colisão de maior energia (HCD) dos 6 íons mais intensos, com resolução de 15.000. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 25 segundos, com uma janela de isolamento do íon precursor de ± 1 Da.

Busca em banco de dados e identificação das proteínas: As identificações dos peptídeos, e das proteínas das quais os peptídeos foram liberados pela proteólise, presentes na fração peptídica do plasma após incubação com o HF3, foram realizadas por duas abordagens. Primeiramente, pelo programa Mascot, e validação dos resultados feita pelas ferramentas PeptideProphet e ProteinProphet da plataforma Trans-Proteomic Pipeline (TPP) v4.6 (Keller et al., 2011). Comparativamente, a identificação de peptídeos e proteínas foi realizada com o programa Peaks Studio 7 (Ma et al., 2003), que realiza o sequenciamento *de novo*, seguido de busca em banco de dados e validação estatística dos peptídeos identificados.

(1) Abordagem Mascot/TPP: Os dados brutos (*raw files*) referentes às análises de MS/MS foram convertidos à extensão *mgf* utilizando a ferramenta MS-Convert do programa ProteoWizard versão 3.0 (Kessner et al, 2008). Os arquivos *mgf* foram

utilizados para buscas em banco de dados no programa Mascot, utilizando o banco de proteínas UniProtKB/Swiss-Prot restrito à taxonomia *H. sapiens*. Foi utilizada a estratégia de busca em banco de dados *decoy*, que foi elaborado na plataforma TPP por meio da ordenação reversa das sequências presentes no banco de dados original (Deutsch et al., 2010). Desta maneira, o banco de *H. sapiens* passou a conter 91.322 sequências, incluindo aquelas das proteínas e suas isoformas, além das sequências reversas. Como parâmetros de busca, utilizamos: nenhuma enzima especificada para clivagem; as seguintes modificações variáveis: resíduos de metionina oxidados (+15,9949 Da), acetilação de qualquer aminoácido N-terminal (+42,0105 Da) e deamidação de asparagina e glutamina (+0.9840 Da); tolerância de íon precursor de 10 ppm, tolerância de íon fragmentado de 20 mmu. Na plataforma TPP, os arquivos *dat* gerados pela busca do Mascot foram convertidos em arquivos *pepXML*, e submetidos às ferramentas Peptide Prophet e Protein Prophet. Os peptídeos incluídos na análise apresentaram uma taxa de falsos positivos (FDR - do inglês *False Discovery Rate*) $\leq 1\%$ (Peptide Prophet) e as proteínas foram incluídas na análise se identificadas com uma FDR $\leq 1\%$ (Protein Prophet). A lista de proteínas com FDR $\leq 1\%$ obtida pelo ProteinProphet foi exportada em planilha *Excel*, e os peptídeos com FDR $> 1\%$ foram manualmente excluídos.

(2) Peaks Studio 7: Os dados brutos (*raw files*) referentes às análises de MS/MS foram submetidos à análise pelo programa Peaks Studio 7, que foi utilizado para o refinamento de dados (correção de massa do precursor e estado de carga para prover acurácia na massa monoisotópica do peptídeo), sequenciamento *de novo* e busca em banco de dados. O banco de proteínas restrito à taxonomia *H. sapiens* adquirido pelo UniProtKB/Swiss-Prot foi utilizado, incluindo proteínas e isoformas de proteínas. Como parâmetros de busca utilizamos: nenhuma enzima especificada para

clivagem; as seguintes modificações variáveis: resíduos de metionina oxidados (+15,9949 Da), acetilação de qualquer aminoácido N-terminal (+42,0105 Da) e deamidação de asparagina e glutamina (+0.9840 Da); tolerância de íon precursor de 10 ppm, tolerância de íon fragmentado de 0,02 Da. A estimação dos falso-positivos foi feita pela busca de todos os espectros contra um banco de dados decoy, criado pelo próprio programa Peaks. Os peptídeos incluídos na análise apresentaram uma FDR $\leq 1\%$, e as proteínas $-10 \log P > 20$.

3.8.5 Validação de alguns substratos do HF3 no plasma

O componente C3 e C4 do sistema complemento, o plasminogênio e a protrombina, disponíveis comercialmente, foram incubados individualmente com o HF3 na proporção enzima-substrato 1:10 (p/p) por duas horas a 37° C. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de tampão desnaturante e redutor (item 3.5) e mantidas sob aquecimento a 95 °C durante 5 min. As amostras de controle e aquelas incubadas com o HF3 foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida conforme procedimentos descritos no item 3.5.

3.8.6 Identificação dos peptídeos gerados pela clivagem do fibrinogênio isolado

O fibrinogênio foi incubado com o HF3 na proporção 1:100 (p/p) por 2 h a 37 °C. Decorridas 2 h de incubação, a reação foi interrompida e as proteínas em solução foram precipitadas pela adição de 8 volumes de acetona gelada e 1 volume de metanol gelado e armazenadas por 12 h a -20 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 g a 4 °C. O sobrenadante resultante, correspondente à fração peptídica, foi seco em *speed vac*, submetido a uma etapa de remoção de sais e outros contaminantes, e concentrados novamente em *speed-vac*.

As amostras seguiram os procedimentos de dessalinização com Sep-Pak Light C18, análise por LC-MS/MS e busca em banco de dados através do programa Peaks Studio 7 conforme descrito no item 3.8.4.1 e 3.8.4.2.

3.9 Geração de uma biblioteca de peptídeos tripsínicos derivada do plasma humano para determinação da especificidade primária do HF3

A biblioteca de peptídeos foi gerada de acordo com o método *Proteomic Identification of protease Cleavage Sites* (PICS) (Schilling e Overall, 2008; Schilling et al., 2011), com algumas alterações. O primeiro passo na geração da biblioteca de peptídeos foi a depleção de albumina do plasma humano.

3.9.1 Depleção de albumina do plasma humano utilizando Affi- Gel® Blue (BioRad)

Affi-Gel® Blue (BioRad) é um gel de agarose em formato de *beads*, ligado covalentemente ao corante Cibacron Blue, que é equivalente à resina Blue Sepharose CL-6B, que possui alta capacidade de ligação à albumina. Para o procedimento de depleção foram utilizados os tampões fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,1 (solução A), fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,1, contendo 1,4 M de NaCl (solução B) e fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,1, contendo 2,0 M de hidrocloreto de guanidina (solução C).

O procedimento foi feito pelo método de *batch*: em um tubo de centrífuga de 15 mL, foram acondicionados 3 mL de resina Affi-Gel® Blue. Para o condicionamento da resina (que é armazenada em azida sódica 0,02%), foram feitas 2 lavagens com 6 mL de solução A (lavagem: a solução A foi adicionada à resina, o tubo foi agitado, centrifugado por 4 min a 4.000 rpm e o sobrenadante retirado); a resina foi ressuspensa em 2,0 mL de solução A e 1,0 mL de plasma humano foi acrescentado.

Incubou-se a mistura em gelo por aproximadamente 2 h sob agitação, seguido de centrifugação por 10 min a 2.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante (~ 3,0 mL de plasma depletado de albumina em solução A).

A eluição das proteínas ligadas à resina foi feita com a adição de 6 mL da solução B, seguida de agitação e centrifugação por 4 min a 2.000 rpm. O sobrenadante foi retirado (~ 6,0 mL de albumina e outras proteínas que se ligam à resina, em solução B). A reconstituição da resina foi feita através de duas lavagens com 6 mL de solução C. As proteínas do plasma depletado de albumina e do eluato foram quantificadas pelo método de Bradford.

3.9.2 Geração da biblioteca de peptídeos tripsínicos

A 6 mg de proteínas do plasma depletado de albumina foram adicionados os seguintes reagentes em sequência, nas seguintes concentrações finais: ditioneitol (DTT) 5 mM, incubação por 1 h; iodoacetamida (IAA) 20 mM, incubação por 1h, no escuro; DTT 5 mM, incubação por 15 min. Em seguida, foi adicionada tripsina (Sigma-Aldrich, *Proteomics Grade*, preparada em HCl 1 mM) na proporção enzima:substrato de 1:100 e a solução foi deixada a 37 °C por 18 h.

A etapa posterior consistiu no bloqueio das aminas primárias por meio da dimetilação. Para tal, aos peptídeos derivados da digestão tripsínica, foram adicionados os seguintes reagentes em sequência, nas seguintes concentrações finais: fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 1 mM; hidrocloreto de guanidina 1 M, seguido de centrifugação a 20.000xg por 10 min a 4° C; ao sobrenadante, adicionou-se DTT 5 mM, e este foi incubado por 1 h a 37 °C; IAA 40 mM, incubação por 1,5 h a 37° C, no escuro; DTT 15 mM , incubação por 10 min a 37 °C; formaldeído 30 mM e cianoborohidreto de sódio 30 mM, incubação por 2 h em temperatura ambiente;

formaldeído 60 mM e cianoborohidreto de sódio 60 mM, incubação por 16 h em temperatura ambiente; glicina 100 mM, incubação por 30 min em temperatura ambiente.

Após a digestão tripsínica e dimetilação das aminas primárias, a biblioteca de peptídeos foi submetida à remoção dos reagentes utilizados nestas etapas. A amostra foi acidificada com ácido trifluoroacético 0,5% e aplicada em coluna de extração em fase sólida Sep-Pak Light C18 seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante. A eluição dos peptídeos retidos na coluna foi realizada com acetonitrila 80%. O produto de eluição foi concentrado em *speed vac* e, para certificar que a acetonitrila foi totalmente removida, 1 mL de água MilliQ® foi acrescentada à amostra sempre que o volume atingia 250 µL, por 4 vezes.

Os peptídeos foram então quantificados com o *BCA Protein Assay Reagent* - ácido bicinconínico - conforme descrito no item 3.4. Assim que obtida, a biblioteca de peptídeos tripsínicos derivada do plasma humano foi separada em alíquotas de 300 µg e armazenada a -80°C.

3.9.3 Incubação da biblioteca de peptídeos com o HF3

Condições ótimas de tampão foram ajustadas para a incubação com HF3, adicionando-se HEPES 50 mM (concentração final), pH 7,5, contendo CaCl₂ 5 mM. A biblioteca de peptídeos foi incubada com o HF3 na proporção 1:100 (p/p), por 3 h a 37 °C. Foram feitas duas incubações da biblioteca de peptídeos com o HF3.

Para biotilação das novas aminas livres, a mistura foi incubada por 3 h em temperatura ambiente com *Sulfo-NHS-SS-Biotin* (Pierce) na concentração final de 0,5 mM. A resina *Streptavidin Sepharose High Performance* (GE) foi utilizada para ligar a biotina. A resina foi equilibrada em tampão HEPES 50 mM contendo NaCl 150 mM,

pH 7,5. Após a etapa de biotinilação, a biblioteca de peptídeos foi incubada com 200 µL da resina por 16 h a 4° C. A suspensão foi transferida para um micro tubo com *frit* e lavada com aproximadamente 8 mL de HEPES 50 mM contendo NaCl 150 mM, pH 7,5. A eluição foi feita com 900 µL de DTT 40 mM diluído em HEPES 50 mM contendo NaCl 150 mM, pH 7,5.

O material eluído contendo os peptídeos N-terminais derivados da clivagem pelo HF3 foi submetido a secagem em *speed vac* até o volume de 400 µL, seguida de uma etapa de remoção de sais e outros contaminantes com Sep-Pak Light C18 e concentrados em *speed-vac*.

3.9.4 Identificação de peptídeos por espectrometria de massas

Análise por LC-MS/MS: após a concentração em *speed vac*, o precipitado obtido foi ressolubilizado em 25 µL de ácido fórmico 0,1% para a análise no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos acoplado a um cromatógrafo EASY-nLC II (Thermo Scientific).

Uma alíquota de 10 µL da solução de peptídeos foi automaticamente carregada em uma pré-coluna C18 (Phenomenex; dimensões 100 mm x 50 mm de diâmetro interno e comprimento, respectivamente; preenchida com resina de esfera 10 µm), seguida de uma coluna analítica C18 (Phenomenex; 75 µm x 100 mm, diâmetro interno e comprimento, respectivamente; preenchida com resina de esfera 5 µm), que foi preparada conforme descrito no item 3.8.4.2. Os seguintes parâmetros foram utilizados na cromatografia líquida e aquisição de dados pelo espectrômetro de massas: fluxo de 300 nL/min e um gradiente de 5 a 50% de acetonitrila (solvente B) em ácido fórmico 0,1%, (Solvente A) durante um total de 160 min. A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 2,0 kV e 200 °C,

respectivamente, e o espectrômetro foi operado no modo DDA, no qual uma varredura de massas na região de m/z de 300 a 1650 é realizada com resolução de 30.000 no modo FTMS, seguida por dissociação induzida por colisão (CID; *Collision-induced Dissociation*) no *Ion Trap*, dos 10 íons mais intensos. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 90 segundos (para se diminuir a aquisição repetitiva de um mesmo valor de m/z), com uma janela de isolamento do íon precursor de ± 1 Da.

Processamento dos espectros: Os dados brutos referentes às análises de MS/MS foram convertidos à extensão *mgf* ou *mzxml* utilizando a ferramenta MS-Convert do programa ProteoWizard versão 3.0 (Kessner et al, 2008).

Busca em banco de dados e identificação das proteínas: Os arquivos *mgf* foram utilizados para buscas em banco de dados utilizando o programa Mascot e os arquivos *mzxml* foram utilizados para busca em banco de dados no programa X!Tandem (Craig e Beavis, 2004). O banco de proteínas restrito à taxonomia *H. sapiens* disponível pelo UniProtKB/Swiss-Prot foi utilizado, contendo as sequências de proteínas e isoformas, além das sequências *decoy* (conforme descrito no item 3.8.4.2). Os seguintes parâmetros de busca foram determinados: 2 clivagens perdidas pela tripsina; as seguintes modificações fixas: carbamidometilação de cisteínas (+57.0214Da), dimetilação de lisinas (+28.0313 Da) e tioacilação de N-terminais (+87.9982 Da); como modificação variável, a oxidação de resíduos de metionina (+15.9949 Da); tolerância de íon precursor de 10 ppm e tolerância de íon fragmentado de 0,5 Da. Na plataforma TPP, os arquivos *dat* gerados pela busca do Mascot foram convertidos em arquivos *pepXML*, submetidos aos algoritmos Peptide Prophet e iProphet da plataforma TPP, com FDR $\leq 1\%$, e exportados para um arquivo de *Excel*. Este arquivo continha os peptídeos N-terminais identificados. As sequências de

aminoácidos C-terminais complementares foram obtidas por um programa disponível online na página <http://clipserve.clip.ubc.ca/pics> (Schilling et al., 2011), que também forneceu a lista dos peptídeos sem redundância, além da representação gráfica da sequência consenso de clivagem da proteinase.

3.10 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma de *B. jararaca*

3.10.1 Depleção de albumina do plasma e incubação com o HF3

O plasma de *B. jararaca* foi depletado de albumina com a resina Blue Sepharose CL-6B (GE) conforme descrito no item 3.7.1. Após a dosagem de proteínas pelo método de Bradford, o plasma de *B. jararaca* depletado de albumina foi incubado com o HF3 (diluído em acetato de amônio 250 mM contendo CaCl_2 1 mM) na proporção enzima:substrato 1:100, por 2 h, a 37 °C. O plasma controle foi tratado nas mesmas condições substituindo-se o HF3 pelo mesmo volume de acetato de amônio 250 mM contendo CaCl_2 1 mM.

Decorridas 2 h de incubação, a reação foi interrompida pela precipitação das proteínas pela adição de 8 volumes de acetona gelada e 1 volume de metanol gelado e armazenada por 12 h a -20 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 *g* a 4 °C. O sobrenadante continha a fração peptídica e o precipitado correspondia à fração proteica.

3.10.2 Análise da fração peptídica do sobrenadante

A primeira abordagem utilizada para elucidarmos os efeitos do HF3 sobre o plasma de *B. jararaca* foi a análise de sua fração peptídica por LC/MS-MS, após a

incubação com o HF3 e precipitação de proteínas. Desta maneira, o sobrenadante resultante, correspondente à fração peptídica, foi seco em *speed vac*.

As amostras de plasma controle e tratado seguiram os procedimentos de dessalinização com Sep-Pak Light C18, análise por LC-MS/MS e busca em banco de dados através do programa Peaks Studio 7, conforme descrito no item 3.8.4, com exceção do banco de dados, pois neste caso foi utilizado o Uniprot/Swiss-Prot restrito aos Vertebrados (que contava com 83.980 sequências depositadas em fevereiro de 2014).

3.10.3 Análise da fração proteica

O efeito do HF3 sobre o plasma de *B. jararaca* foi também verificado pela análise do perfil eletroforético de sua fração proteica em gel de SDS-poliacrilamida, após a incubação com o HF3 e precipitação de proteínas. Desta maneira, o precipitado proteico obtido após os procedimentos descrito no item 3.10.2 foi ressuspendido em NaOH 100 mM, e a uma alíquota contendo 5 µg de proteínas do plasma incubado com HF3, ou plasma controle, foi adicionado tampão desnaturante e redutor (item 3.5). As amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 min e submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12%, com o emprego de placas de vidro de 10 x 10,5 cm.

4. RESULTADOS

4.1 Preparação do plasma humano para análise proteômica

Neste estudo, para a análise proteômica da atividade proteolítica do HF3 foram utilizadas quatro diferentes amostras de plasma humano: i) plasma total; ii) plasma depletado de albumina, obtido pela cromatografia de afinidade utilizando a resina Blue Sepharose CL-6B; iii) plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes, obtido pela cromatografia de imunoafinidade utilizando a coluna ProteoPrep 20, que contém anticorpos monoclonais imobilizados, para captura de 20 proteínas (albumina, IgG, transferrina, fibrinogênio, IgA, α 2-marcroglobulina, IgM, α 1- antitripsina, componente C3 do sistema complemento, haptoglobulina, apolipoproteínas A1, A3 and B, α 1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, componente C4 e C1q do sistema complemento, IgD, prealbumina e plasminogênio); e iv) plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes, utilizando a tecnologia ProteoMiner, que consiste em uma biblioteca de hexapeptídeos ligada a um suporte cromatográfico. Estas diferentes abordagens de preparação do plasma humano foram utilizadas visando minimizar o intervalo de concentração dinâmica de proteínas (*dynamic range*) do plasma, e assim possibilitar a análise da atividade proteolítica do HF3 sobre um amplo espectro de proteínas presentes no mesmo, e a detecção dos produtos de degradação por espectrometria de massas.

As preparações obtidas após o tratamento do plasma pelas abordagens citadas acima foram primeiramente analisadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, para a verificação da eficiência de cada método.

4.1.1 Cromatografia de afinidade à resina Blue Sepharose CL-6B

Foram realizados três experimentos de cromatografia de afinidade do plasma humano à resina Blue Sepharose CL-6B. A Figura 5 apresenta o perfil eletroforético do plasma humano após o procedimento de depleção de albumina com a resina Blue Sepharose CL-6B. A fração não retida na resina (plasma depletado de albumina) (linha 2), mostrou uma diminuição considerável da banda presente na região de 68-70 kDa, correspondente à albumina, em relação ao plasma total (linha 1). Com a remoção de albumina do plasma, as bandas correspondentes a proteínas menos abundantes foram evidenciadas no perfil eletroforético do plasma (linha 2).

Figura 5. Perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida (12%) do plasma humano submetido à cromatografia na resina Blue Sepharose CL-6B. M: padrões de massa molecular. Linha 1: plasma total (2 µg); linha 2: fração não retida na resina (2 µg); linha 3: fração eluída com NaCl 2 M (2 µg). Coloração por prata.

O perfil eletroforético da fração retida na resina, eluída com NaCl 2 M, indicou que não somente a albumina foi removida do plasma por este método, mas também algumas outras proteínas, com massas moleculares de cerca de 50 kDa e 24 kDa.

Nestes experimentos, a partir de 40 µL de plasma humano, a fração depletada de albumina obtida continha em média 350 µg de proteínas, por dosagem pelo método de Bradford, e a concentração final de proteínas nos plasmas após os três experimentos de depleção de albumina foi de 1,03 mg/mL, 1,03 mg/mL e 0,99 mg/mL.

4.1.2 Cromatografia de afinidade à resina ProteoPrep 20

Foram realizados três experimentos de cromatografia de afinidade do plasma humano à resina ProteoPrep 20. A Figura 6 apresenta o perfil eletroforético do plasma humano após o procedimento de depleção das 20 proteínas mais abundantes com a resina ProteoPrep 20, onde é possível observar que na fração não retida na resina (plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes), as bandas correspondentes a proteínas menos abundantes foram evidenciadas (linha 2). Segundo o fabricante, esta resina de imunoafinidade tem a propriedade de remover 97% do conteúdo total das proteínas do plasma, e sendo assim, a fração de proteínas retidas na mesma apresenta um intervalo de concentração dinâmica de proteínas (*dynamic range*) muito próximo àquele do plasma total, de forma que não é possível observar todas as proteínas depletadas por este método, apenas pela avaliação do perfil eletroforético desta fração.

Nestes experimentos, a partir de 40 µL de plasma humano, a fração depletada das 20 proteínas mais abundantes continha em média 270 µg de proteínas, por dosagem pelo método de Bradford, e a concentração final de proteínas dos plasmas nos três experimentos de depleção das 20 proteínas mais abundantes, seguidas por

concentração em Centricon YM-3 conforme descrito na seção Material e Métodos, foi 0,95 mg/mL, 1,06 mg/mL e 1,3 mg/mL.

Figura 6. Perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida (12%) do plasma humano submetido à cromatografia na resina ProteoPrep 20. M: padrões de massa molecular. Linha 1: plasma total (2 µg); linha 2: fração não retida na resina (2 µg); linha 3: fração eluída com Glicina-HCl 0.1 M, pH 2.5, e Tween 20 (2 µg). Coloração por prata.

