

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANDRÉ ZELANIS PALITOT PEREIRA

**Proteômica e transcriptômica aplicadas ao estudo da
variabilidade do veneno de *Bothrops jararaca*
(Serpentes: Viperidae)**

Versão original da Tese defendida

São Paulo
04/04/2011

ANDRÉ ZELANIS PALITOT PEREIRA

**Proteômica e transcriptômica aplicadas ao estudo da
variabilidade do veneno de *Bothrops jararaca*
(Serpentes:Viperidae)**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Dra. Solange Maria de Toledo Serrano

São Paulo
2011

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

P436p Pereira, André Zelanis Palitot
Proteômica e transcriptômica aplicadas ao estudo da variabilidade
do veneno de *Bothrops jararaca* (Serpentes:Viperidae) / André
Zelanis Palitot Pereira. -- São Paulo, 2011.
171p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Serrano, Solange Maria de Toledo

1. Proteína : Bioquímica 2. Biologia molecular I. T. II. Serrano,
Solange Maria de Toledo, orientador.

574.19245 CDD



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

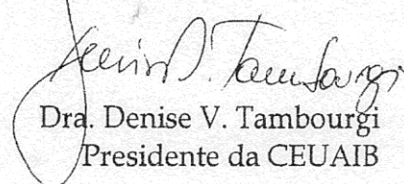
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

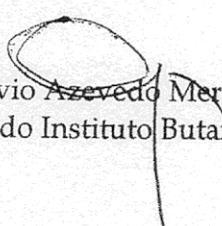
Certificamos que o Projeto intitulado "Proteômica e transcriptômica aplicadas ao estudo da variação ontogenética do veneno de *Bothrops jararaca*", protocolo nº 377/07, sob a responsabilidade de Solange Maria de Toledo Serrano e André Zelanis Palitot Pereira, está de acordo com os Princípios Éticos na 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 13/03/2007.

"We certify that the Research entitled Proteomics and transcriptomics applied to the study of the ontogenetic variation of *Bothrops jararaca* venom, protocol nº 377/07, under the responsibility of Solange Maria de Toledo Serrano and André Zelanis Palitot Pereira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/13/2007".

São Paulo, 16 de março de 2007.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

À minha doce Andréa.

AGRADECIMENTOS

Espero que eu consiga, nessas poucas linhas, expressar a dimensão da minha gratidão para com todos que estiveram (e ainda estão) presentes em minha vida e que, sem dúvida alguma, contribuíram para este trabalho.

Agradeço à Deus e aos e meus pais, Suzete Zelanis da Silva e José Arioswaldo Pereira, pelo dom da vida e pelo amor incondicional.

À minha noiva, Andréa Aparecida da Luz, pelo companheirismo, paciência (!), amor e por estar sempre presente (sempre mesmo!). Você é o meu melhor exemplo de vida.

Ao meu irmão Marcel Zelanis pela grande amizade e apoio.

Em memória, aos meus queridos avós Francisco Alves da Silva e Stanislawa Zelanis. Saudade.

À Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado, pelo apoio desde que cheguei em São Paulo e no Instituto Butantan; pelos conselhos, amizade, incentivo e por me introduzir na toxinologia.

À minha orientadora Dra. Solange Maria de Toledo Serrano, pela dedicação, confiança no meu trabalho, incentivo, apoio e amizade.

Aos meus co-orientadores Dr. Paulo Lee Ho e Dr. Inácio L.M. Junqueira de Azevedo pela amizade e, sobretudo, ajuda nas análises transcriptômicas.

Aos colegas do Laboratório de Herpetologia, pesquisador Wilson Fernandes (diretor do laboratório) pela concessão dos venenos e por permitir que parte deste trabalho fosse realizado nas instalações do Laboratório de Herpetologia; MSc. Daniel Stuginski, MSc. Sávio Sant'anna e MSc. Silvia Cardoso pelo auxílio na extração de venenos de filhotes de *B. jararaca*; Dra. Marisa M. T. Rocha, pela amizade, auxílio nos ensaios biológicos e na extração das glândulas de *B. jararaca*.

Aos amigos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (e àqueles que outrora fizeram parte do LETA) Eduardo Kitano, Edson Yamashiro, Gabriela Dias, Débora

Andrade, MSc. Waltraud Mair, MSc. Ana Karina Oliveira, Dra. Milene Menezes, Dra. Aline Lopes, Dra. Amanda Asega, Dr. Alexandre K. Tashima, Dra. Adriana F. Paes-Leme e Dra. Mara S. Hoshida. É muito bom poder contar com todos vocês!

Ao Dr. Hugo Armelin, diretor do CAT/cepid, pela possibilidade de desenvolver este projeto nas instalações do CAT.

Aos pesquisadores Dr. Jay W. Fox, Dr. John Shannon e Dr. Nicholas E. Sherman da *Biomolecular Research Facility*, Universidade de Virginia, Estados Unidos, pela colaboração em parte dos experimentos de proteômica e espectrometria de massas.

Aos amigos Dr. Antonio F.M Pinto e Dra. Renata Terra, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela grande ajuda durante o período que passei nos Estados Unidos.

Aos pesquisadores Dra. Katherine Stumpo e Dr. Vernon N. Reinhold do *Glycomics Center*, da Universidade de New Hampshire, Estados Unidos, pelos ensinamentos e colaboração nos experimentos de glicômica deste projeto.

Ao meu grande amigo MSc. Érico Teodósio, companheiro e sempre presente.

Aos meus afilhados Erik Fernando da Luz, Emanuelle e Fernanda Werlich, pela alegria contagiante da vida de vocês.

Ao Dr. Sandro J. Souza, Dra. Vilma Martins e Dra. Iolanda Cuccovia pela participação no meu exame de qualificação e pelas importantes discussões.

Ao meu assessor(a) da FAPESP, pelas sistemáticas críticas (sempre construtivas) sobre o meu projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, (processos 06/60486-0 e 07/54626-7), pela concessão da bolsa de Doutorado e projeto regular de auxílio à pesquisa.

*[...] E por isso eu lhe digo
Que não é preciso
Buscar solução para a vida
Ela não é uma equação
Não tem que ser resolvida
A vida, portanto, meu caro,
Não tem solução*

Solução de vida (Molejo dialético)
(Paulinho da Viola e Ferreira Gullar)

RESUMO

Zelanis, A. **Proteômica e transcriptômica aplicadas ao estudo da variabilidade do veneno de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2011. 171p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

Estudos prévios demonstraram que as atividades biológicas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* sofrem significantes modificações ontogenéticas. Neste estudo é apresentada uma análise comparativa do proteoma, peptidoma e transcriptoma da glândula de veneno de filhotes e adultos de *B. jararaca*, correlacionando os resultados obtidos com algumas características funcionais dos venenos.

Venenos de 694 filhotes de até duas semanas de idade e 110 adultos, provenientes do Estado de São Paulo foram extraídos e liofilizados para as análises proteômicas/peptidômicas e funcionais. O mRNA de glândulas de veneno de 20 filhotes e 10 adultos foi obtido para a construção de bibliotecas de cDNA e a análise de *Expressed Sequence Tag* (ESTs).

Demonstramos que a atividade hemorrágica é similar para os venenos de filhotes e adultos, enquanto que o veneno de adultos é discretamente mais letal para camundongos; entretanto, o veneno de filhotes mostrou-se extremamente mais letal para aves, uma característica que pode garantir proteção contra potenciais predadores nas fases iniciais de vida da espécie. A atividade coagulante do veneno de filhotes é cerca de 10 vezes mais alta que aquela verificada para o veneno de adultos e é atribuída sobretudo à atividade de metaloproteinases. Essas diferenças nas atividades funcionais se refletiram nos diferentes perfis verificados por eletroforese bidimensional e identificação de *spots* de proteínas por digestão tripsínica *in-gel* seguida de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem*, zimografia com gelatina, imunocoloração utilizando anticorpos específicos anti-proteinases, e glicoproteínas com afinidade

pela concanavalina -A. A comparação dos venenos por derivatização com *tags* isóbaros (iTRAQ) e a análise das ESTs revelaram diferenças claras entre os níveis de toxinas presentes nos venenos e as metaloproteinases foram a classe de toxinas mais expressa, além de serem as toxinas cujos perfis estruturais apresentaram maior mudança, como ilustrado pelo quociente PIII/PI, que é maior nos venenos de filhotes.

Dimorfismo sexual foi detectado em diversas classes de toxinas no veneno de adultos por análises proteômicas e transcriptômicas e, surpreendentemente, o fator de crescimento de nervo foi detectado apenas no veneno/glândula de veneno de machos.

A análise glicoproteômica mostrou que N-glicosilações parecem ser as modificações pós-traducionais mais proeminentes nas toxinas de *B. jararaca*, e os perfis de N-glicosilação apresentaram-se distintos para as proteínas dos venenos de filhotes e adultos. Entretanto, a composição de N-glicanos não variou entre as amostras, indicando que diferenças na utilização de motivos de N-glicosilação poderiam explicar as diferenças nos níveis de glicosilação observados pelos diferentes perfis eletroforéticos dos venenos.

A análise da fração peptídica dos venenos de filhotes e adultos por espectrometria de massas resultou num perfil similar de Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs), que foram detectados em suas formas canônicas e também com novas seqüências, cujas estruturas primárias sugerem um processamento da proteína precursora em sítios até então não descritos.

Acreditamos que este seja o estudo mais abrangente sobre a variabilidade do veneno de uma serpente já realizado e os resultados demonstram que há uma relação clara entre as alterações ontogenéticas na dieta e tamanho corporal e o proteoma/peptidoma do veneno desta espécie.

ABSTRACT

Zelanis, A. **Proteomics and transcriptomics applied to the study of *Bothrops jararaca* venom variability (Serpentes: Viperidae)**. 2011. 171p. PhD Thesis- Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

Previous studies have demonstrated that the biological activities displayed by the venom of the snake *Bothrops jararaca* undergo a significant ontogenetic shift. In this investigation, we performed comparative proteomic, peptidomic and transcriptomic analyses of venoms and venom glands from newborn and adult specimens of *B. jararaca* and correlated the results with the evaluation of functional venom features.

Venoms from 694 two-week old newborns and 110 adults from São Paulo state were milked and lyophilized for functional and proteomic/peptidomic analyses. Additionally, mRNA was obtained from the venom glands of 20 newborns and 10 adults and used for the construction of cDNA libraries and Expressed Sequence Tag (ESTs).

We demonstrate that newborn and adult venoms have similar hemorrhagic activities, while the adult venom has a slightly higher lethal activity upon mice; however, the newborn venom is extremely more potent to kill chicks, a feature that might ensure protection against potential predators in early stages of *B. jararaca* life. Interestingly, the coagulant activity of the newborn venom upon human plasma is ten times higher than that of the adult venom and is contributed mainly by metalloproteinases. Differences in functional activities were clearly reflected in the venom different profiles of two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) and protein spot identification by in-gel trypsin digestion followed by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), gelatin zymography, immunostaining using specific anti-proteinase antibodies, and concanavalin A-binding proteins. The venom comparison by isobaric tag peptide labeling (iTRAQ)

and ESTs analysis revealed clear differences in toxin levels. The metalloproteinases were detected as the toxin class most expressed in the venoms in addition to being the toxins whose structural profile most changed, as illustrated by the ratio P-III/P-I class being higher in newborn venoms.

Sexual dimorphism has been detected in various adult venom toxin classes by proteomic and transcriptomic analyses and, interestingly, the nerve growth factor was detected only in the male venom gland/venom.

The glycoproteomic analysis showed that N-glycosylation seems to be the most prominent post-translational modification in *B. jararaca* toxins and the N-glycosylation profiles differed for newborn and adult venom toxins. Nevertheless, the N-glycan composition between the samples did not vary indicating that differences in the utilization of the N-glycosylation motif could be the explanation for the differences in the glycosylation levels indicated by the differential electrophoretic profiles of venom proteins.

The analysis of the peptide fraction of newborn and adult venoms by mass spectrometry revealed a similar profile of Bradykinin Potentiating peptides (BPPs), however these were detected in the venoms showing their canonical sequences and also novel sequences corresponding to BPPs processed from their precursor protein at sites so far not described.

To the best of our knowledge, this is the most comprehensive study on a snake venom variation and the results clearly demonstrate a relationship between the ontogenetic shift in diet and animal size, and the venom proteome/peptidome in *B. jararaca* species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das classes de metaloproteinases de venenos de serpentes.