4.1.3 Enriquecimento de proteínas pouco abundantes com ProteoMiner

Foram realizados três experimentos de enriquecimento de proteínas pouco abundantes do plasma humano com a biblioteca de hexapeptídeos imobilizados em beads, ProteoMiner, que se baseia no princípio de que cada hexapeptídeo liga-se a um sítio de reconhecimento proteico único. Considerando-se que proteínas altamente abundantes saturam seus hexapeptídeos ligantes, o excedente destas não fica retido e assim é removido da amostra. Por outro lado, as proteínas pouco abundantes são

concentradas nos *beads*, já que ficam retidas em seus ligantes específicos, e dessa forma o intervalo de concentração dinâmica de proteínas é diminuído na amostra.

A Figura 7 apresenta o perfil eletroforético do plasma humano após o procedimento de enriquecimento de proteínas pouco abundantes com ProteoMiner, onde é possível observar que a banda de proteína mais abundante no plasma total (linha 1) e também na fração não-retida (linha 3), de cerca de 70 kDa, apresentou-se com intensidade bastante reduzida na fração retida (linha 2), que foi denominada plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes. Além disso, nesta amostra é possível visualizar diversas bandas proteicas que não eram visíveis no plasma total, e que correspondem às proteínas que foram enriquecidas pelo método.

Nestes experimentos, a partir de 200 μ L de plasma humano, a fração enriquecida das proteínas pouco abundantes continha em média 120 μ g de proteínas, por dosagem pelo método de Bradford, e a concentração final de proteínas dos plasmas enriquecidos de proteínas pouco abundantes com o kit ProteoMiner nos três experimentos foi 0,66 mg/mL, 0,52 mg/mL e 0,6 mg/mL.

Figura 7. Perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida (12%) do plasma humano submetido ao enriquecimento de proteínas pouco abundantes com ProteoMiner. M: padrões de massa molecular. Linha 1: plasma total (2 µg); linha 2: fração retida e eluída com uréia 8 M contendo CHAPS 2% (2 µg); linha 3: fração não retida (2 µg). Coloração por prata.

4.2 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma humano (degradoma)

As amostras de plasma utilizadas neste estudo, incluindo o plasma total e aqueles que sofreram processamento, como descrito acima, passarão a ser assim denominadas: i) plasma total: **P(T)**; ii) plasma depletado de albumina com a resina Blue Sepharose CL-6B: **P(depA)**; iii) plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes com a coluna de imunoafinidade ProteoPrep 20: **P(dep20)**; iv) plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes com ProteoMiner: **P(enrq)**.

As amostras P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq) foram incubadas com o HF3 na proporção de 1:100 (p/p), por 2 h, a 37 °C, e diferentes estratégias analíticas foram

adotadas para se avaliar o efeito do HF3 sobre as proteínas plasmáticas, descritas esquematicamente na Figura 8.

Figura 8. Esquema das estratégias analíticas envolvidas neste estudo.

4.2.1 Análise da fração proteica

A primeira abordagem utilizada para elucidarmos os efeitos do HF3 sobre o plasma foi a verificação do perfil eletroforético da sua fração proteica obtida pela precipitação com acetona, comparando o plasma controle e plasma tratado com o HF3.

Os perfis eletroforéticos das frações proteicas, após incubação com o HF3, estão apresentados na Figura 9. As bandas que diminuíram de intensidade no plasma tratado, em relação ao plasma controle, indicam proteínas que podem ter sido degradadas pelo HF3, ao passo que as bandas que aumentaram de intensidade no plasma tratado indicam produtos de proteólise do HF3 derivados de proteínas de massa molecular mais alta.

Analisando o perfil eletroforético do P(T) tratado com o HF3, em comparação ao controle, é possível observar um aumento de bandas na região acima de 225 kDa, e uma pequena alteração na mobilidade de uma banda intensa na região de 52 kDa; o P(depA) tratado com o HF3 apresentou uma diminuição da intensidade de bandas na região acima de 140 kDa, e também uma pequena alteração na mobilidade da banda na região de 52 kDa; o P(dep20) tratado com HF3 não mostrou muitas alterações visíveis no perfil eletroforético, apresentando apenas uma diminuição da intensidade das bandas na região entre 90 kDa e 120 kDa; finalmente, o P(enrq) tratado com o HF3 apresentou diversas alterações quando comparado ao plasma controle, como a diminuição da intensidade das bandas nas regiões de 55 kDa, 40 kDa e 25 kDa, e aumento da intensidade das bandas na regiões de 34 kDa e 22 kDa.

Figura 9. Perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras de plasma incubadas com HF3. M: padrões de massa molecular; C: plasma controle (5 µg); T: plasma incubado com HF3 na proporção de 1:100 (p/p), por 2 h, a 37 °C (5 µg). Os retângulos vermelhos indicam regiões que apresentaram intensidades de coloração diferentes entre o plasma controle e o tratado. Coloração por prata.

Estes perfis eletroforéticos indicam claras diferenças entre o plasma controle e o tratado, evidenciando o efeito proteolítico do HF3 sobre as proteínas do plasma *in vitro*. Entretanto, o perfil eletroforético do P(enrq) apresentou diferenças mais significativas entre as amostras do controle e do tratado, possivelmente devido ao fato de que o método de enriquecimento de proteínas pouco abundantes do proteoma plasmático foi mais eficiente em minimizar o intervalo de concentração dinâmica das proteínas (*dynamic range*), possibilitando a melhor visualização das proteínas degradadas, na eletroforese. Desta maneira, com a finalidade de identificar as proteínas presentes nas bandas diferenciais, o perfil eletroforético do efeito do HF3 sobre o P(enrq) foi avaliado utilizando-se um gel de área maior (16 cm x 20 cm) e quantidade mais alta de proteínas (50 µg). Para esta análise, dois experimentos de incubação de P(enrq) com HF3, como descrito anteriormente, foram realizados e amostras resultantes foram analisadas e mostraram perfis eletroforéticos semelhantes entre si. As faixas contendo bandas de proteínas que mostraram diferenças de intensidade nas amostras controle e tratada foram recortadas, conforme mostrado na Figura 10, e submetidas à digestão tripsínica *in gel* e subsequente análise por LC-MS/MS para identificação das proteínas correspondentes, cujos resultados estão descritos na Tabela 1.

Figura 10. Perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida (12%) da amostra de P(enrq) incubada com HF3. M: padrões de massa molecular; C: plasma controle (50 µg); T: plasma incubado com HF3 na proporção de 1:100 (p/p), por 2 h, a 37 °C (50 µg). Os retângulos indicam as faixas que foram recortadas para digestão *in gel* e identificação por LC-MS/MS. Coloração por Coomassie blue.

Tabela 1. Identificação de proteínas presentes nas faixas diferenciais das amostras de P(enrq) controle e tratada com HF3, indicadas na Figura 10, por LC-MS/MS.

			Contagem de espectros ²			
			Exp 1		Exp 2	
	Identificação ¹	Descrição da proteína/MM	C	T	C	T
Faixa 1						
~80 kDa	IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region/ 68 kDa	8	7	12	12
	THRB_HUMAN	Prothrombin/ 72 kDa	22	5	9	
Faixa 2						
~72 kDa	CO4A_HUMAN	Complement C4-A/ 95 kDa, 75 kDa, 30 kDa	19	12	16	30
	VTNC_HUMAN	Vitronectin/ 75 kDa	18		6	1
	CO3_HUMAN	Complement C3/ 110, 75 kDa			5	4
	C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain/ 70 kDa	2		1	2
Faixa 3						
~60 kDa	ALBU_HUMAN	Serum albumin/ 66 kDa	29	8	29	33
	FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain/ 63 kDa	13			
Faixa 4						
~58 kDa	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain/ 56 kDa	25	1	8	
	VTNC_HUMAN	Vitronectin/ 75 kDa	2	4		4
	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region/ 60 kDa		1	2	3
Faixa 5						
~50 kDa	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain/ 47 kDa	19	15	12	12
	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain/ 56 kDa	2	22	5	8
	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region/ 60 kDa	5	1	5	3
	VTNC_HUMAN	Vitronectin/ 75 kDa	2	2		1
	ALBU_HUMAN	Serum albumin/ 66 kDa			1	2
	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein/ 58 kDa		2		
Faixa 6						
~45 kDa	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV/ 46 kDa	42	4	25	5
	VTNC_HUMAN	Vitronectin/ 75 kDa	4	8	2	11
	FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain/ 63 kDa		3	3	1
	PON1_HUMAN	Serum paraoxonase/arylesterase 1/ 43 kDa			6	2
	CO3_HUMAN	Complement C3/ 110, 75 kDa	2		1	1
Faixa 7						
~28 kDa	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I / 28 kDa	63	33	63	20
	C1QC_HUMAN	Complement C1q subunit C	2		1	
	FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain/ 63 kDa		1	1	1

¹Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt.

²A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados no item 3.8.3.2 (Material e Métodos).
MM: massa molecular da proteína, conforme descrito na literatura; C: controle; T: tratado.

Neste experimento, os critérios utilizados para a determinação das proteínas que foram hidrolisadas pelo HF3 foram: i) intensidade de coloração das bandas de proteínas no plasma tratado em relação ao controle; ii) contagem de espectros obtida no experimento de LC-MS/MS, realizado para cada faixa do gel; iii) massa molecular teórica da proteína intacta, em comparação à massa molecular apresentada na faixa do gel; iv) reprodutibilidade dos experimentos. De acordo com estes parâmetros, as seguintes proteínas podem ser consideradas como tendo sido clivadas pelo HF3:

- 1) a protrombina (faixa 1), que foi identificada em menor abundância na amostra tratada com o HF3;
- 2) a vitronectina, que foi identificada na faixa 2 em menor abundância na amostra tratada com o HF3, enquanto que nas faixas 4 e 6, que contêm proteínas de massa molecular mais baixa, foi identificada em maior abundância na amostra tratada, o que pode indicar a presença de seus produtos de clivagem.
- 3) a cadeia beta do fibrinogênio que foi identificada na faixa 4 em menor abundância na amostra tratada com o HF3, indicando uma possível proteólise, enquanto que na faixa 5, região correspondente a massa molecular mais baixa, esta proteína foi identificada em maior abundância na amostra tratada, o que pode indicar a presença de seus produtos de clivagem.
- 4) a apolipoproteína A-IV (faixa 6) foi identificada em menor abundância na amostra tratada com o HF3.
- 5) a apolipoproteína A-I (faixa 7) foi identificada em menor abundância na amostra tratada com o HF3.

Ainda que outras proteínas tenham sido identificadas nas faixas de gel, de acordo com os parâmetros da ferramenta de busca Mascot e do programa de validação de espectros de MS/MS Scaffold, estas não foram consideradas como

possíveis substratos do HF3, pois não atenderam aos critérios selecionados para a análise, como descrito acima.

4.2.2 Análise da fração peptídica

A segunda abordagem utilizada para a investigação dos efeitos do HF3 sobre o plasma humano foi a identificação dos peptídeos presentes em sua fração peptídica após incubação com o HF3. Considerando que os peptídeos presentes no plasma após a incubação destecom o HF3, e ausentes em seu respectivo controle, são provavelmente produtos oriundos da clivagem de proteínas plasmáticas pelo HF3, a identificação destes peptídeos por espectrometria de massas indica os substratos degradados por esta proteinase.

Conforme descrito anteriormente, foram obtidas separadamente três amostras dos plasmas P(depA), P(dep20) e P(enrq), e estas foram incubadas com o HF3, e a seguir submetidas à precipitação de proteínas com acetona/metanol, e tratamento e análise da fração peptídica (remoção de detergentes, sais e outros contaminantes e análise por LC-MS/MS). O P(T) (três amostras) também foi incubado com o HF3, seguido de precipitação de proteínas com acetona/metanol e demais procedimentos descritos acima. Ao final, foi possível realizar uma análise comparativa dos dados obtidos em doze experimentos, sendo três de cada método de preparação do plasma humano e três experimentos com o P(T).

Para a identificação de peptídeos, utilizamos duas abordagens de bioinformática:

1) busca em banco de dados pela ferramenta Mascot v2.2 e validação dos resultados pelas ferramentas PeptideProphet e ProteinProphet da plataforma TPP v4.6; esta abordagem passará a ser denominada **Mascot/TPP**.

2) sequenciamento *de novo*, busca em banco de dados e validação dos resultados pelo programa Peaks Studio 7; esta abordagem passará a ser denominada **Peaks**.

4.2.2.1 Critérios para a seleção de proteínas plasmáticas clivadas pelo HF3

Os três experimentos realizados com cada uma das quatro amostras de plasma, P(T) P(depA), P(dep20) e P(enrq), foram analisados individualmente por ambos os métodos de bioinformática descritos acima, e os seguintes critérios foram utilizados para que uma proteína fosse considerada como tendo sido clivada pelo HF3:

1. Considerando que peptídeos presentes tanto na amostra controle quanto na amostra tratada não são peptídeos oriundos da clivagem pelo HF3, os peptídeos identificados na amostra controle, em qualquer um dos três experimentos, foram excluídos da lista de peptídeos identificados nas amostras tratadas com o HF3. Desta maneira, permaneceram na análise apenas as proteínas que apresentaram peptídeos identificados exclusivamente na amostra tratada com o HF3;

2. Entre estas proteínas, foram consideradas como substrato do HF3 aquelas identificadas em pelo menos dois dos três experimentos.

Nas tabelas apresentadas a seguir estão descritas somente as proteínas consideradas como substrato do HF3, conforme os critérios descritos acima. As tabelas contendo os dados completos de identificação das proteínas e seus respectivos peptídeos por espectrometria de massas, incluindo aqueles identificados nas amostras do controle, e *scores* de identificação, estão apresentadas em Anexos (Tabelas A1-A8, em CD-ROM).

4.2.2.2 Plasma total

As Tabelas 2 e 3 apresentam as proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados na fração peptídica dos três experimentos de incubação do HF3 com o P(T), e identificados pelas abordagens *Mascot/TPP* e *Peaks*, respectivamente, e que foram consideradas como alvo do HF3, de acordo com os critérios apresentados acima.

Tabela 2. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(T) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(T) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	1		1
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	12	13	13
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	75	94	92
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	2		2
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	9	25	14
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	13	30	19
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	5	6	7
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	7	17	11
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	9	19	13
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	3	4	3
APOF_HUMAN	Apolipoprotein F	2	5	3
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	4	9	5
CLUS_HUMAN	Clusterin	17	42	29
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	1	2	2
C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent	3	3	2
CO3_HUMAN	Complement C3	9	18	16
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	19	30	24
CO9_HUMAN	Complement component C9		2	1
CFAH_HUMAN	Complement factor H	1	2	
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	126	221	163
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	16	52	32
FINC_HUMAN	Fibronectin	7	12	6
GELS_HUMAN	Gelsolin	5	8	7
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	10	10	8
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region		5	1
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	2	5	2

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(T) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	6	5	6
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	51	92	79
ITIH3_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	1	2	1
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	24	37	28
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	8	8	10
PEDF_HUMAN	Pigment epithelium-derived factor	3	4	3
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein		1	2
THRB_HUMAN	Prothrombin	17	25	20
TTHY_HUMAN	Transthyretin	6	17	17
VTNC_HUMAN	Vitronectin	18	31	24

¹ Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt.

² A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados nos itens 3.8.4.2 e 4.2.2.1. Espectros correspondentes a peptídeos encontrados exclusivamente na amostra de P(T) incubada com HF3.

Tabela 3. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(T) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*.

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(T) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
ACTB_HUMAN	Actin cytoplasmic 1	7	3	
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	6	10	5
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	20	24	18
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	270	437	391
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	9	4	8
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	43	58	50
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	63	70	60
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	23	21	16
APOC1_HUMAN	Apolipoprotein C-I	4	5	
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	30	41	30
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	34	43	30
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	10	9	10
APOF_HUMAN	Apolipoprotein F	7	11	12
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	36	38	35
CLUS_HUMAN	Clusterin	89	108	90
FA5_HUMAN	Coagulation factor V	3		3
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	18	15	15
C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent	26	20	16
CO3_HUMAN	Complement C3	20	26	21
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	61	76	67
CO9_HUMAN	Complement component C9	3	4	

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(T) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
CFAH_HUMAN	Complement factor H	3	2	
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	369	602	462
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	39	53	45
FINC_HUMAN	Fibronectin	29	29	22
GELS_HUMAN	Gelsolin	28	21	25
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	24	55	39
H2BFS_HUMAN	Histone H2B type F-S	4	1	
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	6	8	7
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	6	6	6
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	17	17	19
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	204	230	224
ITIH3_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	6	4	5
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	93	103	94
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	33	21	30
PEDF_HUMAN	Pigment epithelium-derived factor	5	5	4
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	5	5	5
THRB_HUMAN	Prothrombin	63	62	65
ALBU_HUMAN	Serum albumin		3	2
TTHY_HUMAN	Transthyretin	43	43	43
VTNC_HUMAN	Vitronectin	74	78	71

¹ Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt.

² A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados nos itens 3.8.4.2 e 4.2.2.1. Espectros correspondentes a peptídeos encontrados exclusivamente na amostra de P(T) incubada com HF3.

Comparando-se os resultados obtidos, verificamos que 36 proteínas foram identificadas como tendo sido clivadas pelo HF3, por ambas as abordagens de identificação, como apresentado na Figura 11. Nenhuma proteína foi identificada exclusivamente por *Mascot/TPP* e 5 proteínas foram identificadas como substrato do HF3, exclusivamente por *Peaks*.

Figura 11. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(T) após incubação com o HF3, e que foram consideradas como substrato da proteinase. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

4.2.2.3 Plasma depletado de albumina (Blue Sepharose CL-6B)

As Tabelas 4 e 5 apresentam as proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados na fração peptídica dos três experimentos de incubação do HF3 realizados com o P(depA), e identificados pelas abordagens *Mascot/TPP* e *Peaks*, respectivamente, e que foram consideradas como alvo do HF3, de acordo com os critérios apresentados acima.

Tabela 4. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(depA) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(depA) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	1	10	11
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	10	12	11
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	84	109	117
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	13		1
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	5	3	1
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	8	5	7

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(depA) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	4	3	2
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	6	12	10
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	3	2	2
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1		4	1
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin		2	3
CLUS_HUMAN	Clusterin	1	2	2
CO3_HUMAN	Complement C3		2	4
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain		3	14
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	7	14	20
FINC_HUMAN	Fibronectin		1	2
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	2	1	
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	2	7	18
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4		4	4
MGAP_HUMAN	Isoform 3 of MAX gene-associated protein	4	2	
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	1	2	1
THRB_HUMAN	Prothrombin	1	2	5
PON1_HUMAN	Serum paraoxonase/arylesterase 1	7	15	21
TTHY_HUMAN	Transthyretin	27	33	34

¹ Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt.

² A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados nos itens 3.8.4.2 e 4.2.2.1. Espectros correspondentes a peptídeos encontrados exclusivamente na amostra de P(depA) incubada com HF3.

Tabela 5. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(depA) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*.

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(depA) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
ACTG_HUMAN	Actin cytoplasmic 1	1		1
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	16	24	25
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	17	18	20
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	219	226	230
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	33	8	6
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	17	13	11
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	13	13	15
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	11	8	8
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	21	25	27
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	2	4	4
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	4	8	10
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	2	6	9

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(depA) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
CLUS_HUMAN	Clusterin	5	16	12
CO3_HUMAN	Complement C3		2	8
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	2	13	41
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	13	20	28
GPX3_HUMAN	Glutathione peroxidase 3	5	7	
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	7	26	42
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4		8	7
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	2	8	6
THRB_HUMAN	Prothrombin	2	6	12
PON1_HUMAN	Serum paraoxonase/arylesterase 1	27	36	52
TTHY_HUMAN	Transthyretin	44	57	68

¹ Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt.

² A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados nos itens 3.8.4.2 e 4.2.2.1. Espectros correspondentes a peptídeos encontrados exclusivamente na amostra de P(depA) incubada com HF3.

Comparando-se os resultados obtidos, verificamos que 21 proteínas foram identificadas como tendo sido clivadas pelo HF3, por ambas as abordagens de identificação, como apresentado na Figura 12. Exclusivamente por *Mascot/TPP*, foram identificadas 3 proteínas, e 2 proteínas foram identificadas como produtos de clivagem do HF3 exclusivamente por *Peaks*.

Figura 12. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(depA) após incubação com o HF3, e que foram consideradas como substrato da proteinase. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

4.2.2.4 Plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes (ProteoPrep 20)

As Tabelas 6 e 7 apresentam as proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados na fração peptídica dos três experimentos de incubação do HF3 com o P(dep20), e identificados pelas abordagens *Mascot/TPP* e *Peaks*, respectivamente, e que foram consideradas como alvo do HF3, de acordo com os critérios apresentados acima.

Tabela 6. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(dep20) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(dep20) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
ACTB_HUMAN	Actin cytoplasmic 1	6		2
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	70	28	20
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	270	150	134
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	5	4	3
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	69	39	36
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	39	19	21
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	28	48	15
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	39	4	10
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	55	9	10
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	4	9	2
APOF_HUMAN	Apolipoprotein F	17	7	2
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	8	4	7
CLUS_HUMAN	Clusterin	5	2	8
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	5		1
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	5		2
CO3_HUMAN	Complement C3	5	2	3
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	6		10
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	159	50	83
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain - isoform Gamma-A	2	19	
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	31	38	14
FINC_HUMAN	Fibronectin	4	1	8
GELS_HUMAN	Gelsolin	49	18	14
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	2	6	14
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	4		9
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	20	18	34
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	131	44	38
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	7	1	3
THRB_HUMAN	Prothrombin	1	2	23
TETN_HUMAN	Tetranectin	5	2	5
TTHY_HUMAN	Transthyretin	9	2	10
VTNC_HUMAN	Vitronectin	33	9	11

¹ Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt.

²A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados nos itens 3.8.4.2 e 4.2.2.1. Espectros correspondentes a peptídeos encontrados exclusivamente na amostra de P(dep20) incubada com HF3.

Tabela 7. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(dep20) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*.

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(dep20) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
ACTB_HUMAN	Actin cytoplasmic 1	18		2
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	81	39	30
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	454	232	245
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	7	6	4
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	91	58	62
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	56	30	37
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	56	71	31
APOC1_HUMAN	Apolipoprotein C-I	2	2	
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	46	6	18
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	68	14	17
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	8	11	7
APOF_HUMAN	Apolipoprotein F	26	4	
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	8	3	19
CBPB2_HUMAN	Carboxypeptidase B2	1		4
CLUS_HUMAN	Clusterin	10	4	30
F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	5		1
CO3_HUMAN	Complement C3	5	2	6
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	9		15
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	4	3	
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	162		122
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	34	44	17
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain - isoform Gamma-A	3	19	
FINC_HUMAN	Fibronectin	6	5	22
GELS_HUMAN	Gelsolin	68	23	42
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	5	7	29
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	4		12
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	31	23	69
ITIH3_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	2		9
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	174	56	80
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 - isoform 2	1	9	
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	17	3	9

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(dep20) incubada com HF32		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
THRB_HUMAN	Prothrombin	1	2	61
SAA4_HUMAN	Serum amyloid A-4 protein	7	1	
TETN_HUMAN	Tetranectin	5	2	6
TTHY_HUMAN	Transthyretin	10	2	15
VTNC_HUMAN	Vitronectin	43	12	15

¹ Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt.

² A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados nos itens 3.8.4.2 e 4.2.2.1. Espectros correspondentes a peptídeos encontrados exclusivamente na amostra de P(dep20) incubada com HF3.

Comparando-se os resultados obtidos, verificamos que 30 proteínas foram identificadas como tendo sido clivadas pelo HF3, por ambas as abordagens de identificação, como apresentado na Figura 13. Exclusivamente por *Mascot/TPP*, foram identificadas 2 proteínas, e 5 proteínas foram identificadas como produtos de clivagem do HF3 exclusivamente por *Peaks*.

Figura 13. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(dep20) após incubação com o HF3, e que foram consideradas como substrato da proteinase. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

4.2.2.5 Plasma enriquecido de proteínas pouco abundantes (ProteoMiner)

As Tabelas 8 e 9 apresentam as proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados na fração peptídica dos três experimentos de incubação do HF3 com o P(enrq), e identificados pelas abordagens *Mascot/TPP* e *Peaks*, respectivamente, e que foram consideradas como alvo do HF3, de acordo com os critérios apresentados acima.

Tabela 8. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(enrq) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*.

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(enrq) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	3	15	1
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	1	2	
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	32	31	30
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	80	127	17
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	37	69	20
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	52	86	11
APOC1_HUMAN	Apolipoprotein C-I	11	17	
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	22	21	5
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	19	51	5
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	29	9	4
APOF_HUMAN	Apolipoprotein F	1	2	
CBPB2_HUMAN	Carboxypeptidase B2	1		1
CLUS_HUMAN	Clusterin	1	18	
COL11_HUMAN	Collectin-11		2	1
CO3_HUMAN	Complement C3	8	9	7
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	4	14	4
CFAH_HUMAN	Complement factor H		3	2
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	82	141	40
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	160	29	9
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain - isoform Gamma-A of	8	9	
FINC_HUMAN	Fibronectin	4	7	6
FCN2_HUMAN	Ficolin-2	1	2	
GELS_HUMAN	Gelsolin	3	2	1
GPX3_HUMAN	Glutathione peroxidase 3	1		1
HABP2_HUMAN	Hyaluronan-binding protein 2	2	3	

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(enrq) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C7 region		2	4
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	1	9	
LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	3	4	
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	2	4	
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	23	24	2
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	10	7	2
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	2	3	
THRB_HUMAN	Prothrombin	7	20	5
ALBU_HUMAN	Serum albumin	1	10	1
SAA4_HUMAN	Serum amyloid A-4 protein	4	3	
TTHY_HUMAN	Transthyretin	2	5	
PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S	2	1	
VTNC_HUMAN	Vitronectin	19	43	13

¹ Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt.

²A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados nos itens 3.8.4.2 e 4.2.2.1. Espectros correspondentes a peptídeos encontrados exclusivamente na amostra de P(enrq) incubada com HF3.

Tabela 9. Proteínas clivadas pelo HF3, obtidas pela análise da fração peptídica do P(enrq) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*.

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(enrq) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	5	18	3
A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	2	4	
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	51	60	49
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	171	258	37
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A-II	56	132	26
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	124	201	20
APOC1_HUMAN	Apolipoprotein C-I	34	45	2
APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-II	27	32	9
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III	43	88	11
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	57	30	13
APOF_HUMAN	Apolipoprotein F	1	2	
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1		3	2
C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain	3	5	
CBPB2_HUMAN	Carboxypeptidase B2	1		1
CLUS_HUMAN	Clusterin	7	49	
CO1A2_HUMAN	Collagen alpha-2(I) chain	1		1
COL11_HUMAN	Collectin-11	3	5	2
C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit	1		1

Identificação ¹	Descrição da proteína	Contagem de espectros da amostra de P(enrq) incubada com HF3 ²		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3
C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent	1	3	
CO3_HUMAN	Complement C3	13	22	21
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	17	30	11
CFAH_HUMAN	Complement factor H		7	2
FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1	3	8	
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	149	241	63
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	84	50	7
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain - isoform	19	25	
FINC_HUMAN	Fibronectin	4	10	15
FCN2_HUMAN	Ficolin-2	2	4	
LG3BP_HUMAN	Galectin-3-binding protein	2	2	
GELS_HUMAN	Gelsolin	5	6	2
GPX3_HUMAN	Glutathione peroxidase 3	1	2	1
HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	1	5	
HABP2_HUMAN	Hyaluronan-binding protein 2	2	6	
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region		6	10
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	3	14	1
KV309_HUMAN	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	1	6	
KV402_HUMAN	Ig kappa chain V-IV region Len	1	2	
LV101_HUMAN	Ig lambda chain V-I region V	1	3	2
LV403_HUMAN	Ig lambda chain V-IV region Hil		3	1
LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	8	12	9
IGLL5_HUMAN	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5		8	12
ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	3	8	
ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	35	42	3
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	21	20	8
KNG1_HUMAN	Kininogen-1	6	6	3
PLMN_HUMAN	Plasminogen	1	6	
PRAP1_HUMAN	Proline-rich acidic protein 1	4	1	2
THRB_HUMAN	Prothrombin	21	43	12
ALBU_HUMAN	Serum albumin	2	25	6
SAA4_HUMAN	Serum amyloid A-4 protein	14	11	1
TTHY_HUMAN	Transthyretin	7	13	3
PROC_HUMAN	Vitamin K-dependent protein C		1	1
PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S	4	5	1
VTNC_HUMAN	Vitronectin	41	85	20

¹ Nome de entrada da proteína no banco de dados UniProt

²A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados nos itens 3.8.4.2 e 4.2.2.1. Espectros correspondentes a peptídeos encontrados exclusivamente na amostra de P(enrq) incubada com HF3.

Comparando-se os resultados obtidos, verificamos que 38 proteínas foram identificadas como tendo sido clivadas pelo HF3, por ambas as abordagens de identificação, como apresentado na Figura 14. Nenhuma proteína foi identificada exclusivamente por *Mascot/TPP*, e 16 proteínas foram identificadas como produtos de clivagem do HF3 exclusivamente por *Peaks*.

Figura 14. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(enrq) após incubação com o HF3, e que foram consideradas como substrato da proteinase. Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

4.2.2.6 Comparação dos resultados obtidos com as diferentes amostras de plasma

No intuito de verificar a contribuição dos métodos de preparação do plasma, utilizados para a identificação de substratos do HF3, diagramas de Venn foram elaborados descrevendo as proteínas identificadas em cada método, conforme apresentado na Figura 15 (*Mascot/TPP*) e na Figura 16 (*Peaks*). A análise por *Mascot/TPP* mostrou que o método de enriquecimento de proteínas pouco abundantes P(enrq) foi o mais efetivo para o achado de novos substratos, já que

resultou em um total de 11 proteínas exclusivamente identificadas, enquanto que 19 proteínas foram identificadas nas quatro diferentes amostras de plasma utilizadas (Figura 15). A análise por *Peaks* confirmou este achado, já que 19 proteínas foram identificadas como substratos do HF3 exclusivamente no P(enrq) e 18 proteínas foram identificadas nas quatro diferentes amostras de plasma utilizadas (Figura 16).

Comparando-se as proteínas identificadas como substratos em comum nos quatro tipos de plasma e pelas duas abordagens de análise bioinformática (19 por *Mascot/TPP* e 18 por *Peaks*), verifica-se que 17 são comuns a ambas as abordagens, reforçando a indicação de que essas proteínas sejam alvo do HF3 no plasma humano, incluindo algumas que não haviam sido descritas como possíveis alvos do HF3 (Figura 17).

Figura 15. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq), após incubação com o HF3, e que foram consideradas como substrato da proteinase. Identificação por *Mascot/TPP*.

Figura 16. Diagrama de Venn das proteínas às quais pertencem os peptídeos identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq), após incubação com o HF3, e que foram consideradas substratos da proteinase. Identificação por *Peaks*.

Figura 17. Diagrama de Venn das proteínas identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do plasma após incubação com o HF3 e consideradas alvos da proteinase. Dados referentes às proteínas identificadas como substrato do HF3 por todos os métodos de tratamento do plasma (região central dos diagramas apresentados nas Figuras 15 e 16). Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

4.2.2.7 Comparação dos resultados obtidos pelas abordagens *Mascot/TPP* e *Peaks*

De maneira semelhante à análise dos resultados obtidos com as diferentes amostras de plasma, foi também avaliado o impacto da utilização de duas metodologias para identificação de proteínas (*Mascot/TPP* e *Peaks*) no resultado final. O diagrama de Venn combinando as proteínas consideradas substratos do HF3 nos experimentos realizados com o P(T), P(depA), P(dep20), P(enrq), e identificadas por *Mascot/TPP* e *Peaks*, mostra que 53 proteínas foram identificadas em comum, enquanto 1 proteína foi identificada somente por *Mascot/TPP* e 17 proteínas exclusivamente por *Peaks* (Figura 18). Neste caso, entende-se número de proteínas por número de entradas no banco de dados Uniprot.

Figura 18. Diagrama de Venn das proteínas identificados por LC-MS/MS na fração peptídica do plasma após incubação com o HF3 e consideradas alvos da proteinase. Dados referentes à combinação dos resultados obtidos nos experimentos realizados com o P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq). Comparação entre a identificação por *Mascot/TPP* e *Peaks*.

4.2.2.8 Mapeamento da especificidade enzimática primária do HF3 sobre proteínas plasmáticas

Conforme mencionado anteriormente, os peptídeos gerados pela incubação do plasma com o HF3, e que estavam ausentes em seu respectivo controle, foram considerados como produtos oriundos da clivagem de proteínas plasmáticas pelo HF3.

Um grande número de peptídeos derivados da ação do HF3 sobre as proteínas plasmáticas foram identificados nos experimentos realizados com o P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq), e estes peptídeos foram usados não apenas para a verificação das proteínas que foram hidrolisadas pelo HF3, como também para a realização do mapeamento de sequências de aminoácidos adjacentes aos sítios de clivagem, que são preferenciais da proteinase (especificidade primária). Para tanto, foram utilizadas as sequências de aminoácidos dos peptídeos, correspondentes às posições P1'-P6' (Schechter e Berger, 1967), identificados nas amostras tratadas com o HF3 e oriundos

das proteínas consideradas como substrato (itens 4.2.2.2 a 4.2.2.5); as sequências de aminoácidos complementares (P6-P1) adjacentes aos sítios de clivagem dos respectivos peptídeos foram obtidas utilizando-se uma ferramenta disponível *online* na página <http://clipserve.clip.ubc.ca/pics> (Schilling et al., 2011), que também gerou a representação gráfica (*heat map*) da sequência consenso de clivagem pela proteinase.

Os *heat maps* que representam a ocorrência dos aminoácidos nas posições P6-P6' estão descritos nas Figuras 19 e 20, correspondentes aos resultados de identificação obtidos pelas abordagens *Mascot/TPP* e *Peaks*, respectivamente. Foi interessante verificar que, apesar de o número de sítios de clivagem identificados pela abordagem *Peaks* ter sido mais alto do que por *Mascot/TPP*, os *heat maps* gerados com dados de ambas as abordagens, para os dados de todas as amostras de plasma, são muito semelhantes, e evidenciaram a preferência do HF3 por Leu na posição P1', seguido de Phe, também na posição P1'.

Figura 19. *Heat maps* das ocorrências relativas de aminoácidos em porcentagem (lado esquerdo) e ocorrência de aminoácidos em sítios de clivagem em relação à sua abundância natural (lado direito), nas posições P6-P6', verificados a partir da identificação dos peptídeos gerados pela atividade proteolítica do HF3 sobre proteínas plasmáticas. Identificação por LC-MS/MS da fração peptídica do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq), após incubação com o HF3. Foram considerados na análise apenas os peptídeos oriundos de proteínas consideradas como substratos do HF3. A linha branca representa o ponto de clivagem pela proteinase. Identificação por *Mascot/TPP*.

Figura 20. *Heat maps* das ocorrências relativas de aminoácidos em porcentagem (lado esquerdo) e ocorrência de aminoácidos em sítios de clivagem em relação à sua abundância natural (lado direito), nas posições P6-P6', verificados a partir da identificação dos peptídeos gerados pela atividade proteolítica do HF3 sobre proteínas plasmáticas. Identificação por LC-MS/MS da fração peptídica do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq), após incubação com o HF3. Foram considerados na análise apenas os peptídeos oriundos de proteínas consideradas como substratos do HF3. A linha branca representa o ponto de clivagem pela proteinase. Identificação por *Peaks*.

4.3 Validação de alguns substratos do HF3 no plasma

Para validação de algumas proteínas identificadas como substratos do HF3 através da análise proteômica, proteínas disponíveis comercialmente foram selecionadas e incubadas com o HF3 na proporção enzima-substrato 1:10 (p/p) por duas horas a 37° C, e submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Nestas condições, observamos que os componentes C4 e C3 do sistema complemento, o plasminogênio e a protrombina foram degradados pelo HF3 (Figura 21).

Figura 21. Atividade proteolítica do HF3 sobre proteínas isoladas. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida: Componente C4 do sistema complemento (gel 12%), plasminogênio e componente C3 do sistema complemento (gel 10%), e protrombina (gel 12%). As proteínas foram incubadas com HF3 na proporção de 1:10 (p/p), por 2 h, a 37°C. M: padrões de massa molecular; C: controle (2 µg); T: tratado, proteínas incubadas por 2 h com HF3 (0,2 µg); Alb: banda correspondente à albumina humana; Prt: banda correspondente à protrombina. Coloração por prata.

4.4 Identificação dos peptídeos gerados pela clivagem do fibrinogênio isolado pelo HF3

Por meio da análise da fração peptídica do plasma, após a incubação com o HF3 e precipitação de proteínas, foram detectados peptídeos oriundos das cadeias alfa, beta e gama do fibrinogênio, indicando a sua proteólise pelo HF3. A proteólise da cadeia gama do fibrinogênio pelo HF3 não havia sido reportada anteriormente. Além disso, peptídeos da porção C-terminal da cadeia gama do fibrinogênio foram identificados como produto da atividade do HF3 no P(dep20) e P(enrq) (Tabelas 6-7, 8-9) indicando a clivagem do HF3 nesta região. Estudos mostraram que a porção C-terminal da cadeia gama do fibrinogênio exerce papéis importantes na interação com plaquetas (Kloczewiak et al., 1984), estabilização da fibrina (Chen e Doolittle, 1970), e o peptídeo C-terminal tem um papel na inibição da agregação plaquetária (Rand et al., 1999).

Desta maneira, para a validação dos peptídeos gerados pela clivagem do fibrinogênio pelo HF3, foi realizada a incubação da metaloproteinase com o fibrinogênio isolado, seguida de análise da fração peptídica resultante por LC-MS/MS. Esta análise revelou os peptídeos gerados pela atividade enzimática do HF3, e, indiretamente, os pontos de clivagem do HF3 na proteína. A Figura 22 representa a localização dos peptídeos identificados na sequência da proteína, que totalizaram 73 peptídeos da cadeia alfa e 15 peptídeos da cadeia beta. Foram identificados 8 peptídeos da cadeia gama do fibrinogênio, incluindo os peptídeos localizados na região C-terminal, confirmando os dados obtidos pela incubação do HF3 com o plasma. Estes dados também corroboram com estudos anteriores que descrevem a clivagem mais extensiva da cadeia alfa, seguida por clivagem mais limitada da cadeia

beta do fibrinogênio (Oliveira et al., 2010), pelo HF3. A cadeia gama do fibrinogênio não havia sido descrita como substrato do HF3.

A tabela contendo os dados completos de identificação dos peptídeos por espectrometria de massas e *scores* de identificação, está apresentada em Anexos (Tabela A9, em CD-ROM).

Figura 22. Sequência de aminoácidos do fibrinogênio humano [cadeias alfa (A), beta (B) e gama (C)] indicando os peptídeos identificados como produto de hidrólise pelo HF3. Ilustração obtida pelo programa Peaks Studio 7.

4.5 Mapeamento de sítios de clivagem do HF3 em uma biblioteca de peptídeos derivada do plasma humano

Para a avaliação da especificidade primária do HF3, além da análise baseada nos pontos de clivagem das proteínas plasmáticas, também utilizamos uma biblioteca de peptídeos tripsínicos derivada do plasma humano (depletado de albumina), que foi preparada conforme descrito no item 3.9. Foram realizados dois experimentos de incubação da biblioteca de peptídeos (300 µg) com o HF3, na proporção 1:100 (p/p), por 3 h a 37° C. Visto que os peptídeos presentes na biblioteca possuíam os grupos amina bloqueados por dimetilação com formaldeído, os peptídeos gerados pela clivagem do HF3 foram separados dos demais pela estratégia de biotinylation dos novos N-terminais, seguida de separação por cromatografia de afinidade à resina Streptavidina Sepharose. Os peptídeos gerados pela ação do HF3 foram analisados por LC-MS/MS e identificados por ferramentas bioinformáticas (item 3.9.4).

Combinando os dados obtidos em dois experimentos, foram detectados 71 sítios de clivagem nos peptídeos tripsínicos. A Figura 23 apresenta a ocorrência relativa dos aminoácidos nas posições P6-P6', e a ocorrência em relação à abundância natural dos aminoácidos, que indicam a preferência de aminoácidos apresentada pela metaloproteinase HF3 para estas posições (segundo a nomenclatura de Schechter e Berger, 1967). Analisando a ocorrência relativa dos aminoácidos observa-se a preferência pelos resíduos de leucina na posição P1' (40,8%) e também na posição P2' (23,9%). A presença de resíduos hidrofóbicos, como a leucina, nas posições adjacentes ao sítio de clivagem corrobora com os resultados obtidos no mapeamento de sítios de clivagem utilizando proteínas plasmáticas (item 4.2.2.8, análise da fração peptídica do plasma após incubação com o HF3).

A tabela contendo os dados completos de identificação dos peptídeos por espectrometria de massas e *scores* de identificação, está apresentada em Anexos (Tabela A10, em CD-ROM).

Figura 23. Perfis de especificidade primária do HF3. *Heat map* da porcentagem de ocorrência de aminoácidos nas posições P6-P6' (A), *heat map* da ocorrência de aminoácidos nas posições P6-P6' em relação à sua abundância natural (B), e perfil de preferência (C) em sítios de clivagem do HF3, verificados a partir da incubação do HF3 com uma biblioteca de peptídeos tripsínica de proteínas do plasma. A linha branca nos painéis A e B representa o ponto de clivagem pelo HF3.

4.6 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma de *B. jararaca* (degradoma)

4.6.1 Preparação do plasma de *B. jararaca* para análise proteômica

Com o objetivo de se verificar a existência de atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma de *B. jararaca*, primeiramente a resina Blue Sepharose CL-6B foi utilizada na tentativa de depletar a albumina, e assim minimizar o *dynamic range* do plasma antes da incubação deste com o HF3.

A Figura 24 apresenta o perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida 12% do plasma de *B. jararaca* total e após a incubação com a resina Blue Sepharose CL-6B. Pode-se observar que diversas bandas de proteínas estavam presentes na fração de proteínas que não tiveram afinidade pela resina, e também na fração que foi eluída com o aumento da força iônica no tampão, indicando que esta resina não foi eficiente no reconhecimento específico da albumina. Sendo assim, o plasma de *B. jararaca* íntegro foi utilizado nos experimentos para elucidação da atividade proteolítica do HF3.

Figura 24. Perfil eletroforético do plasma de *B. jararaca* submetido a cromatografia de afinidade à resina Blue Sepharose CL-6B, em gel de SDS-poliacrilamida 12%. M: padrões de massa molecular. Linha 1: plasma total (5 µg); linha 2: fração do plasma não retida à resina Blue Sepharose CL-6B (5 µg); linha 3: fração eluída com NaCl 2 M (5 µg). Coloração por prata.