Figura 2: Coloração caudal característica de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Figura 3: Delineamento experimental utilizado neste projeto para explorar a variabilidade do veneno de *B. jararaca*.

Figura 4: Extração de veneno e glândulas de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Figura 5: Estratégia experimental utilizada para análise quantitativa dos proteomas dos venenos de *B. jararaca*.

Figura 6: Procedimento de derivatização de glicanos para análise por espectrometria de massas.

Figura 7: Mapa do vetor pSPORT1 (Invitrogen).

Figura 8: Perfil protéico dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

Figura 9: Eletroforese bidimensional sob diferentes gradientes de pH.

Figura 10: Eletroforese bidimensional do veneno de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Figura 11: Eletroforese bidimensional do veneno de adultos de *B. jararaca*

Figura 12: Eletroforese bidimensional do veneno de machos e fêmeas adultas de *B. jararaca*.

Figura 13 Sub-proteoma de proteinases dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* e reconhecimento dos venenos pelo soro antitoxinótico.

Figura 14: Zimografia em gel de SDS-poliacrilamida contendo gelatina.

Figura 15: Perfil de eluição da mistura de peptídeos tripsínicos dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* marcados com os reagentes iTRAQ™.

Figura 16: Espectro de fragmentação (MS/MS) do íon de m/z 473,78²⁺.

Figura 17: Glicoproteoma - coloração fluorescente para glicoproteínas.

Figura 18: Deglicosilação dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*, avaliada por eletroforese em gel de gradiente de poliácridamida.

Figura 19: N-deglicosilação total dos venenos de filhotes e adultos sob condições desnaturantes avaliada por eletroforese bidimensional.

Figura 20: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida do material adsorvido à coluna de Concanavalina A-Sepharose.

Figura 21: Espectro representativo da análise de *N*-glicanos liberados das glicoproteínas dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Figura 22: Detalhes estruturais de glicanos revelados por MSⁿ.

Figura 23: Vias de fragmentação seguidas para determinação de topologia de isômeros para o íon de *m/z* 1569,0.

Figura 24: Vias de fragmentação seguidas para determinação de topologia de isômeros para o íon de *m/z* 815,0²⁺

Figura 25: Vias de fragmentação seguidas para determinação de topologia de isômeros para o íon de *m/z* 932,2²⁺.

Figura 26: Hipóteses para a geração de variabilidade nas glicofomas de glicoproteínas com açúcares *N*-ligados nos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Figura 27: Espectro de massas representativo da fração peptídica dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* analisada por MALDI-ToF.

Figura 28: Espectro de massas (MALDI-ToF) representativo dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* na ausência ou presença de inibidores.

Figura 29: Representação esquemática do precursor dos BPPs de *B. jararaca*.

Figura 30: Gel de agarose-formaldeído evidenciando o perfil do RNA total extraído e utilizado na construção das bibliotecas de cDNA de glândulas de venenos de filhotes e adultos.

Figura 31: Gel de agarose 1% evidenciando a distribuição dos insertos de clones aleatórios das bibliotecas de cDNA de glândulas de venenos dos animais adultos (machos e fêmeas).

Figura 32: :Gel de agarose 1% mostrando a distribuição de tamanho dos insertos da biblioteca de cDNA de glândulas de venenos de filhotes.

Figura 33: Participação dos clones das bibliotecas de *B. jararaca* na composição das categorias analisadas (Toxinas; Não toxinas; *No hit*).

Figura 34: Representação dos transcritos de toxinas putativas de *B. jararaca* (filhotes e adultos).

Figura 35: Representação gráfica dos GCRs (montados a partir de clusters das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*).

Figura 36: Representação gráfica dos clusters correspondentes a metaloproteinases das bibliotecas de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Figura 37: Seqüência de aminoácidos deduzida da tradução do cluster BJOTD0087C.

Figura 38: Seqüências de aminoácidos deduzidas da tradução dos clusters de metaloproteinases da classe P-III BJOTD0209C, BJOTD0228C e BJOTD0238C de filhotes de *B. jararaca*.

Figura 39: Representação dos transcritos celulares das bibliotecas de cDNA das glândulas de veneno de *B. jararaca*.

Figura 40: Ativação dos Fatores II e X da coagulação sanguínea pelos venenos de *B. jararaca*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Toxinas isoladas do veneno de *B. jararaca* com atuação sobre a hemostasia.

Tabela 2: Transcriptomas de glândulas de venenos de serpentes publicados até o momento.

Tabela 3: Número de entradas (seqüências de proteínas) correspondentes a proteínas de serpentes ou veneno de serpentes presentes nos bancos de dados NCBI e UniProtKB.

Tabela 4: Protocolo de focalização isoeétrica utilizado para fitas de 24 cm.

Tabela 5: Parâmetros de termociclagem utilizados na reação de PCR que precede o seqüenciamento de nucleotídeos.

Tabela 6: Análise de LC-MS/MS das proteínas diferencialmente expressas nos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Tabela 7: *Spots* identificados no gel bidimensional do veneno de filhotes de *B. jararaca*.

Tabela 8: *Spots* identificados no gel bidimensional do veneno de adultos de *B. jararaca*.

Tabela 9: *Spots* identificados no gel bidimensional do veneno de machos adultos de *B. jararaca*.

Tabela 10: *Spots* identificados no gel bidimensional do veneno de fêmeas adultas de *B. jararaca*.

Tabela 11: Proteínas identificadas e quantificadas no experimento com ITRAQ™.

Tabela 12: Cálculo de rendimento de glicoproteínas presentes nas amostras de veneno submetidas à cromatografia em coluna de Concanavalina A- Sepharose.

Tabela 13: Identificação de proteínas (LC-MS/MS) presentes no eluato da cromatografia realizada na coluna de Concanavalina A- Sepharose.

Tabela 14: Lista da composição de *N*-glicanos liberados de glicoproteínas das amostras de veneno de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Tabela 15: Valores de *m/z* obtidos na análise dos venenos de *B. jararaca* por espectrometria de massas (MALDI-ToF).

Tabela 16: Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs) identificados no veneno de *B. jararaca* no experimento de LC-MS/MS.

Tabela 17: Representação dos clusters montados a partir das ESTs derivadas dos clones das bibliotecas de cDNA das glândulas de veneno de filhotes e adultos (machos e fêmeas) de *B. jararaca*.

Tabela 18: Clusters correspondentes a toxinas putativas das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*, suas proporções e redundâncias (clones/cluster).

Tabela 19: Atividades biológicas dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Tabela 20: Atividade coagulante dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* sobre o plasma.

Tabela 21: Atividade proteolítica dos venenos de *B. jararaca* sobre diferentes substratos (caseína e fibrinogênio).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta básica de busca de alinhamento local)

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CHAPS: sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano

CID: *Collision Induced Dissociation* (Dissociação induzida por colisão)

DDA: *Data Dependent Acquisition* (Aquisição Dependente de Dados)

DMSO: Dimetil sulfóxido

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético

ESI: *Electrospray Ionization* (ionização por *electrospray*)

ESTs: *Expressed Sequence Tags* (etiquetas de seqüências expressas)

FII: Fator II / Protrombina

FIIa: Fator II ativado / trombina

FX: Fator X / Fator de Stuart

FXa: Fator X ativado

GCR: Grupo de Cluster Relacionado

Glc: Glicose

GlcNAc: *N*-acetil-glicosamina

Hex: Hexose

HexNAc: *N*-acetil-hexosamina

IgG: Imunoglobulina G

IPG: *Immobilized pH Gradient* (gradiente de pH imobilizado)

iTRAQ: *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation* (etiquetas isóbaras para quantificação relativa e absoluta)

LC: *Liquid Chromatography* (cromatografia líquida)

LC-MS/MS: *Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial)

m/z: razão massa/carga

MALDI-ToF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (Ionização por dessorção a *laser* assistida por matriz)

Man: Manose

MMTS: Tiosulfonato de metil-metano

MOPS: ácido 3-[N-morfolino]-propano sulfônico

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

MSⁿ: Espectrometria de massas seqüencial em que “n” representa um número maior que 2

NHS: N-hidróxi-succinimida

NP-40: 2-[2-[4-(2,4,4-trimetilpentano-2-il)phenoxy]etoxi]etanol

pb: Pares de base

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato-salina)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação da polimerase em cadeia)

pI: ponto isoelérico

PLA₂: *Phospholipase A₂* (fosfolipase A₂)

PMSF: Fluoreto de fenil metil sulfonil

pNa: Para-nitroanilina

Q-ToF: *Quadrupole-Time of Flight* (Quadrupolo- tempo de voo)

rpm: Rotações Por Minuto

SDS: *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE: *Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio)

TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina

TEAB: Bicarbonato de trietilamônio

TFA: Ácido tri-fluoro-acético

TIC: *Total Ion Count* (contagem total de íons)

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

UTR: *Untranslated Region* (região não traduzida).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 VENENOS DE SERPENTES: UM PRODUTO BIOLÓGICO.....	1
1.2 A VARIABILIDADE NOS VENENOS DE SERPENTES	9
1.3 O VENENO DA <i>BOTHROPS JARARACA</i>	12
1.4 METODOLOGIAS “ÔMICAS” EM TOXINOLOGIA.....	15
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 OBTENÇÃO DOS VENENOS E GLÂNDULAS DE FILHOTES E ADULTOS DE <i>B. JARARACA</i> .	22
3.1.1 Venenos	22
3.1.2 Glândulas.....	23
3.2 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	24
3.2.1. <i>Quantificação de proteínas</i>	24
3.2.2 <i>Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, zimografia, eletroforese bidimensional e Western-blot bidimensional</i>	24
3.2.3 <i>Espectrometria de massas</i>	28
3.2.3.1 <i>Digestão in gel</i>	28
3.2.3.2 <i>Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)</i>	30
3.2.3.3 <i>Proteômica quantitativa</i>	32
3.3 ANÁLISE GLICOPROTEÔMICA.....	35
3.3.1 <i>Deglicosilação em condições desnaturantes</i>	35
3.3.2 <i>Cromatografia em coluna de afinidade e LC-MS/MS</i>	36
3.3.3 <i>Análise de N-glicanos por espectrometria de massas</i>	37
3.3.3.1 <i>Deglicosilação em condições desnaturantes</i>	37
3.3.3.2 <i>Redução e permetilação dos N-glicanos liberados enzimaticamente</i>	38
3.3.3.3 <i>Análise por espectrometria de massas sequencial (MSⁿ)</i>	40
3.4 ANÁLISE PEPTIDÔMICA.....	41
3.5 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA – PROTEÔMICA	42
3.5.1 <i>Processamento dos espectros</i>	42
3.5.2 <i>Busca em bancos de dados e identificação de peptídeos/proteínas</i>	43
3.6 ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA	45
3.6.1 <i>Extração, purificação e análise do RNA</i>	45
3.6.2 <i>Construção das bibliotecas de cDNA</i>	47
3.6.3 <i>Geração das ESTs</i>	52
3.7. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA –TRANSCRIPTÔMICA	55
3.7.1 <i>Análise bioinformática das ESTs</i>	55
3.8 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS VENENOS	56
3.8.1 <i>Atividades biológicas</i>	56