4.6.2 Análise das frações peptídica e proteica

O plasma total de *B. jararaca* foi incubado com o HF3 na proporção de 1:100 (p/p), por 2 h, a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de uma mistura de acetona/metanol, ocasionando a precipitação de proteínas, e em seguida as frações proteica e peptídica foram separadas por centrifugação. Os peptídeos presentes na sua fração peptídica (sobrenadante) foram analisados por LC-MS/MS e o programa Peaks Studio 7 foi utilizado como abordagem bioinformática para identificação dos peptídeos. A Tabela A11 (Anexos, em CD-Rom) apresenta os resultados obtidos exclusivamente pelo sequenciamento *de novo*, nos dois experimentos realizados, conforme descrito no item 3.10.2 (Material e Métodos). Analisando-se os dados obtidos pelo sequenciamento *de novo*, verificamos que um número maior de peptídeos foi identificado nas amostras de plasma tratadas com o HF3 (162 e 181,

nas amostras tratadas, *versus* 65 e 83, nas amostras de controle). A análise destes peptídeos utilizando a ferramenta de busca em banco de dados para identificar as proteínas às quais pertenciam os mesmos, não levou à identificação de nenhuma proteína como substrato do HF3.

A fração proteica do plasma de *B. jararaca* incubado com o HF3 foi submetida à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12% (Figura 25). O perfil eletroforético do plasma de *B. jararaca* tratado com o HF3 não apresentou alterações quando comparado ao plasma controle.

Figura 25. Perfil eletroforético do plasma de *B. jararaca* incubado com o HF3 em gel de SDS-poliacrilamida (12%). M: padrões de massa molecular; C: plasma controle (2 µg); T: plasma incubado com HF3 na proporção de 1:100 (p/p), por 2 h, a 37°C (2 µg). Coloração por prata.

5. DISCUSSÃO

5.1 Tratamentos do plasma humano para a análise degradômica

Os métodos de depleção das proteínas mais abundantes do plasma humano e o método de enriquecimento de proteínas pouco abundantes resultaram em amostras com perfis eletroforéticos consideravelmente distintos, o que nos permitiu avaliar a atividade proteolítica do HF3 sobre um amplo espectro de proteínas em concentrações que possibilitassem a detecção dos produtos de degradação, por espectrometria de massas. Ainda considerando o perfil eletroforético, o P(enrq) apresentou as maiores diferenças em relação ao plasma total, fato que pode ser atribuído ao próprio princípio da tecnologia ProteoMiner, que, ao equalizar o proteoma de uma amostra, altera significativamente a concentração de proteínas pouco representadas no proteoma.

Millioni et al. (2011) comparam as técnicas de depleção das 20 proteínas mais abundantes com a coluna ProteoPrep 20 e de enriquecimento de proteínas pouco abundantes com Proteominer para a análise do proteoma plasmático. Neste estudo, foi verificado que as duas técnicas são complementares em relação às proteínas identificadas, porém, um número maior de proteínas foi identificado no proteoma do plasma depletado das 20 proteínas mais abundantes. Hakimi et al. (2014) verificaram a eficácia e reprodutibilidade destas mesmas técnicas de depleção/enriquecimento de proteínas plasmáticas; ao comparar 18 proteínas escolhidas aleatoriamente, e constataram que ambas as técnicas são reprodutíveis. Entretanto, a técnica de enriquecimento de proteínas com ProteoMiner forneceu um número maior de proteínas identificadas. É válido ressaltar que grande parte dos estudos que empregam técnicas de depleção das proteínas mais abundantes do plasma ou

enriquecimento de proteínas pouco abundantes têm como objetivo o estudo do proteoma do próprio plasma, e mais na maioria das vezes, mais especificamente, a busca por biomarcadores (Polaskova et al., 2010; Govorukhina et al., 2003; Gong et al., 2006; Quero et al., 2004; Boschetti et al., 2008). Estudos cujo objetivo principal é a verificação do repertório de substratos de uma proteinase sobre um determinado proteoma são menos frequentes e em geral empregam técnicas de depleção de proteínas mais abundantes após a ação da proteinase, em uma etapa anterior à eletroforese unidimensional ou bidimensional (Guerranti et al., 2010; Paes Leme et al., 2012), ou não empregam técnicas de depleção/enriquecimento de proteínas (Hwang et al., 2004; Escalante et al., 2009). No presente estudo, utilizou-se uma estratégia diferenciada no sentido de que técnicas de depleção/enriquecimento de proteínas plasmáticas foram empregadas em uma etapa anterior à incubação com a proteinase. Dessa forma, foi possível avaliar a atividade proteolítica do HF3 por meio da identificação dos peptídeos oriundos das proteínas clivadas, para a caracterização do degradoma do HF3 no plasma *in vitro*.

5.2 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma humano (degradoma)

5.2.1 Análise da fração proteica

Os perfis eletroforéticos da fração proteica do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq) após a incubação com o HF3 indicaram a clivagem de algumas proteínas, observando-se principalmente a diminuição da intensidade de bandas em regiões de alta massa molecular no plasma tratado com o HF3, em comparação ao plasma controle (Figura 9). No entanto, em termos de detecção de produtos de clivagem pela

identificação de proteínas por LC-MS/MS, neste estudo, o P(enrq) se mostrou como a amostra mais apropriada em comparação com o P(T), P(depA) e P(dep20), por apresentar diferenças mais significativas entre as amostras do controle e do tratado, possivelmente devido ao fato de que o método de enriquecimento de proteínas pouco abundantes do proteoma plasmático foi mais eficiente em minimizar o intervalo de concentração dinâmica das proteínas (*dynamic range*), possibilitando a melhor visualização das proteínas degradadas, por eletroforese.

A identificação das bandas diferenciadas no P(enrq) pela digestão *in gel* seguida de LC-MS/MS indicou a clivagem de proteínas como a protrombina, vitronectina, e cadeia beta do fibrinogênio. Estes dados corroboram estudos anteriores de Oliveira et al. (2010) e Paes Leme et al. (2012), que, no caso do fibrinogênio, mostraram que a cadeia alfa também é hidrolisada pelo HF3; o fato de que a degradação desta cadeia não tenha sido verificada por esta abordagem, pode ser explicado pelo fato de que os produtos de degradação podem ser cadeias polipeptídicas curtas que não estejam presentes no gel.

Além disso, as apolipoproteínas A-I e A-IV foram detectadas com um número de espectros muito inferior na amostra tratada com o HF3, em comparação ao controle, indicando que foram extensivamente clivadas, e dessa forma foram consideradas como novos substratos desta proteinase (Tabela 1; Figura 10). Entretanto, a abordagem de identificação das proteínas presentes nas bandas diferenciadas do gel SDS-poliacrilamida, após a incubação com o HF3, não foi capaz de revelar novos substratos desta proteinase importantes no contexto do envenenamento.

5.2.2 Análise da fração peptídica

Considerando que os peptídeos identificados por espectrometria de massas após a incubação do plasma com o HF3, e ausentes em seu respectivo controle, são provavelmente produtos oriundos da clivagem de proteínas plasmáticas pelo HF3, a estrutura destes peptídeos indica os substratos degradados por esta proteinase. Para a elucidação dos produtos de clivagem do HF3 por meio da análise da fração peptídica, utilizamos duas abordagens bioinformáticas com critérios restritivos para identificação de peptídeos ($FDR \leq 1\%$). Além disso, para serem consideradas como substrato do HF3, proteínas cujos peptídeos foram identificados na fração peptídica foram submetidas novamente a critérios restritivos de comparação das amostras tratadas com HF3 e controle: i) os peptídeos verificados nas amostras de controle foram subtraídos daqueles peptídeos verificados também na amostra tratada, pois potencialmente não foram gerados pelo HF3; desta forma, permaneceram na análise apenas peptídeos identificados exclusivamente na amostra tratada; ii) proteínas foram consideradas clivadas pelo HF3 se os seus peptídeos (produtos de hidrólise) estivessem presentes em pelo menos dois dos três experimentos realizados.

Tendo em vista os critérios utilizados acima, verificamos que 71 entradas de proteínas presentes no banco de dados Uniprot (considerando cadeias individuais de proteínas oligoméricas como entradas diferentes) foram identificadas como substrato do HF3, sendo que destas, 62 constituem proteínas únicas. Algumas destas proteínas corroboram dados descritos na literatura e outras são consideradas novos substratos desta metaloproteinase, como será discutido abaixo.

5.2.2.1 Influência do método de preparação do plasma humano para a identificação de substratos do HF3 por análise peptidômica

Em relação aos diferentes métodos de depleção de proteínas abundantes do plasma e enriquecimento de proteínas pouco abundantes, verificamos que a análise da fração peptídica do P(enrq) forneceu um número maior de substratos do HF3 identificados, sendo que 11 substratos, indicados pela abordagem de identificação *Mascot/TPP*, e 19 substratos, indicados pela abordagem de identificação *Peaks*, foram verificados exclusivamente no P(enrq). Ao contrário do esperado, a análise do P(T) incubado com HF3 também forneceu resultados sobre substratos do HF3, e que foram identificados exclusivamente por este método (6 substratos, pela abordagem de identificação *Mascot/TPP*, e 7 substratos pela abordagem de identificação *Peaks*), entretanto, é válido lembrar que a quantidade inicial de proteínas utilizadas na incubação do P(T) com o HF3 foi maior (200 µg) comparado a 50 µg das amostras de P(depA), P(dep20) e P(enrq).

Em relação à reprodutibilidade dos experimentos, é possível verificar que o P(T) apresentou uma menor variação na contagem de espectros entre as amostras do controle e do tratado (Tabelas 2-3, 4-5, 6-7, e 8-9). Este resultado pode ser atribuído ao fato de que houve menor manipulação da amostra de plasma total em relação às outras abordagens que envolveram pelo menos mais um passo de depleção/enriquecimento de proteínas, realizados separadamente (replicatas biológicas), antes da incubação com a proteinase.

5.2.2.2 Abordagens bioinformáticas

De maneira geral, para cada método de preparação do plasma humano, grande parcela das proteínas consideradas como alvo do HF3 foram identificadas por as

ambas as abordagens bioinformáticas utilizadas, reforçando os resultados obtidos de identificação. A abordagem por *Peaks* forneceu um número maior de proteínas identificadas no P(T), P(dep20) e P(enrq), enquanto a abordagem *Mascot/TPP* forneceu um número maior de proteínas identificadas como substrato na abordagem P(depA) (Figuras 11 a 14). Zhang et al. (2012) compararam, para dados provenientes de análise por LC-MS/MS de digestão tripsínica de *Pseudomonas aeruginosa*, o número de espectros associados a peptídeos (PSM, do inglês *Peptide Spectrum Match*) verificados pelos programas *Peaks* 5.3 e *Mascot* v2.3, utilizando especificamente a ferramenta de busca em banco de dados. O estudo mostrou que a ferramenta *Peaks* forneceu 30% mais PSMs quando comparado ao programa *Mascot* v2.3. No presente estudo, foi verificado um número maior de peptídeos identificados e contagem de espectros nas análises da fração peptídica do plasma incubado com o HF3 pelo programa *Peaks Studio* 7. Entretanto, este fato não teve grande influência no número de proteínas verificadas como substrato do HF3, uma vez que do total de 71 proteínas identificadas como substrato do HF3 (71 entradas no banco de dados Unprot), 53 foram identificadas por ambas as abordagens bioinformáticas (Figura 18).

5.2.2.3 Análise da especificidade primária do HF3 na clivagem de proteínas plasmáticas

A utilização dos peptídeos gerados pela clivagem de proteínas plasmáticas pelo HF3 se mostrou uma ótima ferramenta para a verificação de sua especificidade primária, uma vez que um grande número de sítios de clivagem foi analisado. Foi interessante verificar que, apesar de o número de sítios de clivagens identificados pela abordagem *Peaks* ter sido mais alto do que por *Mascot/TPP*, os *heat maps* gerados com dados de ambas as abordagens, para os dados de todas as amostras de plasma,

são semelhantes, e evidenciaram a preferência do HF3 por Leu na posição P1' (Figuras 19 e 20).

A elucidação da especificidade primária de proteinases por meio da utilização de dados resultantes de eventos de clivagem em proteínas nativas, ou intactas, também pode ser feita pelo método de TAILS (*Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates*) (Kleifeld et al., 2010). Nesta técnica, a identificação dos substratos é feita por meio da marcação isotópica, seguida de quantificação relativa de sequências N-terminais naturais e aquelas geradas pela ação da proteinase. A identificação das sequências N-terminais dos produtos gerados pela ação da proteinase fornece não somente informações referentes aos substratos da proteinase, como também seus sítios de clivagem, e conseqüentemente sua especificidade primária. No estudo de Kleifeld et al. (2010), a especificidade primária da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) foi avaliada pelo método de TAILS, onde foi verificada forte preferência por Leu na posição P1' (mais de 45% de ocorrência) e Pro, na posição P3. Pela mesma abordagem, Prudova et al. (2010) verificaram que a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) tem maior preferência por Pro na posição P3, seguida de Leu na posição P1'. A metaloproteinase de matriz 10 (MMP-10) também revelou a sua preferência por Leu na posição P1' e Pro na posição P3 (Schlage et al., 2014). As meprinases α e β , metaproteinases da família das astacinas, demonstraram a preferência por resíduos carregados negativamente (Asp e Glu) na posição P1' (Becker-Pauly et al., 2011). Diferentemente do que foi mostrado nestes estudos, os resultados da análise sobre a especificidade primária do HF3 sobre proteínas plasmáticas não indicaram uma preferência significativa por qualquer aminoácido em posições diferentes de P1', indicando que aminoácidos presentes nas posições adjacentes ao sítio de clivagem não tem um papel relevante na determinação do ponto de hidrólise pelo HF3.

5.3 Substratos do HF3 no plasma humano

5.3.1 Confirmação de substratos já descritos na literatura

Peptídeos do fibrinogênio (cadeias alfa e beta), vitronectina e fibronectina foram considerados clivados pelo HF3 de acordo com a análise da fração peptídica após o tratamento com a proteinase, o que corrobora com estudos anteriores de nosso grupo que mostraram que estas proteínas são hidrolisadas pelo HF3 *in vitro* (Oliveira et al, 2010). Os resultados obtidos no presente estudo também confirmam dados de Paes Leme et al. (2012), que mostraram que a fibronectina e o fibrinogênio foram degradados no plasma de camundongos tratados com o HF3 (Tabelas 2-9). Neste mesmo trabalho, a alfa-1-antitripsina, um inibidor de serinoproteinases, foi encontrada em menor concentração na pele tratada com HF3 quando comparada com a pele controle. No presente estudo, verificamos que o HF3 é capaz de clivar esta proteína *in vitro*, o que corrobora com a sua menor abundância na pele de camundongos tratados com o HF3 (Paes Leme et al, 2012) (Tabelas 2-3, 4-5, e 8-9). A alfa-1-antitripsina tem efeitos anti-apoptóticos e pode atuar como um regulador inflamatório negativo (Ousman et al, 2007), assim, considerando-se que o HF3, e outras metaloproteinases de venenos, apresentam atividade pró-inflamatória, a degradação da alfa-1-antitripsina poderia facilitar o desenvolvimento da inflamação.

Peptídeos derivados da alfa-2-macroglobulina (Tabelas 2-3, e 6-7) e transtirretina (Tabelas 2-3, 4-5, 6-7 e 8-9) foram verificados na fração peptídica do plasma tratado com o HF3, indicando sua proteólise. Estas proteínas também foram encontradas em maior quantidade na pele de camundongos injetados com o HF3, segundo Paes Leme et al. (2012). Desta maneira, uma investigação dos efeitos do HF3 sobre a transtirretina deve ser realizada para verificarmos se haveria alguma

implicação na geração do processo hemorrágico; no entanto, com relação à alfa-2-macroglobulina, um estudo recente de nosso grupo revelou que não somente esta proteína não foi capaz de inibir a atividade proteolítica do HF3 *in vitro*, como também foi parcialmente hidrolisada pelo HF3 (Asega et al., 2014).

O plasminogênio, um componente do sistema fibrinolítico, foi identificado como substrato do HF3, porém apresentou clivagem limitada e foi verificado apenas no P(enrq), com baixa quantidade de peptídeos identificados na fração peptídica após a incubação com o HF3 (Tabela 9). O plasminogênio é uma glicoproteína de cadeia única que circula no plasma na forma de zimogênio e, quando ativado pela uroquinase (u-PA) ou pelo ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) pela clivagem da ligação Arg580-Val581 (Figura 26), é convertido em plasmina e assim é capaz de clivar a fibrina (Robbins et al., 1967). A angiostatina é um fator anti-angiogênico que foi identificado como o fator primário que controla o estado dormente das células de um tumor metastático secundário, inibindo a angiogênese e resultando na diminuição do fluxo sanguíneo e redução no tamanho do tumor (O'Reilly et al., 1994). A angiostatina é um fragmento interno do plasminogênio, de 38 kDa, e moléculas tipo-angiostatina podem ser geradas por diversas formas, incluindo o processamento do plasminogênio por diversas metaloproteinases de matriz (Cornelius et al., 1998). Ho et al. (2002) verificaram que o HF3 e outras metaloproteinases de *Bothrops*, quando incubado com o plasminogênio, é capaz de gerar um produto de massa molecular 38 kDa, e cujo sequenciamento N-terminal evidenciou a clivagem na ligação Ser460-Val461, indicando a geração de uma proteína semelhante à angiostatina. Os peptídeos verificados na fração peptídica do plasma tratado com o HF3 (Figura 26) indicaram clivagens no plasminogênio próximas às regiões de início e término da angiostatina (Tabela A8, em Anexos). Além disso, a incubação do HF3 com o

plasminogênio isolado de fato gerou um produto de massa molecular próxima de 38 kDa (Figura 21). Estes dados corroboram com o estudo de Ho et al. (2002), ainda que os sítios de clivagem identificados não sejam exatamente os mesmos, porém a atividade do HF3 sobre o plasminogênio parece gerar uma proteína semelhante à angiostatina. Ainda que não tenha sido relatado nenhum efeito da angiostatina sobre a hemostasia, o fato de que o plasminogênio seja hidrolisado pelo HF3 teria como consequência a diminuição da concentração desta proteína no plasma, e como consequência sua atividade no sistema fibrinolítico estaria comprometida.

10	20	30	40	50	60
MEHKEVVL	LLFLKSGQGE	PLDDYVNTQG	ASLFSVTKKQ	LGAGSIEECA	AKCEEDEEFT
70	80	90	100	110	120
CRAFQYHSKE	QQCVIMAENR	KSSIIIRMRD	VVLFEKKVYL	SECKTGNGKN	YRGTMSTKN
130	140	150	160	170	180
GITCQKWSST	SPHRPRFSPA	THPSEGLEEN	YCRNPNDPQ	GPWCYTTPDE	KRYDYCDILE
190	200	210	220	230	240
CEEECMHCSG	ENYDGKISKT	MSGLECAWD	SQSPHAHGYI	PSKFPNKNLK	KNYCRNPDR
250	260	270	280	290	300
LRPWCFTTDP	NKRWELCDIP	RCTTPPPSSG	PTYQCLKGTG	ENYRGNVAVT	VSGHTCQHWS
310	320	330	340	350	360
AQTPHHTNRT	PENFPCKNLD	ENYCRNPDPGK	RAPWCHTTNS	QVRWEYCKIP	SCDSSPVSTE
370	380	390	400	410	420
QLAPTAPPEL	TPVVQDCYHG	DGQSYRGTS	TTTTGKKCQS	WSSMTPHRHQ	KTPENYPNAG
430	440	450	460	470	480
LTMNYCRNPD	ADKGPWCFTT	DPSVRWEYCN	LKKCSGTEAS	VVAPPPVLL	PDVETPSEED
490	500	510	520	530	540
CMFGNGKGYR	GKRATTVTGT	PCQDWAAQEP	HRHSIFTPET	NPRAGLEKNY	CRNPDGDVGG
550	560	570	580	590	600
PWCYTTPNPK	LYDYCDVPQC	AAPSFDCGKP	QVEPKKCPGR	VVGGCVAHPH	SWPWQVSLRT
610	620	630	640	650	660
RFGMHFCGGT	LISPEWVLTA	AHCLKSPRP	SSYKVILGAH	QEVNLEPHVQ	EIEVSRLFLE
670	680	690	700	710	720
PTRKDIALLK	LSSPAVITDK	VIPACLPSPN	YVVADRTECF	ITGWGETQGT	FGAGLLKEAQ
730	740	750	760	770	780
LPVIENKVCN	RYEFLNGRVQ	STELCAGHLA	GGTDCQGD	GGPLVCFEKD	KYILQGVTSW
790	800	810			
GLGCARPKNK	GVYVRVSREFV	TWIEGVMRNN			

Figura 26. Sequência de aminoácidos do plasminogênio indicando as regiões em que foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3 (sublinhadas em vermelho). A região destacada em cinza indica o peptídeo sinal. A região em azul indica a angiostatina. Sequência obtida no banco de dados Uniprot (PLMN_HUMAN).