3.8.1.1 Dose letal 50% (DL ₅₀)	56
3.8.1.2 Atividade hemorrágica – Dose Mínima Hemorrágica (DMH)	56
3.8.2 Atividades enzimáticas	57
3.8.2.1 Atividade coagulante sobre o plasma– Dose Mínima Coagulante (DMC)	57
3.8.2.2 Ativação da protrombina (Fator II)	57
3.8.2.3 Ativação do Fator X	58
3.8.2.4 Atividade proteolítica sobre a caseína	58
3.8.2.5 Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio	59
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4. RESULTADOS	60
4.1 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	60
4.1.1 Perfis eletroforéticos	60
4.1.2 Sub-proteoma de proteinases e reconhecimento pelo soro anti-botrópico produzido pelo Instituto Butantan.....	72
4.1.3 Sub-proteoma de gelatinases - Zimografia	74
4.1.4 Proteômica quantitativa	75
4.2 ANÁLISE GLICOPROTEÔMICA.....	80
4.2.1 Glicoproteoma dos venenos de <i>B. jararaca</i> – coloração fluorescente para glicoproteínas e deglicosilação total das amostras de veneno	80
4.2.2 Cromatografia em coluna de afinidade (Concanavalina A - sepharose) e análise proteômica (LC-MS/MS) das proteínas ligadas	83
4.2.3 N-glicoma dos venenos de filhotes e adultos.....	86
4.3 ANÁLISE PEPTIDÔMICA.....	96
4.4 ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA	101
4.4.1 Construção das bibliotecas de cDNA de filhotes e adultos de <i>B. jararaca</i>	101
4.4.2 Montagem e análise dos clusters.....	103
4.4.3 Análise dos clusters de toxinas	105
4.4.4 Análise de Grupos de Clusters Relacionados (GCRs).....	110
4.4.5 Análise de alguns clusters exclusivos: metaloproteinases	113
4.4.6 Análise dos clusters celulares	118
4.5 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS VENENOS DE FILHOTES E ADULTOS DE <i>B.</i> <i>JARARACA</i>	120
4.5.1 Atividades biológicas	120
4.5.1.1 Dose Letal Média (DL ₅₀) e Dose Mínima Hemorrágica (DMH).....	120
4.5.2 Atividades enzimáticas	121
4.5.2.1 Atividade coagulante sobre o plasma – Dose Mínima Coagulante	121
4.5.2.2 Ativação dos fatores II e X.....	122
4.5.2.3 Ativação proteolítica sobre a caseína e fibrinogênio.....	123
5. DISCUSSÃO	125

5.1 A VARIABILIDADE NO PROTEOMA E TRANSCRIPTOMA DO VENENO DE <i>B. JARARACA</i> : ASPECTOS GERAIS	126
5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE TOXINAS - PROTEÔMICA QUANTITATIVA E TRANSCRIPTÔMICA.....	129
5.2.1 <i>Algumas considerações sobre as metodologias utilizadas</i>	129
5.2.2 <i>Toxinas diferencialmente expressas - proteinases</i>	132
5.3 A VARIABILIDADE NO VENENO DE <i>B. JARARACA</i> E SUAS IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS .	137
5.4 CONSIDERAÇÕES ACERCA DO PEPTIDOMA DO VENENO DE <i>B. JARARACA</i>	145
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	148
6. CONCLUSÕES	150
7. REFERÊNCIAS	153
LISTA DE ANEXOS.....	171
SÚMULA CURRICULAR	221

1. Introdução

1.1 Venenos de serpentes: um produto biológico

O veneno tem um importante papel fisiológico para as serpentes: inicia e auxilia a digestão de presas, constitui um mecanismo de defesa contra predadores/agressores e é o fator responsável pela subjugação das presas (Gans e Elliot, 1968; Thomas e Pough, 1979; Mackessy, 1993). Assim, os venenos contêm componentes que agem de modo sinérgico, destinados a afetar processos vitais, atuando no sistema nervoso, cardiovascular, locomotor, afetando a coagulação do sangue, e a permeabilidade de membranas (Karlsson, 1979). As células secretoras da glândula de veneno são o principal componente do epitélio glandular e compõem mais de 80% da população total de células. Este epitélio é extremamente especializado na produção, estocagem e secreção de um produto de composição principalmente protéica (aproximadamente 90% do peso seco dos venenos), que desempenham as mais variadas atividades biológicas (Gans e Elliot, 1968; Kochva, 1978; Kochva *et al.* 1983; Yamanouye *et al.* 1997). Acredita-se que a glândula de veneno represente uma modificação de glândulas salivares e que seu aparecimento tenha sido um fator crucial na radiação adaptativa e conseqüente sucesso ecológico das serpentes (Kochva *et al.* 1983; Thomas e Pough, 1979). Fry *et al.* (2005) estimaram que o aparato venenífero surgiu pela primeira vez há cerca de 200 milhões de anos na evolução dos membros da ordem Squamata, constituindo um dos principais fatores norteadores da diversidade ecológica em serpentes e lagartos.

Em última instância, os venenos são o *resultado* de um complexo processo evolutivo. A duplicação e divergência de genes são apontadas como uma das principais causas das substituições de nucleotídeos, sobretudo de substituições não-sinônimas, que levam ao aparecimento de isoformas de toxinas (Moura-da-Silva *et al.* 1997; Ohno *et al.* 2003; Li *et al.* 2005a, Li *et al.* 2005b). Este processo chamado de *evolução acelerada* é um dos principais fatores norteadores da diversificação do potencial biológico e do espectro de ação das toxinas frente a diferentes alvos/presas (Moura-da-Silva *et al.* 1997; Ohno *et al.* 2003; Li *et al.* 2005a, Li *et al.* 2005b).

Dentre as famílias de serpentes conhecidas atualmente, a família Viperidae abriga espécies que possuem um alto grau de especialização no aparato venenífero, caracterizado pela presença de complexos sistemas de produção e armazenamento de veneno, bem como por modificações morfológicas importantes, como: uma musculatura cefálica bem desenvolvida, sobretudo próxima às glândulas de veneno, além de dentes móveis e canaliculados, implantados na parte anterior do maxilar móvel, que permite a ereção das presas para frente no momento do bote (Gans, 1968; Thomas e Pough, 1979; Kochva, 1987).

Entre os componentes freqüentemente encontrados no proteoma dos venenos das serpentes viperídeas neotropicais estão: metaloproteinases, disintegrinas, serinoproteinases, fosfolipases A₂ (PLA₂), lectinas tipo C, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs) e fatores de crescimento como os svVEGF e svNGF (*snake venom Vascular Endothelium Growth Factor* e *snake venom Nerve Growth Factor*, respectivamente).

Uma breve descrição destas classes de toxinas é apresentada a seguir.

Metaloproteinases

As metaloproteinases estão entre as enzimas proteolíticas mais abundantes nos venenos de viperídeos (Fox e Serrano, 2008a). Essas hidrolases apresentam um íon inorgânico (geralmente zinco) coordenado pelas cadeias laterais dos três resíduos de histidina presentes na seqüência HEXXHXXGXXH, altamente conservada nessas proteínas (Fox e Serrano, 2008a).

Algumas destas enzimas são chamadas de hemorraginas e estão envolvidas em diversos processos decorrentes do envenenamento como: dermonecrose, degradação de fatores da cascata de coagulação sanguínea, edema e hemorragia (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez *et al.* 2005; Fox e Serrano, 2008a; Oliveira *et al.* 2010; Baldo *et al.* 2010). As metaloproteinases são expressas na glândula na forma de zimogênios e apresentam uma organização estrutural singular. Com base nas estruturas das proteínas maduras e seus respectivos precursores, atualmente as

metaloproteínas de veneno de serpentes são divididas em 3 classes (P-I a P-III), de acordo com seus domínios funcionais e em diversas subclasses, com base em suas respectivas modificações pós-traducionais, conforme mostrado na Figura 1.

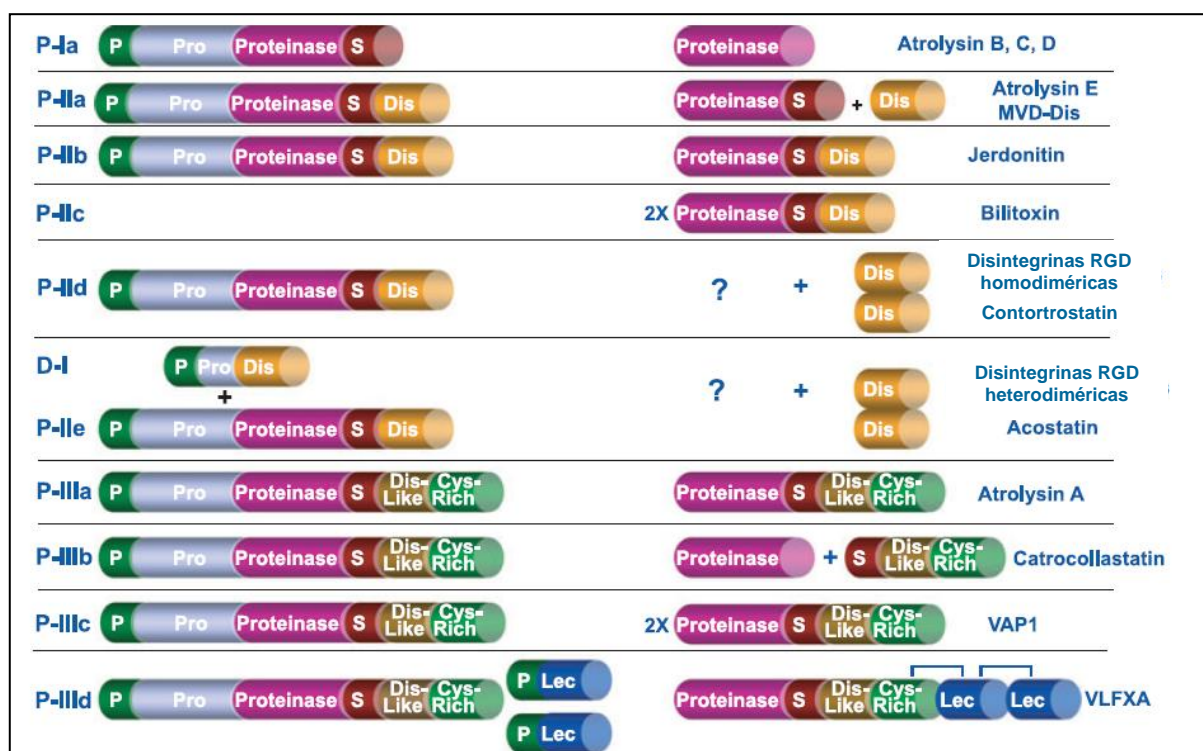


Figura 1: Representação esquemática das metaloproteínas de venenos de serpentes. A porção esquerda da figura indica a forma de zimo gênio da proteína enquanto a porção direita compreende as formas pós-traducionalmente processadas. Interrogações indicam que o produto processado não foi identificado no veneno. (Reproduzido de Fox e Serrano, 2008a). P representa o peptídeo sinal e S a região espaçadora (*spacer*) entre os domínios.

A classe P-I é representada por enzimas que apresentam apenas o domínio catalítico (proteínase); as metaloproteínas da classe P-II são subdivididas em P-IIa a P-IIe. A subclasse PIIa apresenta um domínio catalítico associado (por uma região espaçadora) a um domínio disintegrina, que é processado pós-traducionalmente, originando uma proteínase de estrutura semelhante a da classe P-I e uma disintegrina; na subclasse PIIb as proteínas apresentam os dois domínios (metaloproteínase e disintegrina) unidos pela região espaçadora (essas proteínases podem ainda ser diméricas, característica da subclasse P-IIc); membros da subclasse P-IId apresentam a estrutura canônica da classe P-II, contudo o domínio metaloproteínase 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, na Figura 1) com disintegrinas provenientes de um precursor de estrutura da classe P-II.

A classe P-III abriga estruturas mais complexas (subdivididas em P-IIIa-d); a subclasse P-IIIa compreende proteínas que incluem, além do domínio metaloproteinase, dois domínios adicionais: tipo-disintegrina (que apresenta um motivo estrutural XCD, diferente do RGD, típico das disintegrinas verdadeiras, em que X é um aminoácido diferente de arginina) e rico em cisteínas; membros da subclasse P-IIIb podem ser encontrados tanto na forma intacta (semelhante à classe P-IIIa, com todos os domínios unidos) quanto numa forma pós-traducionalmente processada (por autólise), em que os domínios metaloproteinase (M), e tipo-disintegrina e rico em cisteínas (D+C) encontram-se separados; membros da subclasse P-IIIc apresentam arquitetura similar à classe P-IIIa, contudo sofrem oligomerização, apresentando-se em forma de dímeros; proteínas da subclasse P-IIId apresentam uma estrutura semelhante àquela verificada na classe P-IIIa, entretanto dois domínios tipo-lectina são unidos pós-traducionalmente, de forma covalente, ao domínio rico em cisteínas.

Disintegrinas

As disintegrinas são proteínas de baixa massa molecular com um motivo estrutural típico, composto pela seqüência arginina, glicina e ácido aspártico (seqüência RGD) que “mimetiza” a seqüência RGD presente em algumas moléculas que interagem com integrinas plaquetárias como, por exemplo, o fibrinogênio (Calvete *et al.* 2005). Estas proteínas são geralmente oriundas do processamento de metaloproteinases da classe P-II, embora recentemente tenham sido encontradas seqüências de cDNA codificantes apenas para disintegrinas (Figura 1; Okuda *et al.* 2002).

Serinoproteinasas

As serinoproteinasas são enzimas expressas em venenos de diversas famílias de serpentes. Apresentam massa molecular variando entre 26 e 67 kDa (dependendo do grau de glicosilação), grande homologia com outras serinoproteinasas como a tripsina, e um sítio ativo que compreende a tríade catalítica: histidina, ácido aspártico e serina (Barret e Rawlings, 1995; Serrano e Maroun, 2005). Embora apresentem entre si uma grande similaridade de seqüência e uma especificidade primária por substrato semelhante à tripsina, as serinoproteinasas de veneno de serpentes diferem drasticamente quanto aos seus substratos macromoleculares (Serrano e Maroun, 2005). A maioria das serinoproteinasas atua na disfunção de processos hemostáticos, agindo diretamente sobre fatores da cascata de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema caliceína-cinina (Serrano e Maroun, 2005).

Fosfolipases A₂

As fosfolipases são enzimas estereolíticas que hidrolisam fosfolipídeos e estão presentes tanto em tecidos e secreções pancreáticas de mamíferos, quanto em venenos animais (Kini, 1997). Estas enzimas desempenham importantes funções em diversos processos fisiológicos como na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, no reparo de membranas, e no auxílio da digestão. São divididas em várias classes, denominadas A₁, A₂, B, C e D, dependendo do sítio de hidrólise na cadeia carbônica dos fosfolipídeos. As fosfolipases do tipo A₂ (PLA₂) são ainda divididas em duas classes: citosólicas e secretadas. As PLA₂ dos venenos de serpentes pertencem a esta última classe. Estas enzimas hidrolisam a cadeia carbônica dos fosfolipídeos na posição do carbono 2. A consequência desta hidrólise é a liberação de ácidos graxos e lisofosfolípides. As PLA₂ são responsáveis por diversos efeitos farmacológicos, como formação de araquidonato, desestruturação de membrana, interferência na agregação plaquetária, miotoxicidade e neurotoxicidade (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Kini, 1997). Estruturalmente as PLA₂ de venenos de serpentes podem ser divididas em dois grupos: I - PLA₂ isoladas dos venenos de

serpentes da família Elapidae e II - PLA₂ dos venenos de viperídeos, cuja estrutura apresenta uma disposição de pontes dissulfeto semelhante àquela verificada em PLA₂ não-pancreáticas de mamíferos (Kini, 1997). Por fim, o grupo II é ainda subdividido em II-A e II-B. O primeiro grupo compreende as PLA₂ com um resíduo de ácido aspártico na posição 49 (PLA₂ D-49) e o segundo apresenta este resíduo substituído por uma lisina na mesma posição (PLA₂ K-49). O resíduo de ácido aspártico na posição 49 coordena a ligação com íons cálcio, um importante co-fator para a catálise. Nas PLA₂ K-49 a atividade catalítica é drasticamente reduzida ou ausente; por outro lado estas enzimas apresentam uma importante atividade miotóxica (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996; Kini, 1997).

Proteínas Secretadas Ricas em Cisteínas (CRISPs)

As CRISPs (do inglês, *Cysteine Rich Secretory Proteins*) compreendem uma classe de proteínas inicialmente encontradas em epidídimo de mamíferos e expressas em uma variedade de organismos, desde invertebrados, como *Drosophila* (Schreiber *et al.* 1997) e *Caenorhabditis elegans* (Ookuma *et al.* 2003) até vertebrados como *Homo sapiens* (Kasahara *et al.* 1989). As CRISPs são proteínas de cadeia única, com massa molecular variando de 20 a 30 kDa e uma grande quantidade de resíduos de cisteína em suas estrutura (uma média de 16 resíduos; destes, 10 estão localizados na porção C-terminal das proteínas), singularidade que dá nome à esta família de proteínas (Yamazaki e Morita, 2004). A principal função reportada para toxinas pertencentes à esta classe é o bloqueio de canais iônicos, como canais de cálcio, por exemplo, comprometendo a atividade de contração da musculatura lisa (Yamazaki *et al.* 2002).

Fatores de crescimento (svNGF e svVEGF)

Fatores de crescimento do endotélio vascular ou de nervo (svVEGF e svNGF, respectivamente) já foram descritos em venenos de serpentes e, embora não sejam componentes majoritários, diversas atividades biológicas destas moléculas já foram

descritas (Kostiza *et al.* 1996; Yamazaki e Morita, 2006). Os svNGFs são classificados em 4 grupos conforme sua organização oligomérica (Kostiza *et al.* 1996): (I) formas diméricas não covalentes, com massa molecular variando de 13 a 25 kDa por subunidade; (II) formas glicosiladas e de alta massa molecular (~35 kDa); (III) formas diméricas, covalentemente ligadas, isoladas dos veneno de *Bungarus multicinctus* e *Bitis arietans* e (IV) formas em que uma das subunidades apresenta atividade arginil-esterase (Kostiza *et al.* 1996). Apesar de serem componentes freqüentemente encontrados no lúmen de glândulas salivares de vertebrados, o papel fisiológico dos NGFs de venenos de serpentes ainda não é bem conhecido.

Os membros da família dos VEGF são proteínas diméricas que se ligam a receptores do tipo tirosina-quinase e estão envolvidos em uma série de processos de neovascularização como vasculogênese e angiogênese (Yamazaki e Morita, 2006). O indício de moléculas semelhantes ao VEGF em veneno de serpentes (svVEGF) foi primeiramente relatado por (Komori e Sugihara, 1990) no veneno da serpente *Vipera aspis*. Estes autores verificaram uma atividade hipotensora da molécula que fora então denominada HF (*Hipotensive Factor*). Mais tarde, a estrutura primária deste fator foi resolvida, e observou-se grande similaridade com proteínas da família dos VEGFs humanos (Komori *et al.* 1999). Junqueira-de-Azevedo *et al.* (2001) a partir de uma biblioteca de cDNA das glândulas de veneno da serpente *Bothrops insularis* clonaram e expressaram uma forma ativa de svVEGF capaz de promover um aumento da permeabilidade vascular. Assim, acredita-se que os svVEGFs atuem potencializando a atividade de outros componentes tóxicos dos venenos, bem como sendo coadjuvantes da atividade hipotensora verificada em alguns venenos.

Lectinas tipo C

As lectinas tipo C têm esta designação por pertencerem a uma família de lectinas que requerem íons cálcio para sua interação com glicoconjugados. Estas moléculas apresentam uma conformação típica em sua estrutura (um *loop*) cujos resíduos coordenam a ligação com íons cálcio (Drikamer, 1988). A maioria das lectinas encontrada em venenos de serpentes não apresenta o *loop* de ligação com o

cálcio e nem todas se ligam a carboidratos (Clemetson *et al.* 2001), sendo portanto chamadas de moléculas tipo-lectina (*lectin-like proteins*). Geralmente as lectinas tipo C são homodímeros covalentes, apresentando massa molecular aproximada de 30 kDa. Estas proteínas estão envolvidas principalmente nas alterações de processos hemostáticos decorrentes do envenenamento, interagindo principalmente com receptores plaquetários e/ou fatores da cascata de coagulação sanguínea (Zingali *et al.* 2001).

Peptídeos potenciadores de bradicinina e peptídeo natriurético tipo C

Peptídeos potenciadores de bradicinina (do inglês, *Bradykinin Potentiating Peptides* - BPPs) são oligopeptídeos ricos em prolina, constituídos de 5 a 14 aminoácidos (Ianzer *et al.* 2004). Estes peptídeos foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina (ECA) descritos, tendo sido isolados do veneno de *B. jararaca* (Ferreira *et al.* 1970). A estrutura do precursor destes peptídeos vasoativos é singular e foi descrita por Murayama e colaboradores (1997): compreende 7 BPPs organizados em *tandem*, bem como um peptídeo natriurético tipo-C e uma região rica em histidinas e glicinas (pHpG). Os peptídeos natriuréticos do tipo C apresentam estrutura similar a peptídeos natriuréticos do tipo A e B de mamíferos (que são hormônios peptídicos liberados por células do tecido cardíaco em resposta a eventos de sobrecarga cardíaca) e atuam sobre o tônus vascular, mediando processos de vasodilatação (Lee e Burnett-Jr, 2007). Hayashi *et al.* (2003) identificaram e clonaram um precursor do peptídeo natriurético tipo C do cérebro da serpente *B. jararaca* (Hayashi *et al.* 2003). De acordo com estes autores, a tradução da seqüência nucleotídica deste precursor apresenta ainda 7 BPPs organizados em *tandem*, de forma similar àquela verificada no precursor dos BPPs descrito por Murayama *et al.* (1997) na glândula de veneno de *B. jararaca*. A hipotensão freqüentemente verificada após o envenenamento botrópico é em grande parte decorrente da ação inibitória destes peptídeos vasoativos (BPPs) sobre a ECA, característica que impede a geração do peptídeo vasoconstritor angiotensina II e inativação do peptídeo hipotensor, a bradicinina.

1.2 A variabilidade nos venenos de serpentes

A variabilidade na composição de venenos de serpentes é um fenômeno ubíquo em todos os níveis taxonômicos e pode ter um impacto tanto na pesquisa básica como no tratamento nos casos de acidentes ofídicos, incluindo a seleção dos soros anti-ofídicos e também a seleção de espécimes para a produção dos soros anti-ofídicos. A variabilidade nos venenos ofídicos pode ser observada em vários níveis, tais como: ontogenético, sexual, geográfico, inter-específico e intra-específico (Chippaux *et al.* 1991). Alterações ontogenéticas nos venenos estão presentes na maioria das pesquisas que versam sobre variabilidade (Gutiérrez *et al.* 1990; Gutiérrez *et al.* 1991; Chaves *et al.* 1992; Mackessy, 1993; Daltry *et al.* 1996; López-Lozano *et al.* 2002; Saravia *et al.* 2002; Mackessy *et al.* 2003; Saldarriaga *et al.* 2003; Mackessy *et al.* 2006; Alape-Gíron *et al.* 2008) e as suas implicações permitem a elaboração das mais diversas hipóteses que, além de contribuírem para o entendimento da diversidade e complexidade dos venenos, constituem dados importantes para estudos sobre a biologia, incluindo a evolução das toxinas presentes nos venenos das espécies estudadas. Mackessy (1993) observou expressivas alterações em proteases fibrinogenolíticas presentes no veneno de exemplares juvenis e adultos de *Crotalus viridis oreganus*. Gutiérrez *et al.* (1990) reportaram a variação ontogenética em algumas atividades biológicas e bioquímicas do veneno de *Lachesis muta stenophrys*, sobretudo com relação à letalidade e à atividade proteolítica, que se mostraram mais intensas no veneno dos animais adultos. Saldarriaga *et al.* (2003) relataram maior atividade coagulante nos venenos de exemplares jovens de *B. asper* e *B. atrox* da Colômbia. Resultados semelhantes foram reportados por López-Lozano *et al.* (2002) em análise da atividade coagulante de venenos de jovens e adultos de *B. atrox* da Amazônia.

Neste contexto, a dieta exerce uma importante influência na composição dos venenos e diversidade de toxinas neles presentes (Li *et al.* 2005a; Li *et al.* 2005b; Alape-Gíron *et al.* 2008). Exemplos clássicos da influência da dieta na composição dos venenos de serpentes são os resultados reportados por Li *et al.* (2005a) e Li *et al.* (2005b). Nestes trabalhos os autores mostraram que a serpente aquática *Aipysurus*

eydouxii (Elapidae, Hydrophiinae) apresenta uma deleção nucleotídica no gene que codifica para uma neurotoxina de três dígitos do seu veneno (*three finger neurotoxin* – 3FTx), bem como diversas substituições em regiões altamente conservadas de genes codificantes para fosfolipases A2 (PLA2) (Li *et al.* 2005a e Li *et al.* 2005b, respectivamente). As implicações biológicas destes achados se refletem na quase inexistente atividade destas toxinas no veneno desta espécie. Conforme os autores, esta característica se deve ao fato desta espécie ter mudado a sua dieta (há milhares de anos) para *exclusivamente* ovos de peixes ao invés de peixes, como fazem outras espécies simpátricas como *A. laevis*. Assim, segundo os autores, a ausência de pressão seletiva sobre os genes codificantes para PLA2s e 3FTXs levou a um acúmulo de mutações nas regiões codificantes dos genes destas toxinas, o que em última instância resultou na perda das suas atividades biológicas no veneno de *A. eyouxii*.