5.3.2 Novos substratos

Proteínas envolvidas direta ou indiretamente na cascata de coagulação:

Ainda que as cadeias alfa e beta fibrinogênio já tenham sido descritas como substratos do HF3 (Oliveira et al., 2010; Paes Leme et al., 2012), neste estudo a cadeia gama do fibrinogênio foi também detectada como um alvo desta metaloproteinase. Peptídeos oriundos da cadeia gama do fibrinogênio foram identificados como produto da atividade do HF3 no P(dep20) e P(enrq) (Tabelas 6-7, 8-9). Além disso, a incubação do HF3 com o fibrinogênio isolado, seguida de análise da fração peptídica resultante por LC-MS/MS confirmou a presença destes peptídeos (Figura 22; Tabela A9, em Anexos). Estas análises revelaram a liberação de peptídeos da porção C-terminal da cadeia gama do fibrinogênio pelo HF3. Além do importante papel desta região na estabilização da fibrina por ligação cruzada (Chen e Doolittle, 1970), estudos mostraram que a porção C-terminal da cadeia gama do fibrinogênio está envolvida em sua interação com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ presente em plaquetas (Kloczewiak et al., 1984, 1989a, 1989b; Springer et al., 2008). Farrell et al. (1992) também verificaram que o fibrinogênio recombinante, que continha uma interrupção na região C-terminal da cadeia gama, perdeu grande parte de sua habilidade de mediar a agregação plaquetária. Além disso, o peptídeo C-terminal da cadeia gama do fibrinogênio (H-H-L-G-G-A-K-Q-A-G-D-V) demonstrou capacidade de inibir a agregação plaquetária e a ligação de fibrinogênio às plaquetas de coelhos, por sua interação direta com a GPIIb-IIIa (Rand et al., 1999). Desta maneira, é possível que a clivagem da cadeia gama do fibrinogênio pelo HF3, liberando o peptídeo C-terminal, tenha algum efeito na agregação plaquetária, entretanto estudos adicionais são necessários para confirmar este fato, uma vez que um número pequeno de peptídeos

oriundos desta região foi detectado na fração peptídica do plasma ou fibrinogênio isolado, tratados com o HF3.

No estudo de Paes Leme et al. (2012), a protrombina (fator de coagulação II), foi encontrada em maior abundância no plasma de camundongos tratados com o HF3, em relação ao plasma dos camundongos tratados com solução controle. Esta análise foi realizada pela digestão em solução das proteínas do plasma e análise de LC-MS/MS, onde foi avaliada a contagem de espectros. No presente estudo, a protrombina foi verificada como produto de clivagem do HF3 pela análise das frações proteica e peptídica do plasma (Tabelas 1, 4-5, 6-7, 8-9). A clivagem da protrombina foi confirmada pela incubação da proteína isolada com o HF3, seguida de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (Figura 21). A presença de muitos peptídeos oriundos da protrombina na fração peptídica do plasma tratado com o HF3 indica que esta proteína é degradada, e não ativada pela proteinase (Figura 27), e como consequência, a protrombina ficaria indisponível para participar do processo de coagulação sanguínea, onde é ativada pelo fator Xa e convertida em trombina, sendo este um fator que contribuiria com a manutenção do processo hemorrágico. O aumento da protrombina no plasma de camundongos injetados com o HF3, verificado no estudo de Paes Leme et al. (2012), pode ser explicado como uma tentativa do organismo (camundongo) de compensar não somente o processo hemorrágico, como a clivagem da própria proteína pelo HF3, fornecendo mais proteína à cascata de coagulação.

10	20	30	40	50	60
MAHVRGLQLP	GCLALAAALCS	LVHSQHVF	LA PQQARSLLQR	VRRANTFLEE	VRKGNLEREC
70	80	90	100	110	120
VEETCSYEAA	FEALESSTAT	DVEWAKYTAC	ETARTPRDKL	AACLEGNCAE	GLGTNYRGHV
130	140	150	160	170	180
NITRSGIECQ	LWRSRYPHKP	EINSTTHPGA	DLQENFCRNP	DSSTTGPPWCY	TTDPTVRRQE
190	200	210	220	230	240
CSIPVCGQDQ	VTVAMTPRSE	GSSVNLSPPL	EQCVPDRGQQ	YQGR LAVTTH	GLPCLAWASA
250	260	270	280	290	300
OAKALSKHOD	FNSAVOLVEN	FCRNPDGDEE	GVWCYVAGKP	GDFGYCDLNY	CEEAVEEETG
310	320	330	340	350	360
DGLDEDSDDA	IEGR TATSEY	OTFFNPR	TFG SGEADCGLRP	LFEKKSLEDK	TERELLESYI
370	380	390	400	410	420
DGRIVEGSDA	EIGMSPWQVM	LFRKSPQELI	CGASLISDRW	VLTA AHCLLY	PPWDKNFTEN
430	440	450	460	470	480
DLLVRIGKHS	RTRYERNIEK	ISMLEKIYIH	PRYNWRENLD	RDIALMKLKK	PVAFSDYIHP
490	500	510	520	530	540
VCLPDRETAA	SLLQAGYKGR	VTGWGNLKET	WTANVGKGQP	SVLOVVNLPI	VERPVCKDST
550	560	570	580	590	600
RIRITDNMFC	AGYKPDEGKR	GDACEGDSGG	PFV MKSPFNN	RWYOMGIVSW	GEGCDRDGKY
610	620				
GFYTHVERLK	KWIOKVIDQF	GE			

Figura 27. Sequência de aminoácidos da protrombina indicando as regiões em que foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3 (sublinhadas em vermelho). A região destacada em cinza indica o peptídeo sinal. A região em verde indica o pró-peptídeo. As regiões em azul e laranja indicam os fragmentos 1 e 2 do peptídeo de ativação, respectivamente. Sequência obtida no banco de dados Uniprot (THRB_HUMAN).

A alfa-2-antiplasmina é uma glicoproteína da classe das serpinas, que possui cadeia única e cuja função é proteger os coágulos de fibrina da clivagem mediada pela plasmina (Moroi e Aoki, 1976). O mecanismo de inibição da plasmina ocorre, primeiramente, pela ligação de um resíduo de Gln41 de sua porção N-terminal ao resíduo Lys342 da cadeia alfa da fibrina, mediada pelo fator XIIIa (ativo). Em seguida, o domínio C-terminal da alfa-2-antiplasmina interage com a plasmina, de forma que a Arg403 de seu sítio inibidor alinha-se e forma uma ligação covalente com o resíduo de Ser presente no sítio ativo da plasmina, formando um complexo enzima-inibidor inativo (Lee et al., 2001). A jararhagina, uma metaloproteinase da classe P-IIIb do

veneno da *B. jararaca*, foi demonstrada como capaz de, *in vitro*, reduzir a atividade inibitória da alfa-2-antiplasmina sobre a plasmina, ao mesmo tempo em que foi capaz de degradar esta serpina (Sugiki et al., 1995). A alfa-2-antiplasmina pode ser encontrada no plasma tanto em sua forma madura (452 resíduos de aminoácidos), quanto em sua forma contendo o pró-peptídeo (464 resíduos de aminoácidos) (Koyama et al., 1994). A pró-alfa-2-antiplasmina tem atividade inibitória sobre a plasmina, entretanto a sua habilidade em estabelecer a ligação cruzada com a fibrina é reduzida a aproximadamente um terço em comparação à proteína madura (Sumi et al., 1989). Analisando os peptídeos oriundos das regiões degradadas pelo HF3 na alfa-2-antiplasmina (Figura 28; Tabelas 2-3, 4-5, 6-7, 8-9), pela análise da fração peptídica do plasma após a incubação com a proteinase, verificamos primeiramente que o HF3 cliva não somente a proteína madura, mas também a proteína contendo o seu pró-peptídeo. Entretanto, nenhum peptídeo correspondente à sequência exata do pró-domínio foi identificado (M-E-P-L-G-R-Q-L-T-S-G-P), indicando que o HF3 não teria a função de ativação da proteína. Além disso, verificamos que o HF3 é capaz de clivar peptídeos da porção N-terminal contendo o resíduo Gln41, responsável pela ligação cruzada à fibrina; a região C-terminal também foi degradada pela proteinase, porém a região contendo o resíduo Arg403 não sofreu hidrólise. Tendo em vista este cenário, podemos sugerir que o HF3 impediria a ligação da alfa-2-antiplasmina à fibrina, entretanto, a influência do HF3 sobre a sua atividade inibitória necessita de maior investigação.

10	20	30	40	50	60
MALLWGLLVL	SWSCLOGPCS	VFSPVSAMEP	LGRQLTSGPN	OEQVSPLTLL	KLGNQEPGGQ
70	80	90	100	110	120
TALKSPPGVC	SRDPTPEQTH	RLARAMMAFT	ADLFSILVAQT	STCPNLILSP	LSVALALSHL
130	140	150	160	170	180
ALGAQNHTLQ	RLQQVLHAGS	GPCLPHELLSR	LCQDLGPGAF	RLAARMYLQK	GFPIKEDFLE
190	200	210	220	230	240
QSEQLFGAKP	VSLTGKQEDD	LANINQWVKE	ATEGKIQEFL	SGLPEDTVLL	LLNAIHFGGF
250	260	270	280	290	300
WRNKFDPSLT	QRDSFHLDEQ	FTVPVEMMQA	RTYPLRWFL	EQPEIQVAHF	PFKNMMSFVV
310	320	330	340	350	360
LVPPTHFEWNV	SQVLANLSWD	TLHPPLVWER	PTKVRLPKLY	LKHQMDLVAT	LSQLGLQELF
370	380	390	400	410	420
QAPDLRGISE	QSLVVSQVQH	QSTLELSEVG	VEAAAATSIA	MSRMSLSSFS	VNRPFLEFFIF
430	440	450	460	470	480
EDTTGLPLFV	GSVRNPNPISA	PRELKEQQDS	PGNKDFLOSL	KGFPGRGDKLF	GPDLKLVPPE
490					
EEDYPQFGSP	K				

Figura 28. Sequência de aminoácidos do alfa-2-antiplasmina indicando as regiões em que foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3 (sublinhadas em vermelho). A região destacada em cinza indica o peptídeo sinal. A região em verde indica o pró-peptídeo. Sequência obtida no banco de dados Uniprot (A2AP_HUMAN).

Neste estudo, além da protrombina, os fatores da coagulação V e XIII foram, pela primeira vez, identificados como substratos do HF3. Conforme ilustrado nas Figuras 29 e 30, analisando os peptídeos oriundos das regiões degradadas pelo HF3 nos fatores V e XIII (cadeia A), é possível afirmar que a atividade do HF3 sobre estas proteínas é limitada. Por essa razão, provavelmente, os peptídeos correspondentes a estas proteínas foram identificados somente na fração peptídica do P(depA), no caso do fator V (Tabela 3), e do P(dep20), no caso do fator XIII (cadeia A) (Tabelas 6-7). Outra hipótese seria que o HF3 teria clivado estas proteínas gerando peptídeos maiores e não ionizáveis pelos métodos de LC-MS/MS utilizados, e que portanto não foram detectados. O fator V da cascata de coagulação, é ativado pela trombina pela clivagem das ligações Arg737-Ser738, Arg1046-Thr1047, e Arg1573-Ser1574 (Suzuki et al., 1982; Nesheim et al., 1984), e com menor intensidade pelo fator Xa (Thorelli et al., 1997). O fator V quando ativado (FVa), é um dos componentes do complexo protrombinase, e junto com o fator X ativado (FXa) é capaz de ativar a protrombina

(Rosing et al., 1980). Estudos mostraram que a serinoproteinase RVV-V, isolada do veneno de *Vipera russeli*, é capaz de ativar o fator V (Tokunaga et al., 1988), assim como a trombocitina, isolada do veneno de *B. atrox* (Niewiarowski et al., 1977). Entretanto, nenhuma metaloproteinase de veneno foi reportada como sendo capaz de clivar ou ativar o fator V. O fator XIII quando ativado (FXIIIa) é responsável pela estabilização da fibrina pela introdução de ligações covalentes cruzadas (Pisano et al., 1968). Conforme mencionado anteriormente, o FXIIIa também é responsável por conectar a alfa-2-antiplasmina e a fibrina por ligações cruzadas. A ativação do FXIII é catalisada pela trombina que cliva as ligações Arg38-Gly39 de sua cadeia A do tetrâmero A₂B₂ e, por meio da dissociação de suas cadeias na presença de Ca²⁺, o resíduo de cisteína do sítio catalítico é exposto (Komáromi et al., 2011). A serinoproteinase RVV-V também é capaz de ativar o fator XIIIa (Tokunaga et al., 1988). Pela identificação dos peptídeos presentes na fração peptídica do plasma tratado com o HF3, verificamos a presença do peptídeo T-V-E-L-Q-G-V-V-P-R-G, localizado na região que contém o sítio de clivagem pela trombina (Figura 30). Entretanto outros peptídeos da cadeia A do FXIII foram identificados, não sendo possível afirmar se o efeito do HF3 sobre esta proteína é de degradação ou ativação. Da mesma forma que o fator V, não é encontrado na literatura qualquer relato sobre uma metaloproteinase de veneno de serpente capaz de clivar ou ativar o fator XIII, e assim, outras investigações acerca do efeito do HF3 sobre estas proteínas da cascata da coagulação são necessárias. Contudo, é possível sugerir que a hidrólise destas proteínas contribuiria para o processo hemorrágico do HF3, já que as mesmas têm papel importante na cascata de coagulação sanguínea.

10	20	30	40	50	60
<u>MFPGCPRLWV</u>	<u>LIVVLGTSWVG</u>	<u>WGSQGTAAQ</u>	<u>LRQFYVAAQG</u>	<u>ISWSYRPEPT</u>	<u>NSSLNLSVTS</u>
70	80	90	100	110	120
<u>FKKIVYREYE</u>	<u>PYFKKEKPQS</u>	<u>TISGLLGPTL</u>	<u>YAEVGDIIKV</u>	<u>HFKNKADKPL</u>	<u>SIHPQGIRYS</u>
130	140	150	160	170	180
<u>KLSEGASYLD</u>	<u>HTFPAEKMD</u>	<u>AVAPGREYTY</u>	<u>EWSISEDSP</u>	<u>THDDPPCLTH</u>	<u>IYYSHENLIE</u>
190	200	210	220	230	240
<u>DFNSGLIGPL</u>	<u>LICKKGTLTE</u>	<u>GGTQKTFDKQ</u>	<u>IVLLFAVFDE</u>	<u>SKSWSQSSSL</u>	<u>MYTVNGYVNG</u>
250	260	270	280	290	300
<u>TMPDITVCAH</u>	<u>DHISWHLLGM</u>	<u>SSGPELFSIH</u>	<u>FNGQVLEQNH</u>	<u>HKVSAITLVS</u>	<u>ATSTTANMTV</u>
310	320	330	340	350	360
<u>GPEGKWIIS</u>	<u>LTPKHLQAGM</u>	<u>QAYIDIKNCP</u>	<u>KKTRNLKKIT</u>	<u>REQRRHMKRW</u>	<u>EYFIAAEEVI</u>
370	380	390	400	410	420
<u>WDYAPVIPAN</u>	<u>MDKKYRSQHL</u>	<u>DNFSNQIGKH</u>	<u>YKKVMYTQYE</u>	<u>DESFTKHTVN</u>	<u>PNMKEDGILG</u>
430	440	450	460	470	480
<u>PIIRAQVRDT</u>	<u>LKIVFKNMAS</u>	<u>RPYSIYPHGV</u>	<u>TFSPYEDEVN</u>	<u>SSFTSGRNNT</u>	<u>MIRAVQPGET</u>
490	500	510	520	530	540
<u>YTYKWNILEF</u>	<u>DEPTENDAQC</u>	<u>LTRPYSDVD</u>	<u>IMRDIASGLI</u>	<u>GLLLICKSRS</u>	<u>LDRRGIQRAA</u>
550	560	570	580	590	600
<u>DIEQQAVFAV</u>	<u>FDENKSWYLE</u>	<u>DNINKFCENP</u>	<u>DEVKRDDPKF</u>	<u>YESNIMSTIN</u>	<u>GYVPESITTL</u>
610	620	630	640	650	660
<u>GFCFDDTVQW</u>	<u>HFCSVGTQNE</u>	<u>ILTIHFTGHS</u>	<u>FIYGKRHEDT</u>	<u>LTLFPMRGES</u>	<u>VTVTMDNVGT</u>
670	680	690	700	710	720
<u>WMLTSMNSSP</u>	<u>RSKKLRLKFR</u>	<u>DVKCIPDDDE</u>	<u>DSYEIFEPPE</u>	<u>STVMATRKMH</u>	<u>DRLEPEDEES</u>
730	740	750	760	770	780
<u>DADYDYQNRL</u>	<u>AAALGIRSFR</u>	<u>NSSLNQEEEE</u>	<u>FNLTALEN</u>	<u>GTEFVSSNTD</u>	<u>IIVGSNYSSP</u>
790	800	810	820	830	840
<u>SNISKFTVMN</u>	<u>LAEPQKAPSH</u>	<u>QQATTAGSPL</u>	<u>RHLIGKNSVL</u>	<u>NSSTAHESSP</u>	<u>YSEDPIEDPL</u>
850	860	870	880	890	900
<u>QPDVTGIRLL</u>	<u>SLGAGEFKSQ</u>	<u>EHAKHKGPKV</u>	<u>ERDQAAKHRF</u>	<u>SWMKLLAHKV</u>	<u>GRHLSQDTGS</u>
910	920	930	940	950	960
<u>PSGMRPWEDL</u>	<u>PSQDTGSPSR</u>	<u>MRPWKDPPSD</u>	<u>LLLLKQSNSS</u>	<u>KILVGRWHLA</u>	<u>SEKGSYEIIQ</u>
970	980	990	1000	1010	1020
<u>DTDEDTAVNN</u>	<u>WLISPQNASR</u>	<u>AWGESTPLAN</u>	<u>KPGKQSGHPK</u>	<u>FPRVRHKSLO</u>	<u>VRQDGGKSRL</u>
1030	1040	1050	1060	1070	1080
<u>KKSQFLIKTR</u>	<u>KKKKEKHTHH</u>	<u>APLSPRTFHP</u>	<u>LRSEAYNTFS</u>	<u>ERRLKHSVL</u>	<u>HKSNETSLPT</u>
1090	1100	1110	1120	1130	1140
<u>DLNQTLPSMD</u>	<u>FGWIASLPDH</u>	<u>NQNSSNDTGQ</u>	<u>ASCPGGLYQT</u>	<u>VPPEEHYQTF</u>	<u>PIQDPDQMS</u>
1150	1160	1170	1180	1190	1200
<u>TSDPSHRSSS</u>	<u>PELSEMLEYD</u>	<u>RSHKSFPDTI</u>	<u>SQMSPSSEHE</u>	<u>VWQTVISPD</u>	<u>SQVTLSPELS</u>
1210	1220	1230	1240	1250	1260
<u>QTNLSPDLSH</u>	<u>TTLSPELIQR</u>	<u>NLSPALGOMP</u>	<u>ISPDLSHTTL</u>	<u>SPDLSHTTSL</u>	<u>LDLSQTNLSP</u>
1270	1280	1290	1300	1310	1320
<u>ELSQTNLSPA</u>	<u>LGQMPLSPDL</u>	<u>SHTTSLSDFS</u>	<u>QTNLSPELSH</u>	<u>MTLSPELSQT</u>	<u>NLSPALGOMP</u>
1330	1340	1350	1360	1370	1380
<u>ISPDLSHTTL</u>	<u>SLDFSQTNLS</u>	<u>PELSQTNLSP</u>	<u>ALGQMPLSPD</u>	<u>PSHTTSLSDL</u>	<u>SQTNLSPELS</u>
1390	1400	1410	1420	1430	1440
<u>QTNLSPDLSE</u>	<u>MPLFADLSQI</u>	<u>PLTPDLQMT</u>	<u>LSPDLGETDL</u>	<u>SPNFGQMSLS</u>	<u>PDLSQVTLSP</u>
1450	1460	1470	1480	1490	1500
<u>DISDTTLLPD</u>	<u>LSQISPPPD</u>	<u>DQIFYPSESS</u>	<u>QSLLLQEFNE</u>	<u>SFPYPDLGQM</u>	<u>PSPSSPTLND</u>
1510	1520	1530	1540	1550	1560
<u>TFLSKEFNPL</u>	<u>VIVGLSKDGT</u>	<u>DYIEIIPKEE</u>	<u>VQSSEDDYAE</u>	<u>IDYVPYDDPY</u>	<u>KTDVRTNINS</u>
1570	1580	1590	1600	1610	1620
<u>SRDPDNIAAW</u>	<u>YLRSNNGNRR</u>	<u>NYIIAAEEIS</u>	<u>WDYSEFVQRE</u>	<u>TDIEDSDDIP</u>	<u>EDTTYKKVVF</u>
1630	1640	1650	1660	1670	1680
<u>RKYLDSTFTK</u>	<u>RDPRGEYEEH</u>	<u>LGILGPIIRA</u>	<u>EVDDVIQVRF</u>	<u>KNLASRPYSL</u>	<u>HAHGLSYEKS</u>
1690	1700	1710	1720	1730	1740
<u>SEGKTYEDDS</u>	<u>PEWFKEDNAV</u>	<u>QPNSSYTYVW</u>	<u>HATERSGPES</u>	<u>PGSACRAWAY</u>	<u>YSAVNPEKDI</u>
1750	1760	1770	1780	1790	1800
<u>HSGLIGPLLI</u>	<u>CQKGILHKDS</u>	<u>NMPMDMREFV</u>	<u>LLFMTFDEKK</u>	<u>SWYYEKKSR</u>	<u>SWRLTSSEMK</u>
1810	1820	1830	1840	1850	1860

KSHEFHAING	MIYSLPGLKM	YEQEWVRLHL	LNIGGSQDIH	VVHFHGQTLL	ENGKNQHQLG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
VWPLLPGSFK	TLEMKASKPG	WWLLNTEVGE	NQRAGMQTPF	LIMDRDCRMP	MGLSTGIISD
1930	1940	1950	1960	1970	1980
SQIKASEFLG	YWEPRLARLN	NGGSYNAWSV	EKLAAEFASK	PWIQVDMQKE	VIITGIQTQG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
AKHYLKSCYT	TEFYVAYSSN	QINWQIFKGN	STRNVMYFNG	NSDASTIKEN	QFDPPIVARY
2050	2060	2070	2080	2090	2100
IRISPTRAYN	RPTLRLELQG	CEVNGCSTPL	GMENGKIENK	QITASSFKKS	WWGDYWEPFR
2110	2120	2130	2140	2150	2160
ARLNAQGRVN	AWQAKANNK	QWLEIDLLKI	KKITAIITQG	CKSLSSEMYV	KSYTIHYSEQ
2170	2180	2190	2200	2210	2220
GVEWKPYRLK	SSMVDKIFEG	NTNTKGHVKN	FFNPPIISRF	IRVIPKTNWQ	SIALRLELFG

CDIY

Figura 29. Sequência de aminoácidos do fator V da cascata de coagulação indicando as regiões em que foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3 (sublinhadas em vermelho). A região destacada em cinza indica o peptídeo sinal. A região em verde indica o peptídeo de ativação que conecta a cadeia pesada (resíduos 29-737) à cadeia leve (resíduos 1574-2224). Sequência obtida no banco de dados Uniprot (FA5_HUMAN).