A dieta apresenta uma influência importante na composição e atividade de proteínas relacionadas com processos digestivos em diversos grupos de vertebrados, como peixes por exemplo. Um interessante exemplo desta influência foi reportado por Gawlicka e Horn (2006) em peixes da família Stichaeidae. Estes autores monitoraram a expressão ontogenética do gene de tripsina em peixes herbívoros e carnívoros que foram submetidos a diferentes dietas. Conforme os autores, a expressão do gene de tripsina aumentou durante a ontogenia independente dos hábitos alimentares dos animais. Contudo, quando submetidos a uma dieta rica em proteínas, apenas as espécies carnívoras apresentaram uma expressão pronunciada no gene de tripsina, bem como um aumento da atividade tripsínica.

Nas serpentes venenosas, não apenas modificações nos venenos são responsáveis pela diversidade de formas de subjugação das presas. Estruturas relacionadas a alimentação são também alvos de intensa pressão seletiva, uma vez que respondem pela apreensão e sucesso na subjugação de presas. Aubret *et al.* (2004), demonstraram a variabilidade de tamanho da mandíbula e do crânio de grupos experimentais da serpente *Notechis scutatus* (Elapidae) submetidos desde o nascimento a alimentação com presas de diferentes tamanhos. Conforme os autores,

o aumento no tamanho da mandíbula e do crânio são reflexos da plasticidade adaptativa apresentada por estes animais frente às diferentes presas.

Dentre os viperídeos neotropicais pertencentes ao gênero *Bothrops*, uma importante característica morfológica tem estreitas relações com a variabilidade ontogenética de dieta: a ponta da cauda dos filhotes e indivíduos jovens tem coloração branca e, quando agitada em movimentos repetitivos, mimetiza uma pequena larva. Esta estratégia é conhecida como engodo caudal (*Caudal luring*) e é utilizada pelos animais juvenis para “enganar” suas presas típicas (pequenos anfíbios e lagartos) que são subjugados ao se aproximarem da cauda das serpentes juvenis (Martins *et al.* 2002). Essa característica morfológica é perdida quando os animais atingem a idade adulta. A Figura 2 apresenta esta característica em filhotes de jararaca.

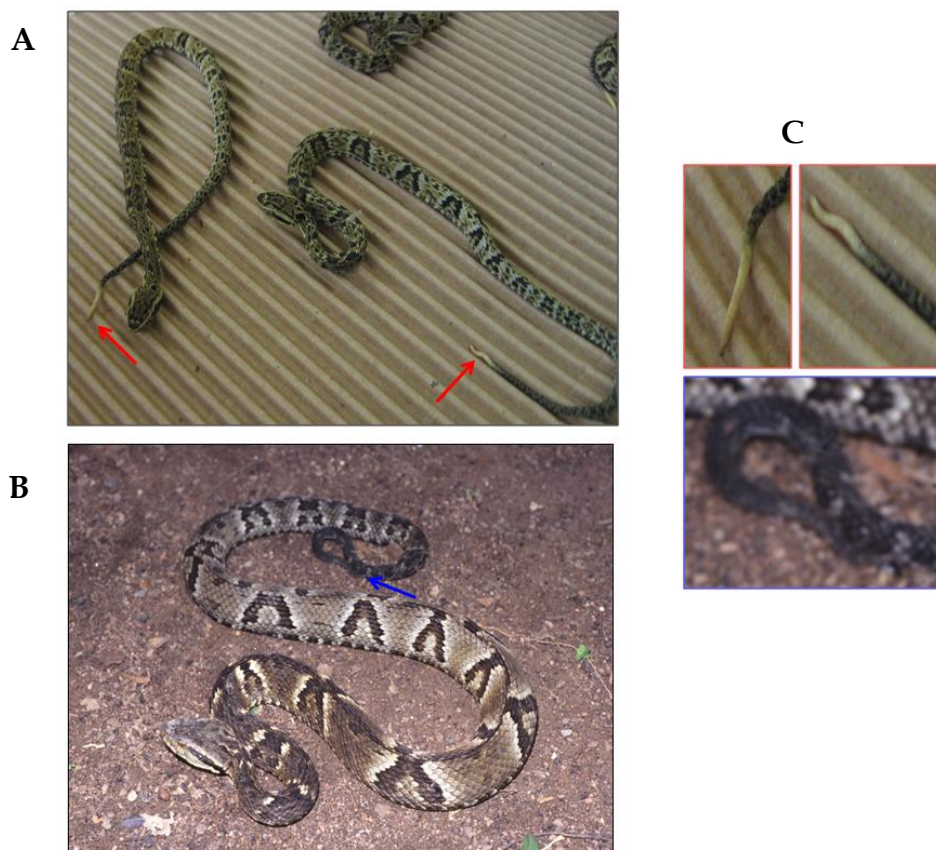


Figura 2: Coloração caudal característica de filhotes (A) e adultos (B) de *B. jararaca*. Uma ampliação da região das caudas (indicada pelas setas em A e B) está apresentada em C. Fotos Alexandre K. Tashima (A) e Otavio Marques (B).

Assim, é possível perceber que a variabilidade verificada nos venenos de serpentes está relacionada com uma série de fatores bióticos e abióticos e, neste contexto, a dieta é um dos fatores de maior influência.

1.3 O veneno da *Bothrops jararaca*

No Brasil, a espécie *Bothrops jararaca* distribui-se desde o Sudeste da Bahia até a porção nordeste do Rio Grande do Sul, ocupando uma diversidade de habitats, desde mata atlântica até regiões abertas e áridas, com domínios predominantemente de cerrado (Campbell e Lamar, 1989). Desta forma, *B. jararaca* é uma das espécies de serpentes brasileiras de mais ampla distribuição geográfica. Um reflexo direto dessa vasta distribuição geográfica é que cerca de 90% dos acidentes ofídicos ocorridos na área de abrangência de *B. jararaca* são de fato causados por esta espécie em detrimento a outras espécies do mesmo gênero (Ribeiro e Jorge, 1997; Santoro *et al.* 2008). Embora seja considerada uma espécie generalista, isto é, apresenta uma diversidade de itens alimentares na sua dieta, uma marcante variabilidade ontogenética é reportada para esta espécie, que se alimenta de ectotérmicos na fase juvenil de vida (artrópodes, pequenos anfíbios e lagartos) e de endotérmicos (preferencialmente mamíferos) na fase adulta (Sazima, 1992; Marques *et al.* 2001; Martins *et al.* 2002).

O veneno da *B. jararaca* induz um complexo quadro patológico, caracterizado por efeitos locais e sistêmicos como edema, mionecrose, hemorragia, desfibrinogenação, choque e nefrotoxicidade. A quantidade de toxinas isoladas do veneno desta espécie supera a de qualquer outra espécie do mesmo gênero e é também decorrente de sua importância na saúde pública. A intensa capacidade deste veneno de atuar sobre componentes responsáveis pela manutenção da hemostasia levou diversos grupos ao isolamento e caracterização destas toxinas, no intuito de melhor entender a fisiopatologia dos acidentes, bem como identificar os alvos moleculares das respectivas toxinas. A Tabela 1 apresenta as toxinas isoladas do veneno desta espécie até o ano de 2010 e que apresentam atividade sobre componentes do sistema hemostático.

Tabela 1: Toxinas isoladas do veneno de *B. jararaca* com atuação sobre a hemostasia.

Toxina	Classe	Atividade biológica	Referência
Bothrombina	SP	Atividade coagulante (liberação do fibrinopeptídeo A) sem efeito direto sobre plaquetas a menos que haja presença de fibrinogênio	Nishida <i>et al.</i> (1994)
Bothrops protease A	SP	Atividades amidolítica e fibrinogenolítica (<i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>)	Mandelbaum e Henriques (1964); Murayama <i>et al.</i> (2003) e Paes-Leme <i>et al.</i> (2008)
TL-BJ	SP	Atividade coagulante (liberação do fibrinopeptídeo A) sobre plasma e fibrinogênio	Serrano <i>et al.</i> (2000)
KN-BJ	SP	Liberação de bradicinina do cininogênio bovino de baixo peso molecular e atividade coagulante (liberação do fibrinopeptídeo A)	Serrano <i>et al.</i> (1998)
PA-BJ	SP	Indução da agregação plaquetária pela interação com os receptores plaquetários PAR1 e PAR4	Serrano <i>et al.</i> (1995) e Santos <i>et al.</i> (2000)
Bothropasina	MP (PIIIb)	Hemorragia	Mandelbaum <i>et al.</i> (1982)
Jararhaginaa	MP (PIIIb)	Hemorragia	Paine <i>et al.</i> (1992)
HF1	MP (PIII)	Hemorragia	Assakura <i>et al.</i> (1986)
HF2	MP (PIII)	Hemorragia	Assakura <i>et al.</i> (1986)
HF3	MP (PIII)	Hemorragia	Assakura <i>et al.</i> (1986), Silva <i>et al.</i> , (2004); Oliveira <i>et al.</i> (2009) e Oliveira <i>et al.</i> (2010)

Jararafibrase I	MP (PIII)	Hemorragia e fibrinólise <i>in vitro</i>	Maruyama <i>et al.</i> (1992)
Jararafibrase II, III, IV	MP(PII)	Hemorragia e fibrinólise <i>in vitro</i>	Maruyama <i>et al.</i> (1992) e Maruyama <i>et al.</i> (1993)
J proteinase	MP (PII)	Atividade caseinolítica	Tanizaki <i>et al.</i> (1989)
Bothrojaractivase	MP (PII)	Ativação do fator II da cascata de coagulação sanguínea e fibrinólise <i>in vitro</i>	Berger <i>et al.</i> (2008)
Bothrostatina	MP (PII)	Inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno	Fernandez <i>et al.</i> (2005)
Bothrojaracina	LtC	Bloqueio da atividade da trombina sobre o fibrinogênio, bem como da ativação plaquetária mediada por fibrinogênio	Zingali <i>et al.</i> (1993)
Bothrocetina	LtC	Indução da agregação plaquetária pela interação com o fator de von Willebrand	Brinkhous <i>et al.</i> (1981)
Jararaca GPIb-BP	LtC	Inibição da agregação plaquetária pela interação com a glicoproteína plaquetária Ib	Fujimura <i>et al.</i> (1995)
BJ-PLA2	PLA2	Indução de agregação plaquetária	Serrano <i>et al.</i> (1999)
NPP-BJ	NT	Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP	Santoro <i>et al.</i> (2009)

Legenda: LtC –Lectina tipo C; MP – Metaloproteinase; PLA2- Fosfolipase A₂; SP- Serinoproteinase; P(II) – Metaloproteinase da classe P-II; P(III) – Metaloproteinase da classe P-III; NT nucleotidase.

Um dos primeiros relatos da grande diferença quanto à atividade coagulante do veneno de filhotes e adultos da espécie *B. jararaca* foi feito por Roselfeld e colaboradores (1959), onde se verificou uma maior atividade coagulante para o veneno de filhotes. Ribeiro e Jorge (1989) e Kamiguti *et al.* (1986) reportaram a diferença no tempo de coagulação em pacientes picados por filhotes de *B. jararaca* em relação àqueles picados por adultos desta espécie. Furtado *et al.* (1991), observaram expressivas diferenças nas atividades de ativação dos Fatores II e X da cascata de coagulação sanguínea, que se mostraram pronunciadas nos venenos dos filhotes de algumas espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*. Nesse estudo, os autores verificaram que o veneno de filhotes da espécie *B. jararaca* apresentou um valor 12 vezes maior para a atividade coagulante sobre o plasma quando comparado com o veneno dos adultos desta mesma espécie.

Embora a elevada atividade coagulante verificada para o veneno de filhotes de *B. jararaca* seja reconhecidamente um registro antigo na literatura toxicológica, a atribuição desta atividade à presença de uma classe de toxina específica ainda não foi reportada.

1.4 Metodologias “ômicas” em toxicologia

A utilização de metodologias do tipo *high throughput* tem um papel fundamental no estudo de sistemas e amostras complexas: permite análises bioquímicas em uma escala incomparavelmente maior do que métodos tradicionais de isolamento e identificação de biomoléculas, como proteínas, DNA/RNA, por exemplo, além de serem capazes de representar um panorama global de processos fisiopatológicos (Mann e Kelleher, 2008; Cloonan e Grimmond, 2008; Yates *et al.* 2009; Zhong *et al.* 2009; Mitchell, 2010).

Na última década a utilização de técnicas de sufixo “oma” em toxicologia tem se intensificado e possibilitado o entendimento da complexidade dos proteomas dos venenos de espécies de diversas famílias, bem como do transcriptoma de glândulas

de veneno (Fox e Serrano, 2008b). Utilizando a metodologia de análise transcriptômica por meio de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) descrita por Adams e colaboradores (1991) Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002) foram os primeiros pesquisadores a explorar a diversidade de transcritos da glândula de veneno da espécie *Bothrops insularis* por meio de análise transcriptômica. Desde então, diversas espécies já tiveram os transcriptomas de suas glândulas de veneno revelados. A Tabela 2 apresenta as espécies cujos transcriptomas das glândulas de veneno já foram analisados.

Tabela 2: Transcriptomas de glândulas de venenos de serpentes publicados até o momento*.

Espécie	Família	Referência
<i>Crotalus adamanteus</i>	Viperidae	Rokyta <i>et al.</i> (2011).
<i>Bungarus multicinctus</i> e <i>Naja atra</i>	Elapidae	Jiang <i>et al.</i> (2011).
<i>Drysdalia coronoides</i>	Elapidae	Chatrath <i>et al.</i> (2011).
<i>Bothrops alternatus</i>	Viperidae	Cardoso <i>et al.</i> (2010).
<i>Bungarus flaviceps</i>	Elapidae	Siang <i>et al.</i> (2010).
<i>Cerberus rynchops</i>	Colubridae	OmPraba <i>et al.</i> (2010).
<i>Echis pyramidum leakeyi</i> , <i>E. coloratus</i> e <i>E. carinatus sochureki</i>	Viperidae	Casewell <i>et al.</i> (2009).
<i>Bothrops atrox</i>	Viperidae	Neiva <i>et al.</i> (2009).
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	Viperidae	Boldrini-França <i>et al.</i> (2009).
<i>Micrurus corallinus</i>	Elapidae	Leão <i>et al.</i> (2008).
<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	Viperidae	Pahari <i>et al.</i> (2007).
<i>Bothrops jararaca</i>	Viperidae	Cidade <i>et al.</i> (2006).
<i>Philodryas olfersii</i>	Colubridae	Ching <i>et al.</i> (2006).
<i>Echis ocellatus</i>	Viperidae	Wagstaff <i>et al.</i> (2006).
<i>Agkistrodon acutus</i>	Viperidae	Qinghua <i>et al.</i> (2006).
<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Viperidae	Zhang <i>et al.</i> (2006).
<i>Lachesis muta</i>	Viperidae	Junqueira-de-Azevedo <i>et al.</i> (2006).
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Elapidae	St. Pierre <i>et al.</i> (2005).
<i>Bothrops jararacussu</i>	Viperidae	Kashima <i>et al.</i> (2004)
<i>Bitis gabonica</i>	Viperidae	Francischetti <i>et al.</i> (2004).
<i>Bothrops insularis</i>	Viperidae	Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002).

*Fevereiro de 2011.

Conforme análise da Tabela 2 é possível perceber que mais de um terço dos trabalhos foram publicados nos últimos 2 anos. Com o advento dos seqüenciadores de última geração (Margulies *et al.* 2005), capazes de analisar dezenas de milhares de seqüências num intervalo de tempo expressivamente menor que os seqüenciadores que empregam o método de terminação de cadeia descrito por Frederick Sanger (Sanger *et al.* 1977), espera-se um aumento ainda maior no número transcriptomas de glândulas de veneno estudados, bem como a possibilidade do descobrimento de novas toxinas, baseado na descoberta de transcritos pouco expressos (raros) nas glândulas de veneno. Recentemente Rokyta *et al.* (2011) reportaram a utilização de um seqüenciador de última geração no estudo do transcriptoma de glândula de veneno da serpente *Crotalus adamanteus*.

A estratégia de seqüenciamento de bibliotecas de cDNA no intuito de se obter um cenário da expressão gênica e da diversidade de toxinas na glândulas das diferentes espécies é de extrema importância na toxinologia. Contudo, a despeito da importância dos resultados encontrados, características importantes das proteínas contidas nos venenos permanecem desconhecidas a menos que se tenha, adicionalmente, dados acerca dos respectivos proteomas. Um exemplo desta situação são as modificações químicas sofridas pelas proteínas após sua síntese nas células eucarióticas. Muito embora modificações pós-traducionais possam ser previstas para uma proteína cuja estrutura primária foi deduzida a partir da análise do transcrito correspondente, sua complexidade e extensão só se tornam aparentes por meio de análises do proteoma.

Nos últimos anos diversos autores têm concentrado seus esforços na utilização de técnicas complementares em transcriptômica/proteômica no intuito de se obter um panorama que melhor represente os venenos das espécies estudadas (Ching *et al.* 2006; Valente *et al.* 2009; Chartrath *et al.* 2010; OmPrada *et al.* 2010). Embora os venenos de serpentes sejam compostos por poucas classes de toxinas, uma dificuldade técnica frequentemente reportada nos estudos proteômicos é a baixa quantidade de seqüências de proteínas de venenos de serpentes nos bancos de dados atuais (Calvete *et al.* 2007; Fox e Serrano, 2008b). Por este motivo, a

interpretação manual dos espectros de massas correspondentes a peptídeos de veneno de serpentes é frequentemente adotada por pesquisadores na área de toxinologia (Calvete *et al.* 2007; Calvete *et al.* 2009). A Tabela 3 apresenta um levantamento recente do número de entradas (seqüências de proteínas) correspondentes a proteínas de serpentes e proteínas de venenos de serpentes disponíveis em dois dos bancos de dados mais utilizados em proteômica: o banco “não–redundante” do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Estados Unidos) e o *Universal Protein Resource Knowledgebase* (UniProtKB, uma colaboração entre institutos de pesquisa do Reino Unido, Suíça e Estados Unidos).

Tabela 3: Número de entradas (seqüências de proteínas) correspondentes a proteínas de serpentes ou veneno de serpentes presentes nos bancos de dados NCBI e UniProtKB.

Identificador ¹	Banco de dados	
	NCBI ²	UniProtKB ³
Serpentes	23 837	14 172 (1979)
<i>Snake venom</i>	3401	1707 (1240)

¹Palavra-chave utilizada na busca

²www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/

³www.uniprot.org/downloads. O UniProtKB compreende uma compilação de dois grandes bancos: o TrEMBL e o Swiss-Prot. Os valores representam o número de sequencias cuja anotação é automática e não revisada (*TrEMBL database*); Os valores entre parênteses representam o número de seqüências cuja anotação é manual e revisada (*Swiss-Prot database*).

(Acesso em 01/02/2011).

Embora não figure na Tabela 3, quando o identificador utilizado é a palavra “Serpentes” a maioria das proteínas presentes nos bancos de dados analisados não são correspondentes à toxinas e sim à outras proteínas de serpentes como hemoglobina, citocromo C, proteínas envolvidas em processos metabólicos, entre outras. Um refinamento da busca utilizando a palavra “*snake venom*” resulta em pouco mais de 3000 entradas no NCBI e quase 2000 no UniProtKB. Esse baixo número, em comparação com aquele verificado para “espécies-modelo” da ciência como invertebrados (*Drosophila melanogaster*, 149.583 seqüências- NCBI; 53.814 seqüências -UniProtKB), camundongos (*Mus musculus*, 262.931 seqüências-NCBI;

69.397 seqüências- UniProtKB) e o chimpanzé (*Pan troglodytes*, 58. 970 seqüências-NCBI; 46.198 seqüências-UniProtKB), associado ao desconhecimento do genoma completo de alguma espécie de serpente, denota a importância de estudos referentes ao transcriptoma da glândula de veneno, bem como do proteoma dos correspondentes venenos.

Como regra geral na toxinologia, a exploração do conteúdo dos venenos de serpentes tem sido realizada com *pools* de venenos obtidos de espécimes adultos, fato que aponta para o desconhecimento do conteúdo proteômico dos venenos de filhotes e para a possibilidade de descobrimento de novas toxinas nesses venenos. Desta forma, no contexto do tema apresentado, abordagens complementares em proteômica/transcriptômica associadas a técnicas tradicionais de química de proteínas e ensaios biológicos, podem evidenciar possíveis diferenças qualitativas ou quantitativas nos venenos de filhotes e adultos, fornecendo subsídios para o entendimento da variabilidade ontogenética molecular verificada nesta espécie e em venenos de outras espécies do mesmo gênero e/ou família (Viperidae), além de possibilitar o descobrimento de novas toxinas, cuja expressão seja ontogeneticamente regulada.

2. Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi analisar a variabilidade do veneno de *B. jararaca*, com enfoque voltado para toxinas diferencialmente expressas em duas fases de vida dos animais (filhotes e adultos). Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Analisar o proteoma, peptidoma e glicoproteoma dos venenos de filhotes e adultos por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas;
- Evidenciar diferenças no padrão de expressão de toxinas e composição dos venenos em duas fases de vida dos animais a partir da geração e identificação de um banco de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) de filhotes e de adultos;
- Avaliar as atividades hemorrágica, letal, proteolítica e coagulante dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

3. Material e Métodos

Todos os ensaios envolvendo animais, bem como a extração das glândulas de veneno, tiveram a autorização prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB - processo n° 377/2007).

Ao longo deste projeto utilizamos diferentes estratégias experimentais no intuito de vislumbrar diversos aspectos da variabilidade do veneno de *B. jararaca*. A Figura 3 ilustra de forma geral o delineamento experimental utilizado neste projeto.

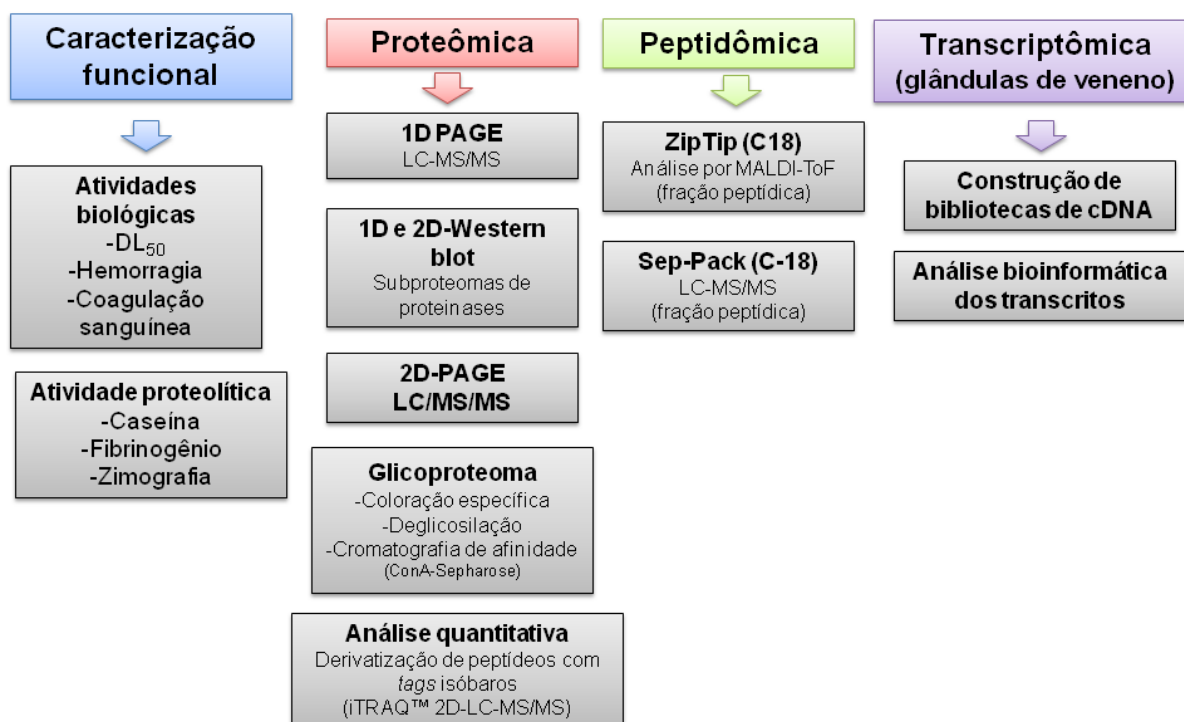


Figura 3: Delineamento experimental utilizado neste projeto para explorar a variabilidade do veneno de *B. jararaca*.