10	20	30	40	50	60
MSETSR TAFG	GRR AVPPNNS	NAAEDDL PTV	ELQGVV PRGV	NLQEFNLVTS	VHLFKERWDT
70	80	90	100	110	120
NKVDHHTDKY	ENNKLIVRRG	QSFYVQIDFS	RPYDPRRDLF	RVEYVIGRYP	QENKGTIYPV
130	140	150	160	170	180
PIVSELQSGK	WGAKIVMRED	RSVRLSIQSS	PKCIVGKFRM	YVAVWTPYGV	LRTSRNPETD
190	200	210	220	230	240
TYILENPWCE	DDAVYLDNEK	EREEYVLNDI	GVIFYGEVND	IKTRSWSYGQ	FEDGILDTCL
250	260	270	280	290	300
YVMDRAQMDL	SGRGNPIKVS	RVGSAMVNAK	DDEGVLVGSW	DNIYAYGVPP	SAWTGSVDIL
310	320	330	340	350	360
LEYRSENPNV	RYGQCWVFAG	VFNTFLRLCLG	IPARIVTNYF	SAHDNDANLQ	MDIFLEEDGN
370	380	390	400	410	420
VNSKLTKDSV	WNYHCWNEAW	MTRPDLPGVF	GGWQAVDSTP	QENS DGM YRC	GPASVQAIKH
430	440	450	460	470	480
GHVCFQFDAP	FVFAEVNSDL	IYITAKKDGT	HVVENV DATH	IGKLIVTKQI	GGDGMM DITD
490	500	510	520	530	540
TYKFQEGQEE	ERLA LETALM	YGAKK PLNTE	GVMK SRSNVD	MDFE VENAVL	GKDF KL SITF
550	560	570	580	590	600
RNNSHNRYTI	TAYLSANITF	YTGVPKAEFK	KETFDVTLEP	LSFKKEAVLI	QAGEYMGQLL
610	620	630	640	650	660
EQASLHFFVT	ARINETRDVL	AKQKSTVLT I	PEII IKVRGT	QVVGSDMTVT	VQFTNPLKET
670	680	690	700	710	720
LRNVVWHLDG	PGVTRPMKKM	FREIRPNSTV	QWEEVCRPWV	SGHRKLIASM	SSDSL RHVYG
730					
ELDVQIQRRP	SM				

Figura 30. Sequência de aminoácidos do fator XIII (cadeia A) da cascata de coagulação indicando as regiões em que foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3 (sublinhadas em vermelho). A região destacada em cinza indica uma metionina de iniciação (removida). A região em verde indica o peptídeo de ativação. Sequência obtida no banco de dados Uniprot (F13A_HUMAN).

O cininogênio foi identificado como substrato do HF3 em todas as amostras de plasma utilizadas, e por ambos os métodos de análise bioinformática para identificação de proteínas (Tabelas 2-3, 4-5, 6-7, 8-9). Peptídeos derivados tanto do cininogênio de alto peso molecular quanto do cininogênio de baixo peso molecular foram identificados, conforme mostrado na Figura 31, e indicam a sua proteólise extensiva. O cininogênio de alto peso molecular participa da cascata da coagulação e do sistema calicreína-cinina, enquanto o cininogênio de baixo peso molecular participa apenas do último. Estas proteínas são idênticas ao longo de suas cadeias pesadas, na região que contém a bradicinina, e nos doze aminoácidos da porção N-terminal de suas cadeias leves (Kitamura et al., 1985). As suas cadeias pesadas lhes conferem a função de inibidores de cisteínoproteinases (Salvesen et al., 1986). Ambos liberam a bradicinina, ou a lisil-bradicinina, quando clivados por calicreínas; além de sua função vasodilatadora, a bradicinina (R-P-P-G-F-S-P-F-R) é um peptídeo mediador de inflamação (Kaplan e Silverberg, 1987). A atividade coagulante do cininogênio de alto peso molecular reside na sua cadeia leve (Thompson et al., 1978), região pela qual ele se liga à pré-calicreína e ao fator XI. Além disso, a mesma cadeia leve contém uma região rica em histidina, responsável pela sua ligação a superfícies carregadas negativamente (Kato et al., 1979). Analisando as regiões hidrolisadas pelo HF3 no cininogênio de alto peso molecular e baixo peso molecular (Figura 31), verificamos que a cadeia pesada é clivada, o que comprometeria a função de inibidor de cisteínoproteinase dos cininogênios de baixo e alto peso molecular. Além disso, a cadeia leve do cininogênio de alto peso molecular também é clivada pelo HF3, fato que comprometeria a cascata de coagulação; por fim, verificamos que a região que contém o peptídeo correspondente à bradicinina é clivada pelo HF3, porém nenhum peptídeo corresponde à sequência exata da bradicinina é gerado, portanto,

10	20	30	40	50	60
MKLITILFLC	SRLLLSLTQE	SQSEEIDCND	KDLFKAVDAA	LKKYNSONOS	NNOFVLYRIT
70	80	90	100	110	120
EATKTVGSDT	FYSFKYEIKE	GDCPVQSGKT	WQDCEYKDA	KAATGECTAT	VGKRSSTKFS
130	140	150	160	170	180
VATQTCQITP	AEGPVVTAQY	DCLGCVHPIS	TQSPDLEPIL	RHGIQYFNNN	TQHSSLFMLN
190	200	210	220	230	240
EVKRAQROVV	AGLNFRITYS	IVQTNCSEKN	FLFLTPDCKS	LWNGDTGECT	DNAYIDIQLR
250	260	270	280	290	300
IASFSQNCDI	YPGKDFVQPP	TKICVGCPRD	IPTNSPELEE	TLTHTITKLN	AENNATFYFK
310	320	330	340	350	360
IDNVKKARVQ	VVAGKKYFID	FVARETTCSK	ESNEELTESC	ETKKLGQSLD	CNAEVYVVPW
370	380	390	400	410	420
EKKIYPTVNC	QPLGMISLMK	RPPGFSPFRS	SRIGEIKEET	TVSPPHSTMA	PAQDEERDSG
430	440	450	460	470	480
KEQGHTRRHD	WGHEKQRKHN	LGHGKHHERD	QGHGHORGHG	LGHGHEOQHG	LGHGHKFKLD
490	500	510	520	530	540
DDLEHQGGHV	LDHGHKHKHG	HGHGKHKNKG	KKNGKHNKGK	TEHLASSSED	STTPSAQTQE
550	560	570	580	590	600
KTEGPTPIPS	LAKPGVTVTF	SDFQSDSLIA	TMPPIISPAP	IQSDDDWIPD	IQIDPNGLSF
610	620	630	640		
NPISDFPDTT	SPKCPGRPWK	SVSEINPTTO	MKESYYFDLT	DGLS	

10	20	30	40	50	60
MKLITILFLC	SRLLLSLTQE	SQSEEIDCND	KDLFKAVDAA	LKKYNSONQS	NNQFVLYRIT
70	80	90	100	110	120
EATKTVGSDT	FYSFKYEIKE	GDCPVQSGKT	WQDCEYKDA	KAATGECTAT	VGKRSSTKFS
130	140	150	160	170	180
VATQTCQITP	AEGPVVTAQY	DCLGCVHPIS	TQSPDLEPIL	RHGIQYFNNN	TQHSSLFMLN
190	200	210	220	230	240
EVKRAQROV	AGLNFIRITYS	IVQTNCSEKN	FLFLTPDCKS	LWNGDTGECT	DNAYIDIQLR
250	260	270	280	290	300
IASFSQNCDI	YPGKDFVOPP	TKICVGCPRD	IPTNSPELEE	TLTHTITKLN	AENNATFYFK
310	320	330	340	350	360
IDNVKKARVQ	VVAGKKYFID	FVARETTCSK	ESNEELTESC	ETKKLGQSLD	CNAEVYVVPW
370	380	390	400	410	420
EKKIYPTVNC	QPLGMISLMK	RPPGFSPFRS	SRIGEIKEET	TSHLRSCYEK	GRPPKAGAEF
ASEREVS					

Figura 31. Sequências de aminoácidos do cininogênio de alto peso molecular (A) e cininogênio de baixa massa molecular (B), indicando as regiões em que foram verificados peptídeos gerados pela ação proteolítica do HF3 (sublinhadas em vermelho). A região destacada em cinza indica o peptídeo sinal. A região em azul indica a cadeia pesada. A sequência em laranja indica o peptídeo bradiginina. A região em verde indica a cadeia leve. Sequências obtidas no banco de dados Uniprot (KNG1_HUMAN).

Um número muito pequeno de peptídeos das proteínas C e S dependentes de vitamina K (Tabelas 8-9) também foi verificado na fração peptídica do plasma tratado com HF3, indicando sua possível proteólise. A proteína C, em associação à proteína S (cofator), regula negativamente a cascata de coagulação por degradar os fatores Va e VIIIa, por proteólise limitada, fato que interrompe a produção de trombina pelas vias intrínseca e extrínseca (Walker e Fay, 1992). Por atuarem na cascata de coagulação, os efeitos do HF3 sobre estas proteínas devem ser mais bem investigados.

A ceruloplasmina foi identificada como substrato do HF3, porém um baixo número de peptídeos foi detectado como produto de hidrólise, e somente na fração peptídica do P(depA) após o tratamento com o HF3 (Tabelas 4-5). Esta proteína tem alto grau de homologia com a cadeia A do fator V da cascata de coagulação (Zaitsev et al., 1999), que também foi identificado como substrato do HF3, conforme descrito acima. A ceruloplasmina é uma proteína plasmática que carrega mais de 95% do cobre presente no plasma, e sua função está relacionada à regulação da homeostasia do cobre e ferro, além de seu papel na angiogênese, e atividade antioxidante (Ehrenwald e Fox, 1994). A ceruloplasmina também é uma proteína de fase aguda e seu nível plasmático aumenta em resposta à inflamação (Owen, 1982). Walker e Fay (1990) verificaram a sua capacidade de se ligar à proteína C, protegendo os fatores Va e VIII da inativação catalisada pela proteína C ativada. Dessa forma, a sua hidrólise pelo HF3 poderia estar implicada no processo hemorrágico.

Proteínas envolvidas no sistema complemento:

O sistema do complemento, que é parte do sistema imune inato, é composto por mais de 20 proteínas plasmáticas distintas que reagem entre si para opsonizar

patógenos, e induz uma série de respostas inflamatórias que contribuem para combater a infecção (Carroll, 2004). Algumas proteínas do complemento são proteinases que são ativadas por clivagem proteolítica em cascata, de forma semelhante ao que ocorre na cascata de coagulação sanguínea (Arlaud et al., 1998). A ativação do sistema complemento por componentes de venenos de serpentes e seu papel no quadro do envenenamento é um fenômeno pouco estudado, no entanto alguns venenos das famílias Elapidae e Viperidae foram demonstrados como capazes de afetar o sistema complemento, e a primeira demonstração sobre a interação de componentes de venenos com proteínas do sistema complemento foi realizada com um veneno do gênero *Naja*, que contém o CVF (*Cobra Venom Factor*) (revisado por Tambourgi e van den Berg, 2014). Entre outros potenciais novos alvos do HF3, neste estudo foram identificados alguns componentes da cascata do complemento: C1r, C1s, C3, C4 e C9, proteína ligadora de C4b (cadeia alfa), fator H do complemento, e proteína 1 relacionada ao fator H do complemento (Tabelas 2-9). A clivagem dos componentes C3 e C4 foi confirmada pela incubação com essas proteínas isoladas (Figura 21). Estas proteínas foram clivadas pelo HF3, de forma que não estariam disponíveis no plasma (total ou parcialmente) para participar do processo de ativação da cascata do complemento, e consequentemente, sob este aspecto, o HF3 teria um papel de modulador desta cascata de proteinases.

Proteínas envolvidas na inflamação:

Peptídeos oriundos da clusterina (apoliproteína J) foram identificados na fração peptídica do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq), após a incubação com o HF3, indicando uma extensiva degradação desta proteína. A clusterina é uma proteína chaperona com ação anti-inflamatória e citoprotetora, que é inibidora de MMP-9,

MMP-2, MMP-3, e MMP-7 (Jeong et al., 2012), portanto a sua proteólise pelo HF3 poderia inviabilizar sua ação anti-inflamatória, contudo, é possível sugerir que, ao contrário do que ocorre com as MMPs, a clusterina não seria uma proteína inibidora de HF3.

Os resultados do presente estudo também nos indicaram potenciais novos alvos do HF3, como, por exemplo, a alfa-2-HS-glicoproteína, ou fetuína-A, que apresentou considerável proteólise no plasma tratado com o HF3 (Tabelas 2-3, 4-5, 6-7 e 8-9). Esta proteína funciona como um importante componente de diversos mecanismos fisiológicos ou patológicos, incluindo a calcificação vascular, metabolismo ósseo, resistência à insulina, migração de queratinócitos e sinalização proliferativa de células tumorais de câncer de mama (Mori et al., 2011). Em resposta à inflamação aguda, a alfa-2-HS-glicoproteína parece agir como um modulador anti-inflamatório; os macrófagos ativados produzem citocinas pró-inflamatórias críticas para combater infecções e cicatrização de injúrias traumáticas, porém mecanismos contra regulatórios são necessários para suprimir a ativação dos macrófagos. Foi atribuída à alfa-2-HS-glicoproteína a função de suprimir a liberação excessiva de TNF (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*) de macrófagos (Wang et al., 1997; Ombrellino et al., 2001; Mori et al., 2011). As meprinas α e β são metaloproteinases dependentes de zinco que têm um importante papel na inflamação, pela ativação de citocinas; recentemente, o potencial papel de inibidor endógeno de meprina também foi atribuído à alfa-2-HS-glicoproteína, entretanto, estudos bioquímicos adicionais são necessários para se caracterizar a alfa-2-HS-glicoproteína como um inibidor de metaloproteinase (Hedrich et al., 2010; Mori et al., 2011). Guerranti et al. (2010) verificaram a proteólise da alfa-2-HS-glicoproteína após a incubação do plasma humano com o veneno de *Echis carinatus*, entretanto o componente do veneno responsável pela sua

degradação não foi investigado. Desta maneira, não há relatos na literatura de que a alfa-2-HS-glicoproteína seja clivada por outras metaloproteinases, e a sua clivagem pelo HF3 teria potencialmente efeito pró-inflamatório.

No estudo de Paes Leme et al. (2012), foi verificado que a apolipoproteína A-II, o segundo maior componente do HDL, foi claramente degradada na pele hemorrágica. No presente estudo foi verificado que não somente a apolipoproteína A-II, como também outras proteínas desta classe (apolipoproteína A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III, E, F e L1) foram detectadas como substrato do HF3 (Tabelas 2-9). As apolipoproteínas são proteínas que se ligam a lipídeos, transportando-os pelo sistema linfático e circulatório. Membros da classe A, C e E têm um papel importante no metabolismo de lipoproteínas (Li et al., 1988). Estudos anteriores mostraram que as apolipoproteínas A-I e E são clivadas pela metaloproteinase de matriz 14 (MMP-14) (Hwang et al, 2004) e as apolipoproteínas C-II e A-IV são clivadas pelas metaloproteinases de matriz 7 e 14 (Kim et al., 2006; Park et al., 2012), e que este fato pode estar envolvido com a arteriosclerose. A clivagem das apolipoproteínas A-I e A-II por metaloproteinases do veneno de *Cerastes cerastes* foi observada por El-Asmar e Swaney (1988), e a clivagem da apolipoproteína A-I pelo veneno de *Echis carinatus* também foi verificada por Guerranti et al. (2010). Contudo, o papel da proteólise destas apolipoproteínas no contexto do envenenamento ainda não está bem estabelecido, e uma hipótese que pode ser sugerida é a de que os produtos de degradação destas proteínas poderiam exercer algum papel na atividade pró-inflamatória de metaloproteinases de venenos.

Outros substratos:

A gelsolina foi identificada como substrato do HF3, tendo sido extensivamente clivada (Tabelas 2-3, 6-7, 8-9). Em um outro estudo de nosso grupo, sobre o degradoma do HF3 em proteínas secretadas por fibroblastos, também foi verificada a clivagem da gelsolina pelo HF3 pela abordagem TAILS (*Terminal amine isotopic labeling of substrates*), e a incubação do HF3 com esta proteína isolada na razão enzima:substrato 1:20 mostrou sua clivagem gerando fragmentos de massa molecular de 40-60 kDa (resultados não mostrados; manuscrito em preparação). A gelsolina plasmática é uma proteína que, juntamente com a proteína ligadora de vitamina D, faz parte do sistema depurador de actina. Enquanto a proteína ligadora de vitamina D sequestra a actina em sua forma monomérica, a gelsolina tem como função a fragmentação de filamentos de actina, que é liberada de células apoptóticas ou que sofreram danos (Kwiatkowski et al., 1985; Bryan, 1988; Haddad et al., 1990). Quando a actina é liberada destas células, sua polimerização é favorecida termodinamicamente no espaço extracelular, formando microfilamentos. O aumento da viscosidade do plasma interfere na microcirculação, entretanto, este efeito é minimizado pelo sistema depurador de actina (Bucki et al., 2008). A liberação excessiva de actina intracelular ou a diminuição da atividade do sistema depurador estão associados a condições patológicas como obstrução de pequenos vasos sanguíneos, coágulos, dano endotelial, necrose hepática e choque séptico (Lee and Galbraith., 1992). Estudos que utilizaram métodos degradômicos mostraram que a gelsolina é um substrato de metaloproteinases de matriz, sendo que a MMP-3 é capaz de clivá-la de forma mais eficiente, seguido pela MMP-2, MMP-1, MMP-14 (Park et al., 2006). Desta maneira, assim como no caso das MMPs, a clivagem da gelsolina pelo

HF3 poderia afetar o sistema depurador de actina e causar condições patológicas induzidas pelo excesso de actina extracelular não removida.

Muitos peptídeos das cadeias pesadas H1, H2, H3 e H4 do inibidor inter-alfa da tripsina foram identificados na fração peptídica do plasma após a incubação com o HF3 (Tabelas 2-9), indicando clivagem extensiva desta proteína. Proteínas da família do inibidor inter-alfa de tripsina são compostas por uma cadeia leve comum, um típico proteoglicano conhecido como bicunina, e muitas cadeias pesadas (Zhuo et al., 2004). A bicunina apresenta atividade inibitória sobre um amplo espectro de proteinases, incluindo algumas de importância patológica, como tripsina, quimiotripsina, plasmina, elastase e catepsina. Contudo, a atividade ou a influência das cadeias pesadas na atividade inibitória destas proteínas ainda são pouco conhecidas (Zhuo e Kimata, 2008). A importância das cadeias pesadas do inibidor inter-alfa de tripsina está relacionada à sua ligação ao hialuram (Sandson et al., 1965; Zhuo et al., 2004), uma macromolécula de estrutura simples composta de unidades de dissacarídeos repetidas, e que é um importante componente de suporte nas matrizes extracelulares de vertebrados (Laurent, 1987). A ligação das cadeias pesadas do inibidor inter-alfa de tripsina ao hialuram pode estar envolvida na estabilização e integridade da matriz extracelular (Bost et al., 1998; Zhuo e Kimata, 2008). Catanese e Kress (1985) verificaram que metaloproteinases de venenos de serpentes viperídeas, colubrídeas e elapídeas foram capazes de clivar o inibidor inter-alfa de tripsina *in vitro* gerando produtos ainda capazes de inibir a tripsina porém sem efeito sobre metaloproteinases e serinoproteinases de venenos. A degradação das cadeias pesadas desta proteína pelo HF3 poderia ter algum efeito na estabilidade da matriz extracelular, porém outros estudos são necessários para esclarecer esta hipótese.

A glicoproteína rica em histidina foi identificada como tendo sido clivada pelo HF3 (Tabelas 2-3, 6-7, 9), entretanto, esta clivagem é bem específica e os peptídeos gerados pela sua clivagem, e detectados pelos métodos utilizados neste estudo, encontram-se na sequência H-S-H-G-P-P-L-P-Q-G-P-P-P-L-L-P-M (Tabelas A1, A3, A5, A7 e A8, em Anexos) de sua região rica em prolina (Jones et al., 2005). A glicoproteína rica em histidina pode ser encontrada no plasma, leucócitos, α grânulos de plaquetas e megacariócitos. Muitas moléculas interagem com esta glicoproteína incluindo o grupo heme, plasminogênio, heparanase, fibrinogênio, trombospondina, vasculostatina, imunoglobulina G (IgG), componentes do complemento, heparina e íons Zn^{2+} . A glicoproteína rica em histina também pode interagir com moléculas associadas a células, incluindo receptores Fc γ , heparam sulfato, fosfolípidos, etc (Poon et al., 2011). No contexto deste estudo, o aspecto mais interessante da glicoproteína rica em histidina reside na sua capacidade de modular componentes da cascata de coagulação. Ela pode se ligar à heparina (um potente anticoagulante) liberada por mastócitos, impedindo que esta iniba a atividade pró-coagulante de monócitos no local da inflamação e trombose (Leung et al., 1979; Jones et al., 2005). Alguns estudos demonstraram o seu efeito pró-fibrinolítico, pela sua capacidade de ligar-se ao plasminogênio, estimulando sua clivagem pela plasmina mediada pelo t-PA (Borza et al., 1997). Por outro lado, outros estudos investigaram a sua ação como agente antifibrinolítico, pois a ligação glicoproteína rica em histidina ao plasminogênio poderia interferir na interação do plasminogênio com os coágulos de fibrina, inibindo desta maneira a fibrinólise mediada por plasmina (Lijnen et al., 1980; Jones et al., 2005). Desta maneira, assim com a própria função da glicoproteína rica em histidina, o papel da clivagem desta proteína pelo HF3 no contexto do fenômeno hemorrágico não está esclarecido.