3.1 Obtenção dos venenos e glândulas de filhotes e adultos de *B. jararaca*

A Figura 4 ilustra o processo de extração de veneno e glândulas de exemplares de *B. jararaca* que foram utilizados neste estudo.

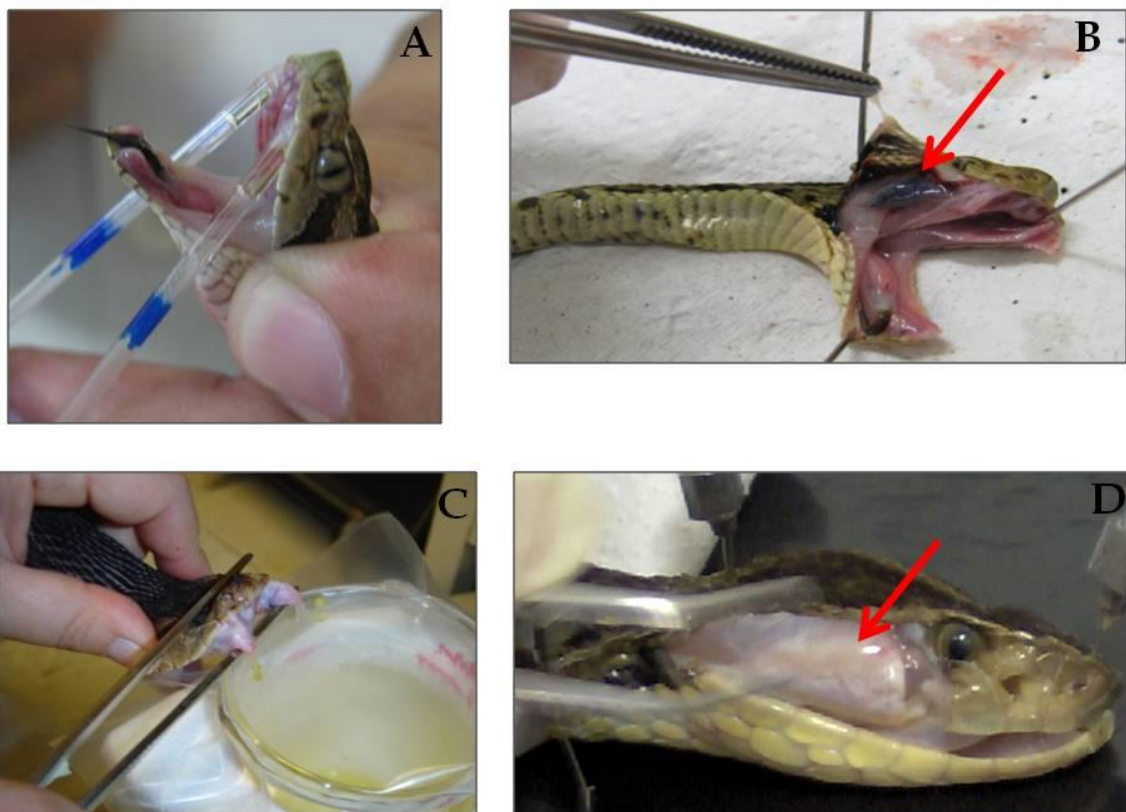


Figura 4: Extração de veneno e glândulas de filhotes (A e B, respectivamente) e adultos (C e D, respectivamente) de *B. jararaca*. A seta vermelha indica a posição das glândulas de veneno de filhotes e adultos. (Fotos: Alexandre K. Tashima e Silva Regina Travaglia-Cardoso).

3.1.1 Venenos

A extração dos venenos de adultos e filhotes de *B. jararaca* ocorreu nos meses de Dezembro de 2006 a Abril de 2007. Nestes meses o número de animais que chega à Recepção de Serpentes do Instituto Butantan é relativamente elevado em relação a outros meses do ano, bem como representa a época propícia (majoritariamente verão) para o nascimento de filhotes da espécie (Travaglia-Cardoso, 2000). A extração dos venenos procedeu-se da seguinte forma:

Adultos – 110 animais adultos, todos maiores de 3 anos, sendo 49 machos e 61 fêmeas (animais mantidos em cativeiro no biotério de serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan). As serpentes foram anestesiadas com auxílio de gás carbônico (CO₂), para realização de extrações dos venenos, segundo Biasi *et al.* (1976).

Filhotes – 694 filhotes, sendo 359 machos e 335 fêmeas, com até duas semanas de idade, tiveram seus venenos extraídos. Os animais foram procedentes de fêmeas prenhes, de diferentes regiões do Estado de São Paulo e de fêmeas mantidas em cativeiro no biotério de serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Inicialmente os animais foram anestesiados com o auxílio de gás carbônico e, em seguida, o veneno foi extraído com o auxílio de capilares de vidro.

Após coletadas, as amostras de veneno foram centrifugadas a 2000 x g, 4°C, por 30 minutos, para remoção do muco salivar, bem como presas ou escamas que eventualmente estivessem presentes no veneno extraído. Após este processo os venenos foram liofilizados e acondicionados à temperatura de -20°C até o momento do uso.

Considerando o número de animais cujos venenos foram extraídos e a massa do veneno seco (após a liofilização), obtivemos uma média de 1,5 mg de veneno por animal no caso dos filhotes e 130,2 mg/animal no caso dos adultos.

Dado o maior volume de veneno produzido pelos animais adultos, após a liofilização foram preparadas três amostras que foram utilizadas neste estudo para designar o veneno dos animais adultos:

- (1) Um *pool* de veneno de fêmeas adultas (n=61);
- (2) Um *pool* de veneno machos adultos (n=49);
- (3) Um *pool* de adultos (uma mistura de ambos os sexos; n=110).

3.1.2 Glândulas

Os exemplares da serpente *B. jararaca* foram cedidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Foram utilizados ao todo 32 animais, sendo 12

animais adultos (6 machos e 6 fêmeas) e 20 filhotes (10 machos e 10 fêmeas). Os exemplares foram todos provenientes do Estado de São Paulo. Os adultos tinham 3 anos de idade e os filhotes 18 dias de vida. Os animais foram mantidos no biotério de serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

As glândulas foram retiradas seguindo o critério utilizado por Junqueira-deAzevedo e Ho (2002): 4 dias após a extração do veneno. Este procedimento visou estimular a síntese protéica na glândula, garantindo alta produção de mRNA. Após o tempo estipulado (4 dias), os animais foram anestesiados com gás carbônico e sacrificados por decapitação para retirada das glândulas. Ambas as glândulas desses animais foram imediatamente congeladas e estocadas em nitrogênio líquido.

3.2 Análise proteômica

3.2.1. Quantificação de proteínas

Os venenos foram ressuspensos em água MilliQ® em banho de gelo e a quantificação de proteínas foi realizada com diferentes concentrações, em triplicata, utilizando o reagente de Bradford (Bradford, 1976) adquirido da Sigma. Para estimar o teor protéico das amostras foi utilizada uma curva padrão, construída com concentrações crescentes de soroalbumina bovina (Sigma) em água MilliQ®.

3.2.2 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, zimografia, eletroforese bidimensional e *Western-blot* bidimensional

A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), utilizando mini-géis de 10 cm x 8 cm x 1,0 mm em cuba miniVE (GE Healthcare) ou, alternativamente, géis de 20 cm x 26 cm x 1,5 mm (Ettan DatSix, GE Healthcare). Para os experimentos de eletroforese bidimensional foi utilizado o sistema da GE Healthcare, composto dos módulos

IPGphor (1^a. dimensão, focalização isoeétrica) e EttanDaltSix (2^a. dimensão, eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida), segundo procedimento descrito por Serrano *et al.* (2005):

A. Focalização isoeétrica (1^a. dimensão): Para a isoeletrofocalização das proteínas foram utilizadas fitas de gradiente de pH imobilizado (*IPG strips*, GE Healthcare) de 7cm ou 24cm. As fitas com pH variando de 3 a 10 (ou alternativamente pH 4 a 7) foram reidratadas com a solução de veneno em água MilliQ[®] para um volume final de 450 μ L (fitas de 24 cm) ou, alternativamente 125 μ L (para fitas de 7 cm) utilizando o reagente *Destreak solution*[®] (GE Healthcare) acrescido de 1% de solução de anfólitos (*IPG buffer*, GE Healthcare). Após esta etapa, as soluções foram incubadas em um sonificador por 10 min e depositadas nas canaletas da cuba de reidratação. Em seguida, as fitas foram cobertas com óleo mineral e deixadas em repouso para reidratação a temperatura ambiente por 18 h. Após a remoção do excesso de óleo mineral, as fitas foram montadas na cuba de focalização isoeétrica IPGPhor (GE Healthcare), cobertas novamente com óleo mineral e submetidas à focalização isoeétrica a 20 °C, segundo o programa especificado na Tabela 4:

Tabela 4: Protocolo de focalização isoeétrica utilizado para fitas de 24 cm.

Etapa*	Voltagem (V)	Tempo (h)
1	30	6
2	150	2
3	350	1
4	500	1
5	1000	1
6	3000	1
7	5000	13

*Para as fitas de 7 cm utilizamos o programa de gradiente de voltagem constituído de três etapas: 500V a 0,01 kV/h; 4000V a 3,4 kV/h e 5000V a 4,6 kV/h.

B. Equilíbrio das fitas e eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (2^a dimensão): Após a eletrofocalização, o excesso de óleo mineral foi removido das fitas e estas foram colocadas em tubos plásticos para a etapa de equilíbrio. A seguir, as proteínas focalizadas foram reduzidas e alquiladas por meio de incubações no tampão de

equilíbrio (TE: Tris-HCl 0,05 M, pH 8,8, SDS 2%; glicerol 30%, uréia 6 M, azul de bromofenol 0,002%) contendo DTT 20 mg/mL (por 12 min, sob agitação) e, em seguida (por 10 min, sob agitação) no TE contendo iodoacetamida 30 mg/mL. Para iniciar a segunda dimensão, as fitas foram colocadas diretamente sobre a parte superior de géis de SDS-poliacrilamida (12%). Os géis (20 cm x 26 cm x 1,5 mm) de SDS-poliacrilamida foram preparados utilizando o sistema de *gel caster* (GE Healthcare). Para estes géis a eletroforese ocorreu à temperatura de 10 °C, a 25W por gel. Para os géis pequenos (10 cm x 8 cm x 1,0 mm) a corrida ocorreu à temperatura ambiente, utilizando voltagem de 150 V e corrente de 40 mA por gel.

Para ambos os sistemas de eletroforese utilizados para a 2ª dimensão, a corrida foi interrompida quando o corante migrou aproximadamente 90% do comprimento do gel. Os géis foram corados com nitrato de prata seguindo o método de (Mortz *et al.* 2001) ou alternativamente com Coomassie Brilliant Blue R-250 (GE Healthcare) ou, para visualização de glicoproteínas, com o corante fluorescente ProQ-Emerald® (Invitrogen) conforme especificações recomendadas pelo fabricante.

Todos os géis bidimensionais foram analisados em triplicata, para se verificar a reprodutibilidade das análises.

C. *Western-blot bidimensional e revelação com anticorpos*: A visualização dos subproteomas de metaloproteinases e serinoproteinases das amostras de veneno de *B. jararaca* se deu com a utilização de imunocoloração com anticorpos policlonais distintos: anti-bothropasina (uma metaloproteinase da classe P-IIIb do veneno de *B. jararaca*) e anti-moojeni serinoproteinase 1 e 2 (um anticorpo policlonal preparado com duas serinoproteinases - MSP1 e MSP2 - isoladas da serpente *Bothrops moojeni*) e o soro anti-botrópico produzido pelo Instituto Butantan (lote 0610188), produzido pela imunização de cavalos com uma mistura de venenos de adultos das seguintes espécies: *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12,5%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%), *B. neuwiedi* (6,25%) (sinônimos *B. n. goyazensis*, *B. n. meridionalis*, *B. n. paranaensis* e *B. n. urutu*) e *B. pauloensis* (6,25%).

Após as corridas nas duas dimensões as proteínas foram transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em uma cuba

miniVE preenchida com tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,037%). A transferência ocorreu sob voltagem fixa de 20V por 18 horas. Após este período, as membranas foram imersas em uma solução 0,5% de Vermelho de Ponceau em ácido acético 1%, para se verificar a correta transferência das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas com água destilada e imersas em uma solução de leite desnatado (5% em PBS 0,05M) por 30 min, sob agitação.