Algumas proteínas foram consideradas como potenciais novos alvos do HF3, porém um número baixo de peptídeos foi encontrado como produtos de hidrólise, e, na maioria das vezes, em somente um tipo de preparação de plasma: carboxipeptidase B2, collectina-11, ficolina-2, proteína ligadora de galectina-3, glutathione peroxidase 3, histona H2B tipo F-S, proteína ligadora de hialuronam, isoforma 3 da proteína associada ao MAX gene, fator derivado do epitélio pigmentado, *pregnancy zone protein*, proteínas ácidas ricas em prolina, proteína amilóide A-4 sérica, imunoglobulinas, tetranectina, e paraoxonase/ arilesterase sérica. Estas proteínas não apresentam um papel definido em processos hemorrágicos, e, dessa forma, as implicações da hidrólise destas proteínas pelo HF3 necessitam de outras investigações.

5.4 Avaliação da especificidade primária do HF3 em uma biblioteca de peptídeos tripsínicos derivada do plasma humano

Analizando a ocorrência relativa dos aminoácidos nas posições P6-P6' nos peptídeos tripsínicos derivados do plasma humano, observamos uma preferência por resíduos de Leu na posição P1', o que confirma diversos relatos sobre a atividade enzimática de SVMPs, principalmente sobre a cadeia B da insulina (Mandelbaum et al., 1976, Bjarnason e Fox, 1994). Ainda que Leu tenha sido encontrada com relativa frequência na posição P2', Val também está presente nesta posição com frequência similar e dessa forma, aminoácidos que ocupam esta posição parecem não constituir um fator determinante para a preferência de clivagem do peptídeo (Figura 23A). Estes resultados também corroboram os dados de Paes Leme et al. (2011) que mostraram que a bothropasina (uma metaloproteinase da classe P-III) não apresentou

preferência de resíduos de aminoácidos expressiva nas posições P3-P4', com exceção da posição P1', em que a preferência pelos resíduos de Leu foi evidente.

Apesar de a análise da especificidade primária utilizando a biblioteca de peptídeos ter gerado um número mais baixo de pontos de clivagem (71) comparando-se com os peptídeos gerados pela atividade do HF3 sobre as proteínas plasmáticas (227 a 912, na análise *Mascot/TPP*; 436 a 1256, na análise *Peaks*; Figuras 19 e 20), esta também mostrou que Leu é o resíduo preferido na posição P1'.

O fato das SVMs da classe P-III não apresentarem preferência expressiva ao longo da sequência de aminoácidos P6-P6' pode estar relacionado com a promoção da hemorragia in vivo. No processo de degradação da matriz extracelular promovido por estas proteinases, os domínios tipo disintegrina e rico em cisteínas poderiam mediar a interação das metaloproteinase aos seus substratos, e uma vez ligadas a estes, a baixa preferência por resíduos específicos poderia permitir que um grande número de ligações peptídicas fossem suscetíveis à clivagem, causando a desestabilização da matriz extracelular e tendo como consequência a desestabilização dos capilares.

5.5 Análise da atividade proteolítica do HF3 sobre as proteínas do plasma da *B. jararaca*

Pela análise do perfil eletroforético do plasma de *B. jararaca* tratado com o HF3, quando comparado com o controle, pode-se observar que não houve alteração da intensidade das bandas de proteínas (Figura 25). Uma hipótese é de que realmente não há proteólise devido à presença de inibidores de metaloproteinases no plasma da *B. jararaca*. Valente et. al. (2001) conduziram um estudo para caracterização estrutural e funcional da BJ46a, uma proteína com atividade inibitória de

metaloproteinases, de 46 kDa, isolada do soro da *B. jararaca*, e que foi eficaz em inibir a atividade hemorrágica do veneno de *B. jararaca* por injeção intradérmica em ratos.

O fato de ter sido detectado um número maior de peptídeos no sobrenadante do plasma da *B. jararaca* tratado com o HF3, quando comparado ao controle (Tabela A11, em Anexos), pode sugerir uma segunda hipótese, ou seja, de que ocorreu proteólise, ainda que muito limitada, mas as proteínas que foram substrato do HF3 não foram identificadas pela ferramenta de busca utilizada, por ausência de um banco de dados abrangente de proteínas da serpente *B. jararaca*.

6. CONCLUSÕES

1. Os métodos de depleção do plasma humano utilizados neste estudo geraram amostras heterogêneas com relação ao intervalo de concentração dinâmica de proteínas, que foram compatíveis com a análise proteômica/peptidômica, e que geraram resultados complementares entre si na elucidação do degradoma de substratos do HF3.
2. As duas abordagens bioinformáticas utilizadas para a análise da fração peptídica conferiram robustez ao conjunto de resultados obtidos, visto que a maioria das proteínas identificadas como substratos do HF3 foram verificadas por ambas as abordagens.
3. Os resultados da determinação da especificidade primária do HF3 sobre dois conjuntos de substratos, ou seja, sobre a biblioteca de peptídeos do plasma humano e sobre as proteínas plasmáticas, mostraram que o HF3 prefere Leu na posição P1', fato que reforça a importância deste resíduo nesta posição da sequência a ser clivada, independentemente da estrutura do substrato.
4. Como resultado deste estudo, o conhecimento sobre o repertório de substratos do HF3 no plasma humano foi expandido com relação ao número (Figura 32) e também quanto às classes e funções das proteínas. Em conjunto, os resultados ilustram a assinatura proteolítica do plasma humano no contexto da hemorragia induzida pelo HF3.

Figura 32. Substratos do HF3 identificados no plasma humano.

5. Novos substratos do HF3 foram identificados neste estudo, entre os quais se encontram proteínas envolvidas na cascata de coagulação, sistema complemento, resposta inflamatória, além de inibidores de proteinases. Foi interessante notar que a hidrólise de algumas proteínas pelo HF3 parece levar a resultados antagônicos, como por exemplo, a hidrólise de fibrinogênio e do plasminogênio, que têm participações em diferentes etapas da coagulação sanguínea e fibrinólise. De forma geral, a caracterização do degradoma de substratos do HF3 no plasma humano sugere que esta metaloproteinase age de maneira desregulada, não sendo inibida pelos inibidores plasmáticos, e causando o desequilíbrio na hemostasia. Por outro lado, o plasma da *B. jararaca* parece menos susceptível à atividade proteolítica do HF3.

6. Apesar de clivar um grande número de proteínas plasmáticas, a atividade do HF3 parece não ser inespecífica, já que não foi observada a degradação ampla de proteínas plasmáticas.

7. Levando-se em conta que as abordagens proteômicas utilizadas neste trabalho constituem métodos artificiais para a prospecção de substratos do HF3 no plasma humano, já que as incubações com três das amostras de plasma foram realizadas com as proteínas em concentrações diferentes daquelas naturais no plasma humano, as proteínas aqui apontadas como substratos, à exceção daquelas que já haviam sido demonstradas em outros estudos, ou que foram validadas aqui pela incubação isolada com a metaloproteinase, são consideradas como candidatas, e a atividade do HF3 sobre elas deve ser futuramente analisada por outras abordagens, no contexto de sua participação nos efeitos hemorrágico e pró-inflamatório do HF3.

8. A hidrólise de proteínas do plasma humano pelo HF3, que aparentemente não está sujeito à atividade dos inibidores de proteinases conhecidos, pode ter um papel relevante no fenômeno hemorrágico. Ainda, pode-se vislumbrar que alguns produtos

de hidrólise, que devem ser ainda mais bem estudados, poderiam desempenhar algum papel de sinergia nos processos pró-inflamatório e hemorrágico gerados pelo HF3.

7. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, N.L.; ANDERSON, N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.1, n.11, p.845-867, 2002.
- ARLAUD, G.J.; VOLANAKIS, J.E.; THIELENS, N.M.; NARAYANA, S.V.; ROSSI, V.; XU, Y. The atypical serine proteases of the complement system. **Advances in Immunology**, v.69, p.249-307, 1998.
- ASEGA, A.F.; OLIVEIRA, A.K.; MENEZES, M.C.; NEVES-FERREIRA, A.G.; SERRANO, S.M. Interaction of *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases with protein inhibitors. **Toxicon**, v.80, p.1-8, 2014.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v.24, n.9, p.943-946, 1986.
- BECKER-PAULY, C.; BARRÉ, O.; SCHILLING, O.; AUF DEM KELLER, U.; OHLER, A.; BRODER, C.; SCHÜTTE, A.; KAPPELHOFF, R.; STÖCKER, W.; OVERALL, C.M. Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.10, n.9, art.M111.009233, p.1-19, 2011.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v.62, n.3, p.325-372, 1994.
- BLACK, R.A.; WHITE, J.M. ADAMs: focus on the protease domain. **Current Opinion in Cell Biology**, v.10, n.5, p.654-659, 1998.
- BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F.X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Letters**, v.331, n.1/2, p.134-140, 1993.
- BORZA, D.B.; MORGAN, W.T. Acceleration of plasminogen activation by tissue plasminogen activator on surface-bound histidine-proline-rich glycoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.9, p.5718-5726, 1997.
- BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.G. The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species. **Journal of Proteomics**, v.71, n.3, p.255-264, 2008.
- BOST, F.; DIARRA-MEHRPOUR, M.; MARTIN, JP. Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family--a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. **European Journal of Biochemistry**, v.252, n.3, p.339-346, 1998.

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.7, n.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 120p.

BRYAN, J. Gelsolin has three actin-binding sites. **Journal of Cell Biology**, v.106, n.5, p.1553-1562, 1988.

BUCKI, R.; LEVENTAL, I.; KULAKOWSKA, A.; JANMEY, P.A. Plasma gelsolin: function, prognostic value, and potential therapeutic use. **Current Protein and Peptide Science**, v.9, n.6, p.541-551, 2008.

CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, n.8, p.1063-1074, 2005.

CATANESE, J.J.; KRESS, L.F. Enzymatic digestion of human plasma inter-alpha-trypsin inhibitor by snake venom metalloproteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v.80, n.3, p.507-512, 1985.

CATANESE, J.J.; KRESS, L.F. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1B-glycoprotein. **Biochemistry**, v.31, n.2, p.410-418, 1992.

CARROLL, M.C. The complement system in regulation of adaptive immunity. **Nature Immunology**, v.5, n.10, p.981-986, 2004.

CHEN, R.; DOOLITTLE, R.F. Isolation, characterization, and location of a donor-acceptor unit from cross-linked fibrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.66, n.2, p.472-479, 1970.

CIDADE, D.A.; SIMÃO, T.A.; DÁVILA, A.M.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P.L.; BOM, C.; ZINGALI, R.B.; ALBANO, R.M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v.48, n.4, p.437-461, 2006.

CORNELIUS, L.A.; NEHRING, L.C.; HARDING, E.; BOLANOWSKI, M.; WELGUS, H.G.; KOBAYASHI, D.K.; PIERCE, R.A.; SHAPIRO, S.D. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. **Journal of Immunology**, v.161, n.12, p.6845-6852, 1998.

CRAIG R., BEAVIS R.C; TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. **Bioinformatics**, v 20, n. 9, p. 466-467, 2004.

DEUTSCH, E.W.; MENDOZA, L.; SHTEYNBERG, D.; FARRAH, T.; LAM, H.; TASMAN, N.; SUN, Z.; NILSSON, E.; PRATT, B.; PRAZEN, B.; ENG, J.K.; MARTIN, D.B.; NESVIZHSHKII, A.I.; AEBERSOLD, R. A guided tour of the trans-proteomic pipeline. **Proteomics**, v.10, n.6, p.1150-1159. 2010.

DOUCET, A.; OVERALL, C.M. Protease proteomics: revealing protease *in vivo* functions using systems biology approaches. **Molecular Aspects of Medicine**, v.29, n.5, p.339-358, 2008.

EHRENWALD, E.; FOX, P.L. Isolation of nonlabile human ceruloplasmin by chromatographic removal of a plasma metalloproteinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.309, n.2, p.392-395, 1994.

EL-ASMAR, M.F.; SWANEY, J.B. Proteolysis *in vitro* of low and high density lipoproteins in human plasma by *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. **Toxicon**, v.26, n.9, p.809-816, 1988.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; PINTO, A.F.; TERRA, R.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; FOX, J.W. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. **Journal of Proteome Research**, v.8, n.11, p.5120-5131, 2009.

FARRELL, D.H.; THIAGARAJAN, P.; CHUNG, D.W.; DAVIE, E.W. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.22, p.10729-10732, 1992.

FERREIRA, S.H. A Bradykinin-Potentiating Factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v.24, n.1, p.163-169, 1965.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, n.8, p.969-985, 2005.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v.8, n.4, p.909-920, 2008a.

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

GARTON, K.J.; GOUGH, P.J.; RAINES, E.W. Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. **Journal of Leukocyte Biology**, v.79, n.6, p.1105-1116, 2006.

GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L.F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Letters**, v.335, n.1, p.76-80, 1993.

GONG, Y.; LI, X.; YANG, B.; YING, W.; LI, D.; ZHANG, Y.; DAI, S.; CAI, Y.; WANG, J.; HE, F.; QIAN, X. Different immunoaffinity fractionation strategies to characterize the human plasma proteome. **Journal of Proteome Research**, v.5, n.6, p.1379-1387, 2006.

GOVORUKHINA, N.I.; KEIZER-GUNNINK, A.; VAN DER ZEE, A.G.; DE JONG, S.; DE BRUIJN, H.W.; BISCHOFF, R. Sample preparation of human serum for the analysis of tumor markers: comparison of different approaches for albumin and gamma-globulin depletion. **Journal of Chromatography A**, v.1009, n.1/2, p.171–178, 2003.

GUERRANTI, R.; CORTELAZZO, A.; HOPE-ONYEKWERE, N.S.; FURLANI, E.; CERUTTI, H.; PUGLIA, M.; BINI, L.; LEONCINI, R. *In vitro* effects of *Echis carinatus* venom on the human plasma proteome. **Proteomics**, v.10, n.20, p.3712–3722, 2010.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v.45, n.8, p.997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M.; WARRELL, D.A.; WILLIAMS, D.J.; JENSEN, S.; BROWN, N.; CALVETE, J.J.; HARRISON, R.A. Global snakebite initiative: the need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.6, p.e2162, 2013.

HADDAD, J.G.; HARPER, K.D.; GUOTH, M.; PIETRA, G.G.; SANGER, J.W. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.4, p.1381-1385, 1990.

HAKIMI, A.; AULUCK, J.; JONES, G.D.; NG, L.L.; JONES, D.J. Assessment of reproducibility in depletion and enrichment workflows for plasma proteomics using label-free quantitative data-independent LC-MS. **Proteomics**, v.14, n.1, p.4-13, 2014.

HANNA, S.L.; SHERMAN, N.E.; KINTER, M.T.; GOLDBERG, J.B. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microbiology**, v.146, pt.10, p.2495-2508, 2000.

HEDRICH, J.; LOTTAZ, D.; MEYER, K.; YIALLOUROS, I.; JAHNEN-DECHENT, W.; STÖCKER, W.; BECKER-PAULY, C. Fetuin-A and cystatin C are endogenous inhibitors of human meprin metalloproteases. **Biochemistry**, v.49, n.39, p.8599-8607, 2010.

HITE, L.A.; FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v.373, n.7, p.381-385, 1992.

HO, P.L.; SERRANO, S.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; MOURA DA SILVA, A.M.; MENTELE, R.; CALDAS, C.; OLIVA, M.L.; BATISTA, I.F.; OLIVEIRA, M.L. Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.294, n.4, p.879-885, 2002.

HOLGATE, S.T.; YANG, Y.; HAITCHI, H.M.; POWELL, R.M.; HOLLOWAY, J.W.; YOSHISUE, H.; PANG, Y.Y.; CAKEBREAD, J.; DAVIES, D.E. The genetics of asthma:

ADAM33 as an example of a susceptibility gene. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.3, n.5, p.440–443, 2006.

HWANG, I.K.; PARK, S.M.; KIM, S.Y.; LEE, S.T. A proteomic approach to identify substrates of matrix metalloproteinase-14 in human plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1702, n.1, p.79-87, 2004.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: BORN, G.V.R.; FARAH, A.; HERKEN, H.; WELCH, A.D.; LEE, C.Y. eds. **Handbook of experimental pharmacology: snake venoms**. Berlin: Heidelberg: New York: Springer-Verlag, 1979. v.52, p.61–158.

JEONG, S.; LEDEE, D.R.; GORDON, G.M.; ITAKURA, T.; PATEL, N.; MARTIN, A.; FINI, M.E. Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation. **American Journal of Pathology**, v.180, n.5, p.2028-2039, 2012.

JIA, L.G.; WANG, X.M.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atroplysins A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.20, p.13094-13102, 1997.

JIA, L.G.; WANG, X.M.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atroplysins A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.373, n.1, p.281-286, 2000.

KAMIGUTI, A.S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R.D.; ZUZE, L.M.; FOX, J.W. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Letters**, v.549, n.1/3, p.129-134, 2003.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; SILVA, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v.5, n.11, art.e218, p.1591-1604, 2008.

KELLER, A.; SHTEYNBERG, D. Software pipeline and data analysis for MS/MS proteomics: the trans-proteomic pipeline. **Methods in Molecular Biology**, v.694, p.169–189, 2011.

KESSNER, D.; CHAMBERS, M.; BURKE, R.; AGUS, D.; MALLICK, P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v.24, n.21, p.2534-2536, 2008.

KIM, M.S.; PINTO, S.M.; GETNET, D.; NIRUJOGI, R.S.; MANDA, S.S.; CHAERKADY, R.; MADUGUNDU, A.K.; KELKAR, D.S.; ISSERLIN, R.; JAIN, S.; THOMAS, J.K.; MUTHUSAMY, B.; LEAL-ROJAS, P.; KUMAR, P.; SAHASRABUDDHE, N.A.; BALAKRISHNAN, L.; ADVANI, J.; GEORGE, B.; RENUSE, S.; SELVAN, L.D.; PATIL, A.H.; NANJAPPA, V.; RADHAKRISHNAN, A.; PRASAD, S.; SUBBANNAYYA, T.;

RAJU, R.; KUMAR, M.; SREENIVASAMURTHY, S.K.; MARIMUTHU, A.; SATHE, G.J.; CHAVAN, S.; DATTA, K.K.; SUBBANNAYYA, Y.; SAHU, A.; YELAMANCHI, S.D.; JAYARAM, S.; RAJAGOPALAN, P.; SHARMA, J.; MURTHY, K.R.; SYED, N.; GOEL, R.; KHAN, A.A.; AHMAD, S.; DEY, G.; MUDGAL, K.; CHATTERJEE, A.; HUANG, T.C.; ZHONG, J.; WU, X.; SHAW, P.G.; FREED, D.; ZAHARI, M.S.; MUKHERJEE, K.K.; SHANKAR, S.; MAHADEVAN, A.; LAM, H.; MITCHELL, C.J.; SHANKAR, S.K.; SATISHCHANDRA, P.; SCHROEDER, J.T.; SIRDESHMUKH, R.; MAITRA, A.; LEACH, S.D.; DRAKE, C.G.; HALUSHKA, M.K.; PRASAD, T.S.; HRUBAN, R.H.; KERR, C.L.; BADER, G.D.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.A.; GOWDA, H.; PANDEY, A. A draft map of the human proteome. **Nature**, v.509, n.7502, p.575-581, 2014.

KIM, S.Y.; PARK, S.M.; LEE, S.T. Apolipoprotein C-II is a novel substrate for matrix metalloproteinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.339, n.1, p.47-54, 2006.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v.30, n.3, p.265-293, 1992.

KINI, R.M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v.397, n.3, p.377-387, 2006.

KITAMURA, N.; KITAGAWA, H.; FUKUSHIMA, D.; TAKAGAKI, Y.; MIYATA, T.; NAKANISHI, S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, n.14, p.8610-8617, 1985.

KLOCZEWIAK, M.; TIMMONS, S.; LUKAS, T.J.; HAWIGER, J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen: synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. **Biochemistry**, v.23, n.8, p.1767-1774, 1984.

KAPLAN, A.P.; SILVERBERG, M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. **Blood**, v.70, n.1, p.1-15, 1987.

KATO, H.; SUGO, T.; IKARI, N.; HASHIMOTO, N.; MARUYAMA, I.; HAN, Y.N.; IWANAGA, S.; FUJII, S. Role of bovine high-molecular-weight (HMW) kininogen in contact-mediated activation of bovine Factor XII. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.120B, p.19-37, 1979.

KLEIFELD, O.; DOUCET, A.; AUF DEM KELLER, U.; PRUDOVA, A.; SCHILLING, O.; KAINTHAN, R.K.; STARR, A.E.; FOSTER, L.J.; KIZHAKKEDATHU, J.N.; OVERALL, C.M. Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. **Nature Biotechnology**, v.28, n.3, p.281-288, 2010.

KLOCZEWIAK, M.; TIMMONS, S.; BEDNAREK, M.A.; SAKON, M.; HAWIGER, J. Platelet receptor recognition domain on the gamma chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogues. **Biochemistry**, v.28, n.7, p.2915-2919, 1989a.

KLOCZEWIAK, M.; TIMMONS, S.; BEDNAREK, M.A.; SAKON, M.; HAWIGER, J. Platelet receptor recognition domain on the γ chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogs [Erratum to document cited in CA110(17):151810E]. **Biochemistry**, v.28, n.19, p.7974, 1989b.

KOMÁROMI, I.; BAGOLY, Z.; MUSZBEK, L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.9, n.1, p.9-20, 2011.

KOYAMA, T.; KOIKE, Y.; TOYOTA, S.; MIYAGI, F.; SUZUKI, N.; AOKI, N. Different NH2-terminal form with 12 additional residues of alpha 2-plasmin inhibitor from human plasma and culture media of Hep G2 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.200, n.1, p.417-422, 1994.

KWIATKOWSKI, D.J.; JANMEY, P.A.; MOLE, J.E.; YIN, H.L. Isolation and properties of two actin-binding domains in gelsolin. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, n.28, p.15232-15238, 1985.

JONES, A.L.; HULETT, M.D.; PARISH, C.R. Histidine-rich glycoprotein: a novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. **Immunology & Cell Biology**, v.83, n.2, p.106-118, 2005.

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

LAURENT, T.C. Biochemistry of hyaluronan. **Acta Oto-Laryngologica, Supplementum**, v.442, p.7-24, 1987.

LEE, K.N.; LEE, C.S.; TAE, W.C.; JACKSON, K.W.; CHRISTIANSEN, V.J.; MCKEE, P.A. Crosslinking of alpha 2-antiplasmin to fibrin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.936, p.335-339, 2001.

LEE, W.M.; GALBRAITH, R.M. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. **New England Journal of Medicine**, v.326, n.20, p.1335-1341, 1992.

LEUNG, L.; SAIGO, K.; GRANT, D. Heparin binds to human monocytes and modulates their procoagulant activities and secretory phenotypes: effects of histidine-rich glycoprotein. **Blood**, v.73, n.1, p.177-184, 1989.

LI, W.H.; TANIMURA, M.; LUO, C.C.; DATTA, S.; CHAN, L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. **Journal of Lipid Research**, v.29, n.3, p.245-271, 1988.

LIJNEN, H.R.; HOYLAERTS, M.; COLLEN, D. Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen: role in the regulation of fibrinolysis and identification as histidine-rich glycoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, n.21, p.10214-10222, 1980.

LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C.M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.3, n.7, p.509-519, 2002.

MA, B.; ZHANG, K.; HENDRIE, C.; LIANG, C.; LI, M.; DOHERTY-KIRBY, A.; LAJOIE, G. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by MS/MS. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.17, n.20, p.2337-2342, 2003.

MANDELBAUM, F.R.; SERRANO, S.M.; SAKURADA, J.K.; RANGEL, H.A.; ASSAKURA, M.T. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the Crotalinae and Viperinae subfamilies. **Toxicon**, v.27, n.2, p.169-177, 1989.

MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HT2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAI, Y.; MURATA, R.; FUNATSU, M.; TAMIYA, N., eds. **Animal plant and microbial toxins**. New York: London: Plenum Press, 1976. v.1, 11-121, 1976. [Proceedings of the 4th International Symposium on Animal, Plant, and Microbial Toxins, organized by the International Society on Toxicology, held in Tokyo, Japan, September 8-13, 1974].

MANN, M.; KELLEHER, N.L. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.47, p.18132-18138, 2008.

MCQUIBBAN, G.A.; GONG, J.H.; TAM, E.M.; MCCULLOCH, C.A.; CLARK-LEWIS, I.; OVERALL, C.M. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. **Science**, v.289, n.5482, p.1202-1206, 2000.

MENEZES, M.C.; PAES LEME, A.F.; MELO, R.L.; SILVA, C.A.; DELLA-CASA, M.; BRUNI, F.M.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CAMARGO, A.C.; FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Activation of leukocyte rolling by the cysteine-rich domain and the hyper-variable region of HF3, a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. **FEBS Letters**, v.582, n.28, p.3915-3921, 2008.

MENEZES, M.C.; OLIVEIRA, A.K.; MELO, R.L.; LOPES-FERREIRA, M.; RIOLI, V.; BALAN, A.; PAES-LEME, A.F.; SERRANO, S.M.T. Disintegrin-like/cysteine-rich domains of the reprotin HF3: site-directed mutagenesis reveals essential role of specific residues. **Biochimie**, v.93, n.2, p.345-351, 2011.

MEROPS. **MEROPS**: the peptidase database. Disponível em: <http://merops.sanger.ac.uk/>. Acesso em: 14 abr. 2014.

MILLIONI, R.; TOLIN, S.; PURICELLI, L.; SBRIGNADELLO, S.; FADINI, G.P.; TESSARI, P.; ARRIGONI, G. High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. **PLoS One**, v.6, n.5, art.e19603, p. p.1-7, 2011.

MOCHIZUKI, S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer Science**, v.98, n.5, p.621-628, 2007.

MORI, K.; EMOTO, M.; INABA, M. Fetuin-A: a multifunctional protein. **Recent Patents on Endocrine Metabolic & Immune Drug Discovery**, v.5, n.2, p.124-146, 2011.

MOROI, M.; AOKI, N. Isolation and characterization of alpha2-plasmin inhibitor from human plasma. a novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. **Journal of Biological Chemistry**, v.251, n.19, p.5956-5965, 1976.

MORTZ, E.; KROGH, T.N.; VORUM, H.; GÖRG, A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. **Proteomics**, v.1, n.11, p.1359-1363, 2001.

MOURA-DA-SILVA, AM.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, n.28, p.2893-2905, 2007.

MURPHY, G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v.8, n.12, p.929-941, 2008.

NAGASE, H.; WOESSNER Jr., J.F. Matrix metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.31, p.21491–21494, 1999.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; SOUSA E SILVA, M.C.; RIBEIRO DE BARROS, M.A.; MORENA, P. The inactivating effect of *Bothrops jararaca* and *Waglerophis merremii* snake plasma on the coagulant activity of various snake venoms. **Toxicon**, v.21, n.2, p.239-246, 1983.

NANJAPPA, V.; THOMAS, J.K.; MARIMUTHU, A.; MUTHUSAMY, B.; RADHAKRISHNAN, A.; SHARMA, R.; AHMAD KHAN, A.; BALAKRISHNAN, L.; SAHASRABUDDHE, N.A.; KUMAR, S.; JHAVERI, B.N.; SHETH, K.V.; KUMAR KHATANA, R.; SHAW, P.G.; SRIKANTH, S.M.; MATHUR, P.P.; SHANKAR, S.; NAGARAJA, D.; CHRISTOPHER, R.; MATHIVANAN, S.; RAJU, R.; SIRDESHMUKH, R.; CHATTERJEE, A.; SIMPSON, R.J.; HARSHA, H.C.; PANDEY, A.; PRASAD, T.S. Plasma proteome database as a resource for proteomics research: 2014 update. **Nucleic Acids Research**, v.42, p.D959-D965, 2014.

NESHEIM, M.E.; FOSTER, W.B.; HEWICK, R.; MANN, K.G. Characterization of factor V activation intermediates. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, n.5, p.3187-3196, 1984.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, n.6, p.255-262, 1988.

NEVES-FERREIRA, A.G.; CARDINALE, N.; ROCHA, S.L.; PERALES, J.; DOMONT, G.B. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1474, n.3, p.309-320, 2000.

NEVES-FERREIRA, A.G.C.; PERALES, J.; ROCHA, S.L.G.; FOX, J.W.; SHANNON, J.D.; DOMONT, G.B. XIIIth World Congress of the International Society on Toxinology - Toxins from Animals, Plants and Microbes, Abstract Book, Paris, September 18-22. p.140, 2000.

NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E.P.; STOCKER, K. Throbocytin-a novel platelet activating enzyme from *Bothrops atrox* venom. **Thrombosis Research**, v.10, n.6, p.863-869, 1977.

O'REILLY, M.S.; HOLMGREN, L.; SHING, Y.; CHEN, C.; ROSENTHAL, R.A.; MOSES, M.; LANE, W.S.; CAO, Y.; SAGE, E.H.; FOLKMAN, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell**, v.79, n.2, p.315-328, 1994.

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

OHSAKA, A.; IKEZAWA, H.; KONDO, H.; KONDO, S.; UCHIDA, N. Haemorrhagic activities of habu snake venom, and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. **American Journal of Pathology**, v.93, n.1, p.201-218, 1978.

OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v.41, n.48, p.14248-14254, 2002.

OLIVEIRA, A.K.; PAES LEME, A.F.; ASSAKURA, M.T.; MENEZES, M.C.; ZELANIS, A.; TASHIMA, A.K.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CAMARGO, A.C.; FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrinlike/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v.53, n.7/8, p.797-801, 2009.

OLIVEIRA, A.K.; PAES LEME, A.F.; ASEGA, A.F.; CAMARGO, A.C.; FOX, J.W.; SERRANO, S.M. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. **Thrombosis and Haemostasis**, v.104, n.3, p.485-497, 2010.

OMBRELLINO, M.; WANG, H.; YANG, H.; ZHANG, M.; VISHNUBHAKAT, J.; FRAZIER, A.; SCHER, L.A.; FRIEDMAN, S.G.; TRACEY, K.J. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. **Shock**, v.15, n.3, p.181-185, 2001.

OMENN, G.S. The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. **Proteomics**, v.4, n.5, p.1235-1240, 2004.

OMORI-SATOH, T. Antihemorrhagic factor as a proteinase inhibitor isolated from the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.495, n.1, p.93-98, 1977.

OUSMAN, S.S.; TOMOOKA, B.H.; VAN NOORT, J.M.; WAWROUSEK, E.F.; O'CONNOR, K.C.; HAFLER, D.A.; SOBEL, R.A.; ROBINSON, W.H.; STEINMAN, L. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. **Nature**, v.448, n.7152, p.474-479, 2007.

OWEN Jr., C.A **Biochemical aspects of copper; copper proteins, ceruloplasmin and copper protein binding**. Park Ridge: Noyes, 1982. 250p. (Copper in biology and medicine series).

OWNBY, C.L.; BJARNASON, J.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **American Journal of Pathology**, v.93, n.1, p.201-218, 1978.

PAES LEME, A.F.; ESCALANTE, T.; PEREIRA, J.G.; OLIVEIRA, A.K.; SANCHEZ, E.F.; GUTIÉRREZ, J.M.; SERRANO, S.M.; FOX, J.W. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v.74, n.4, p.401-410, 2011.

PAES LEME, A.F.; SHERMAN, N.E.; SMALLEY, D.M.; SIZUKUSA, L.O.; OLIVEIRA, A.K.; MENEZES, M.C.; FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma. **Journal of Proteome Research**, v.11, n.1, p.279–291, 2012.

PARK, J.Y.; PARK, J.H.; JANG, W.; HWANG, I.K.; KIM, I.J.; KIM, H.J.; CHO, K.H.; LEE, S.T. Apolipoprotein A-IV is a novel substrate for matrix metalloproteinases. **Journal of Biochemistry**, v.151, n.3, p.291-298, 2012.

PARK, S.M.; HWANG, I.K.; KIM, S.Y.; LEE, S.J.; PARK, K.S.; LEE, S.T. Characterization of plasma gelsolin as a substrate for matrix metalloproteinases. **Proteomics**, v.6, n.4, p.1192-1199, 2006.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v.20, n.18, p.3551-67, 1999.

PERNEMALM, M.; ORRE, L.M.; LENGQVIST, J.; WIKSTRÖM, P.; LEWENSOHN, R.; LEHTIÖ, J. Evaluation of three principally different intact protein prefractionation methods for plasma biomarker discovery. **Journal of Proteome Research**, v.7, n.7, p.2712-2722, 2008.

PISANO, J.J.; FINLAYSON, J.S.; PEYTON, M.P. Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: epsilon-(gamma-glutamyl) lysine. **Science**, v.160, n.3830, p.892-893, 1968.

POLASKOVA, V.; KAPUR, A.; KHAN, A.; MOLLOY, M.P.; BAKER, M.S. High-abundance protein depletion: comparison of methods for human plasma biomarker discovery. **Electrophoresis**, v.31, n.3, p.471–482, 2010.

POON, I.K.; PATEL, K.K.; DAVIS, D.S.; PARISH, C.R.; HULETT, M.D. Histidine-rich glycoprotein: the Swiss Army knife of mammalian plasma. **Blood**, v.117, n.7, p.2093-2101, 2011.

PORTER, S.; CLARK, I.M.; KEVORKIAN, L.; EDWARDS, D.R. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochemical Journal**, v.386, pt.1, p.15-27, 2005.

PRUDOVA, A.; AUF DEM KELLER, U.; BUTLER, G.S.; OVERALL, C.M. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.9, n.5, p.894-911, 2010.

QUERO, C.; COLOME, N.; PRIETO, MR.; CARRASCAL, M.; POSADA, M.; GELPÍ, E.; ABIAN, J. Determination of protein markers in human serum: analysis of protein expression in toxic oil syndrome studies. **Proteomics**, v.4, n.2, p.303-315, 2004.

RAND, M.L.; PACKHAM, M.A.; TAYLOR, D.M.; YEO, E.L.; GEMMELL, C.H.; PATIL, S.; LAM, S.C. The fibrinogen gamma chain dodecapeptide inhibits agonist-induced aggregation of rabbit platelets and fibrinogen binding to rabbit glycoprotein IIb-IIIa. **Thrombosis and Haemostasis**, v.82, n.6, p.1680-1686, 1999.

ROBBINS, K.C.; SUMMARIA, L.; HSIEH, B.; SHAH, R.J. The peptide chains of human plasmin: mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. **Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.10, p.2333-2342, 1967.

ROBEVA, A.; POLITI, V.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. **Biomedica Biochimica Acta**, v.50, n.4/6, p.769-773, 1991.

ROSING, J.; TANS, G.; GOVERS-RIEMSLAG, J.W.; ZWAAL, R.F.; HEMKER, H.C. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, n.1, p.274-283, 1980.

SALVESEN, G.; PARKES, C.; ABRAHAMSON, M.; GRUBB, A.; BARRETT, A.J. Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. **Biochemical Journal**, v.234, n.2, p.429-434, 1986.

SANDSON, J.; HAMERMAN, D.; SCHWICK, G. Altered properties of pathological hyaluronate due to a bound inter-alpha trypsin inhibitor. **Transactions of the Association of American Physicians**, v.78, p.304-313, 1965.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.27, n.2, p.157-162, 1967.

SCHECHTER, I. Mapping of the active site of proteases in the 1960s and rational design of inhibitors/drugs in the 1990s. **Current Protein and Peptide Science**, v.6, n.6, p.501-512, 2005.

SCHILLING, O.; OVERALL, C.M. Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. **Nature Biotechnology**, v.26, n.6, p.685-694, 2008.

SCHILLING, O.; OVERALL, C.M. Proteomic discovery of protease substrates. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, n.1, p.36-45, 2007.

SCHILLING, O.; HUESGEN, P.F.; BARRÉ, O.; AUF DEM KELLER, U.; OVERALL, C.M. Characterization of the prime and non-prime active site specificities of proteases

by proteome-derived peptide libraries and tandem mass spectrometry. **Nature Protocols**, v.6, n.1, p.111-120, 2011.

SCHLAGE, P.; EGLI, F.E.; NANNI, P.; WANG, L.W.; KIZHAKKEDATHU, J.N.; APTE, S.S.; AUF DEM KELLER, U. Time-resolved analysis of the matrix metalloproteinase 10 substrate degradome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.13, n.2, p.580-593, 2014.

SERRANO, S.M.; KIM, J.; WANG, D.; DRAGULEV, B.; SHANNON, J.D.; MANN, H.H.; VEIT, G.; WAGENER, R.; KOCH, M.; FOX, J.W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.52, p.39746-39756, 2006.

SILVA, C.A.; ZULIANI, J.P.; ASSAKURA, M.T.; MENTELE, R.; CAMARGO, A.C.; TEIXEIRA, C.F.; SERRANO, S.M.T. Activation of aMb2-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.322, p.950-956, 2004.

SPRINGER, T.A.; ZHU, J.; XIAO, T. Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin alphaIIb beta3. **Journal of Cell Biology**, v.182, n.4, p.791-800, 2008.

SUBRAMANIAN, S. Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry**, v.16, n.2, p.169-205, 1984.

SUGIKI, M.; MARUYAMA, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, D.G. Enhancement of plasma fibrinolysis *in vitro* by jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v.33, n.12, p.1605-1617, 1995.

SUMI, Y.; ICHIKAWA, Y.; NAKAMURA, Y.; MIURA, O.; AOKI, N. Expression and characterization of pro alpha 2-plasmin inhibitor. **Journal of Biochemistry**, v.106, n.4, p.703-707, 1989.

SUZUKI, K.; DAHLBÄCK, B.; STENFLO, J. Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. **Journal of Biological Chemistry**, v.257, n.11, p.6556-6564, 1982.

TAKEDA, S.; IGARASHI, T.; MORI, H.; ARAKI, S. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. **EMBO Journal**, v.25, n.11, p.2388-2396, 2006.

TAMBOURGI, D.V.; VAN DEN BERG, C.W. Animal venoms/toxins and the complement system. **Molecular Immunology**, 2014. [In press].

TANIZAKI, M.M.; KAWASAKI, H.; SUZUKI, K.; MANDELBAUM, F.R. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v.29, n.6, p.673-681, 1991.

TANJONI, I.; EVANGELISTA, K.; DELLA-CASA, M.S.; BUTERA, D.; MAGALHÃES, G.S.; BALDO, C.; CLISSA, P.B.; FERNANDES, I.; EBLE, J.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin and collagen. **Toxicon**, v.55, n.6, p.1093-1099, 2010.

THOMPSON, R.E.; MANDLE Jr. R.; KAPLAN, A.P. Characterization of human high molecular weight kininogen: procoagulant activity associated with the light chain of kinin-free high molecular weight kininogen. **Journal of Experimental Medicine**, v.147, n.2, p.488-499, 1978.

THORELLI, E.; KAUFMAN, R.J.; DAHLBÄCK, B. Cleavage requirements for activation of factor V by factor Xa. **Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.1, p.12-20, 1997.

TIRUMALAI, R.S.; CHAN, K.C.; PRIETO, D.A.; ISSAQ, H.J.; CONRADS, T.P.; VEENSTRA, T.D. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.2, n.10, p.1096–1103, 2003.

TOKUNAGA, F.; NAGASAWA, K.; TAMURA, S.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; KISIEL, W. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom: identification of isoproteins RVV-V α , -V β , and -V γ and their complete amino acid sequences. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.33, p.17471-17481, 1988.

TRAVIS, J.; PANNELL, R. Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography. **Clinica Chimica Acta**, v.49, n.1, p.49-52, 1973.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.5, n.9, p.785-99, 2006.

VALENTE, R.H.; DRAGULEV, B.; PERALES, J.; FOX, J.W.; DOMONT, G.B. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor: isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.10, p.3042-3052, 2001.

WALKER, F.J.; FAY, P.J. Characterization of an interaction between protein C and ceruloplasmin. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.4, p.1834-1836, 1990.

WALKER, F.J.; FAY, P.J. Regulation of blood coagulation by the protein C system. **FASEB Journal**, v.6, n.8, p.2561-2567, 1992.

WANG, H.; ZHANG, M.; SODA, K.; SAMA, A.; TRACEY, K.J. Fetuin protects the fetus from TNF. **Lancet**, v.350, n.9081, p.861-862, 1997.

WEISSENBERG, S.; OVADIA, M.; KOCHVA, E. Inhibition of the proteolytic activity of hemorrhagin-e from *Crotalus atrox* venom by antihemorrhagins from homologous serum. **Toxicon**, v.30, n.5/6, p.591-597, 1992.

YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATOH, T. Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a double-headed cystatin domain. **Journal of Biochemistry**, v.112, n.5, p.583-589, 1992.

ZAITSEV, V.N.; ZAITSEVA, I.; PAPIZ, M.; LINDLEY, P.F. An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma. **JBIC, Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.4, n.5, p.579-587, 1999.

ZELANIS, A.; ANDRADE-SILVA, D.; ROCHA, M.M.; FURTADO, M.F.; SERRANO, S.M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P.L. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.3, art.e1554, p.1-7, 2012.

ZHANG, J.; XIN, L.; SHAN, B.; CHEN, W.; XIE, M.; YUEN, D.; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; LAJOIE, G.A.; MA, B. PEAKS, DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.11, n.4, p.M111.010587, 2012.

ZHUO, L.; HASCALL, V.C.; KIMATA, K. Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.37, p.38079-38082, 2004.

ZHUO, L.; KIMATA, K. Structure and function of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains. **Connective Tissue Research**, v.49, n.5, p.311-320, 2008.

ZUBAREV, R.A. The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. **Proteomics**, v.13, n.5, p.723-726, 2013.

ANEXOS

Tabelas A1-A4: Proteínas e peptídeos obtidos pela análise por LC-MS/MS das frações peptídicas do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq) após incubação com HF3. Identificação por *Mascot/TPP*. (em CD-ROM)

Tabelas A5-A8: Proteínas e peptídeos obtidos pela análise por LC-MS/MS das frações peptídicas do P(T), P(depA), P(dep20) e P(enrq) após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*. (em CD-ROM)

Tabela A9: Peptídeos obtidos pela análise por LC-MS/MS da fração peptídica do fibrinogênio isolado após incubação com HF3. Identificação por *Peaks*. (em CD-ROM)

Tabela A10: Peptídeos obtidos pela incubação do HF3 com uma biblioteca de peptídeos tripsínicos derivados de proteínas do plasma e identificados por LC-MS/MS. (em CD-ROM)

Tabela A11: Peptídeos obtidos pela análise da fração peptídica do plasma de *B. jararaca* após incubação com HF3. Sequenciamento de novo obtido pelo programa Peaks Studio 7. (em CD-ROM)