Os anticorpos primários (policlonais, preparados em coelhos; ou, alternativamente, preparado em cavalos no caso do soro anti-botrópico.) foram adicionados seguindo a diluição de 1:500 em uma solução de PBS 0,05M contendo Tween 0,1%. As membranas foram incubadas por uma hora nesta solução, sob agitação. Em seguida, foram lavadas por 30 min com uma solução de PBS 0,05M contendo Tween 0,1%. Finalmente, foi adicionado o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cavalo conjugada à peroxidase) na diluição de 1:1000 em solução de PBS 0,05M contendo Tween 0,1% e as membranas foram imersas nesta solução por uma hora. A revelação se deu com a adição da solução de 4-cloro-1-naftol (Sigma) em Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM pH 7,5 e 0,5% de peróxido de hidrogênio.

D. Zimografia: A zimografia foi realizada para se evidenciar, nas amostras de veneno, a presença de proteinases com atividade sobre gelatina (um substrato copolimerizado ao gel de SDS-poliacrilamida). Foi utilizado o método descrito por Heussen e Dowdle (1980) com algumas modificações. Para este ensaio, foram utilizados géis (10 cm x 8 cm x 1,0 mm) na concentração de 12% de poliácridamida, contendo gelatina (na concentração final de 1 mg/ml). Neste ensaio as proteínas não foram previamente aquecidas nem tiveram suas pontes dissulfeto reduzidas. A eletroforese ocorreu em temperatura ambiente, voltagem de 150 V, corrente de 40 mA por gel e sob condições não redutoras. Após a corrida os géis foram lavados por 30 min em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo 2,5% de Triton X-100, para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida estes foram lavados por 10 min com água destilada e imersos na solução de incubação (Tris-HCl 50mM pH 8,0 com

CaCl₂ 10 mM, NaCl 200mM e Igepal 0,02%) por 18 h a 37°C. Os géis foram submetidos ao processo de revelação de bandas protéicas utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma). A avaliação da atividade proteolítica deu-se com o aparecimento de regiões mais claras no gel, contrastando com o fundo azul (resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina).

Para a zimografia bidimensional utilizou-se o protocolo descrito por Serrano *et al.* (2005). A solução de reidratação das fitas (7 cm, pH 3 a 10, linear) consistia em uréia 5M, CHAPS 2% e solução de anfólitos a 1%. Após a focalização isoeletrica (1^o dimensão) as fitas foram submetidas à etapa de equilíbrio, sendo incubadas por 15 min, sob agitação, em tampão de equilíbrio sem agente redutores (Tris-HCl 0,05M, SDS 10%, glicerol 30% e azul de bromofenol 0,5%).

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando um *scanner* (*Imagescanner*, GE Healthcare) com resolução de 300 pontos por polegada (dpi). A obtenção de informações referentes ao ponto isoeletrico (pI) e massa molecular das proteínas presentes nos géis foram adquiridas utilizando o software ImageMaster™ 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare). Alternativamente, para observação de glicoproteínas com o corante ProQ Emerald®, os géis foram documentados em um transiluminador ultra-violeta (300 nm).

3.2.3 Espectrometria de massas

3.2.3.1 Digestão in gel

Proteínas de interesse, presentes nos *spots* dos géis bidimensionais, foram recortadas e submetidas ao processo de digestão *in gel* segundo o protocolo descrito por Hanna *et al.* (2000), com algumas modificações. Todos os reagentes utilizados foram preparados no momento do uso.

Inicialmente os fragmentos de gel recortados foram incubados em 500 µL de uma solução de metanol 50% em água MilliQ® contendo ácido acético 5% por 2h. Em seguida, essa solução foi removida por aspiração com pipeta e 500 µL foram

adicionados aos fragmentos de gel, que permaneceram por mais uma hora nesta solução. Os fragmentos de gel foram então desidratados pela incubação por 10 min (2 vezes por 5 min) em 200 μ L de acetonitrila (100%). A solução de acetonitrila foi aspirada com pipeta e o restante foi evaporado em um sistema de concentração a vácuo (*speed vac*). Após esta etapa, os pedaços de gel foram reidratados por 30 min em 30 μ L (por fragmento de gel) da solução redutora (ditiotreitól 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Decorrido o tempo de reidratação com DTT, a solução foi aspirada com pipeta e os fragmentos de gel foram incubados por 30 min em 30 μ L (por fragmento de gel) da solução alquilante (iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Em seguida, a solução alquilante foi removida por aspiração com pipeta e, os fragmentos de gel foram submetidos à incubação, por 10 min, em 100 μ L (por fragmento de gel) de uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Após esta etapa, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e 200 μ L (por fragmento de gel) de acetonitrila 100% foram adicionados e os fragmentos de gel incubados nesta solução por 5 min. A solução de acetonitrila foi retirada e, novamente, os fragmentos de gel foram incubados, por 10 min, em 200 μ L (por fragmento de gel) da solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Na última etapa de desidratação, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e os fragmentos de gel foram incubados por 10 min (duas vezes por 5 min) em 200 μ L de acetonitrila 100%. A solução de acetonitrila foi retirada por aspiração com pipeta e o restante foi evaporado num sistema *speed vac*. Os fragmentos de gel foram reidratados em 16 μ L de uma solução fresca de tripsina (Sigma) (50 ng/ μ L em bicarbonato de amônio 50 mM), em banho de gelo, por 30 min. Em seguida, a solução de tripsina foi retirada, uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada (em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel) e os tubos contendo os fragmentos de gel foram incubados em banho termostaticado (a 37°C) por 18 h.

A extração dos peptídeos do gel se deu com a adição de 30 μ L (por fragmento de gel) da **solução 1** - ácido fórmico 5% (em água MilliQ) - e incubação dos pedaços de gel por 10 min nesta solução, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo tubo e, ao pedaço de gel do tubo

anterior, foi adicionado 12 μL (por fragmento de gel) da **solução 2** - ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Os fragmentos de gel foram incubados por 20 min (duas vezes por 10 min) nesta solução, e a solução transferida para o tubo que continha os peptídeos extraídos com a **solução 1**. A solução foi concentrada em *speed vac* e os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 15 μL (por amostra) de ácido acético 3% nas análises com o espectrômetro LTQ-XL ou, alternativamente, ácido fórmico 0,1%, nas análises com o espectrômetro Q-ToF

3.2.3.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

As análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram realizadas utilizando um espectrômetro do tipo *Ion trap* (LTQ XL, Thermo Scientific) do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan. O espectrômetro foi acoplado a um sistema de cromatografia líquida de fluxo nanométrico (*Accela Pump*, Thermo Scientific) utilizando um fluxo de 400 nL/min. Parte das análises foi também realizada no *WM Keck Mass Spectrometry Facility, Biomolecular Research Facility*, Universidade de Virginia, Estados Unidos, utilizando também um *Ion Trap* (LTQ XL, Thermo Scientific) acoplado a um cromatógrafo (Agilent 110 series) com fluxo nanométrico (500 nL/min). Neste caso, as análises foram feitas durante um estágio de 2 meses (Julho e Agosto de 2008) nos Estados Unidos.

Alternativamente, em parte dos nossos experimentos, utilizamos o espectrômetro do tipo Quadrupolo - Tempo de Voo (Q-ToF Ultima, Waters) acoplado a um sistema de cromatografia líquida de fluxo nanométrico (nanoAcquity, Waters) do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, ou do Laboratório de Espectrometria de Massas, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP.

Preparação de colunas C-18 capilares

Inicialmente, colunas capilares de 7,5 cm (Polymicro Technologies), 75 x 350 μm (diâmetro interno e externo, respectivamente) foram preenchidas com 100 μL de

resina Jupiter[®] C-18 (Phenomenex) 3 mg;/mL em uma solução 50/50 de acetonitrila/ácido acético 1%, utilizando um sistema de injeção por pressão (~500 psi). Antes da aplicação das amostras de peptídeos as colunas foram carregadas com 5 µL de uma solução de angiotensina I (Sigma) (100 fmol/µL) em ácido acético 1% e iniciou-se uma corrida cromatográfica num cromatógrafo líquido (Agilent 110 Series) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap* (LTQ XL, Thermo Scientific) com fonte de ionização *nanospray*. Os solventes utilizados foram : A- ácido acético 0,1 M e B- acetonitrila em ácido acético 0,1 M. Utilizou-se um gradiente de 2 a 80% de B durante 50 min (2 a 50% de B durante 22,5 min; 50 a 80% de B durante 22,5 min e, finalmente, 2% de B durante 5 min). Durante o gradiente foram monitorados o tempo de retenção da angiotensina I, bem como a intensidade do seu correspondente íon triplamente carregado (de razão *m/z* igual a 433,0). Valores de intensidade maiores ou iguais a 10⁷ na contagem total de íons (TIC) e tempos de retenção dentro do intervalo entre 12 a 14 min no cromatograma indicavam boa qualidade das colunas preparadas, sendo portanto utilizadas para as análises subseqüentes. Alternativamente, foi utilizada uma coluna capilar comercial C-18 de (10 cm x 100 µm; comprimento e diâmetro interno, respectivamente) (Waters).

Análise de peptídeos

A solução de peptídeos (7,5 µL) oriundos de fragmentos de *spots* de géis de poliacrilamida foi dessalinizada *off-line* carregando-se as amostras nas colunas com auxílio de uma célula de pressão (pressão de 500 psi, que resultava num fluxo de ~1µL/min). Em seguida, as colunas foram conectadas a um sistema cromatográfico operando num fluxo de 500 nL/min, acoplado ao espectrômetro de massas LTQ XL. Utilizou-se o mesmo gradiente de 50 min descrito anteriormente (de 2 a 80% de acetonitrila em ácido acético 0.1 M). A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 2,5 kV e 200 °C, respectivamente, e o espectrômetro foi operado no modo *Data Dependent Acquisition* (DDA), no qual uma varredura de massas na região de *m/z* de 300 a 1600 é realizada, seguida por dissociação induzida por colisão (CID) dos 10 íons mais intensos.

Alternativamente, para algumas amostras utilizamos um espectrômetro do tipo Quadrupolo -Tempo de Vôo com fonte de ionização *nanospray* (Q-ToF Ultima, Waters). Neste caso, a voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 4.0 kV e 100 °C, respectivamente. O espectrômetro também foi operado no modo DDA, utilizando uma varredura de massas na região de m/z de 200 a 2000, seguida da dissociação induzida por colisão dos 3 íons mais intensos. Para esta análise, 4,5 μ L de uma mistura de peptídeos extraídos de *spots* de géis de SDS-poliacrilamida foram submetidos à dessalinização *on line*, utilizando uma coluna C-18 (180 μ m x 20 mm, diâmetro interno e comprimento, respectivamente) (Waters), com fluxo de 15 μ L/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 C-18 capilar de 100 μ m x 100mm (Waters), num fluxo de 400 nL/min durante um gradiente de 0 a 80% de acetonitrila (solvente B) em ácido fórmico 0,1%, (Solvente A) durante um total de 45 min (0 a 20% de B em 20 min; 20 a 40% B em 15 min; 40 a 80% de B em 5 min; 80 a 0% de B em 5 min). Como calibrante foi utilizada uma solução de ácido fosfórico/acetoneitrila/água (0,1/25/74,9) num fluxo de 500 nL/min. Ambos os espectrômetros (LTQ XL e Q-ToF) foram ajustados para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 120 seg (para se diminuir a aquisição repetitiva de um mesmo valor de m/z).

3.2.3.3 Proteômica quantitativa

Para a análise proteômica quantitativa dos venenos de *B. jararaca* utilizamos o método descrito por Ross *et al.* (2004) que emprega a derivatização de amins primárias de peptídeos com ésteres de succinimida: reagentes comercializados pela Applied Biosystems sob o nome comercial de iTRAQ™. Usando esta abordagem é possível avaliar até 4 amostras simultaneamente. Os peptídeos derivatizados são indistinguíveis no espectro de MS¹, contudo exibem íons repórteres (de baixa m/z) bastante intensos nos espectros de MS/MS, característica que permite a

quantificação por meio de análise da intensidade dos íons repórteres nestes espectros. A Figura 5 exemplifica a análise em detalhes.

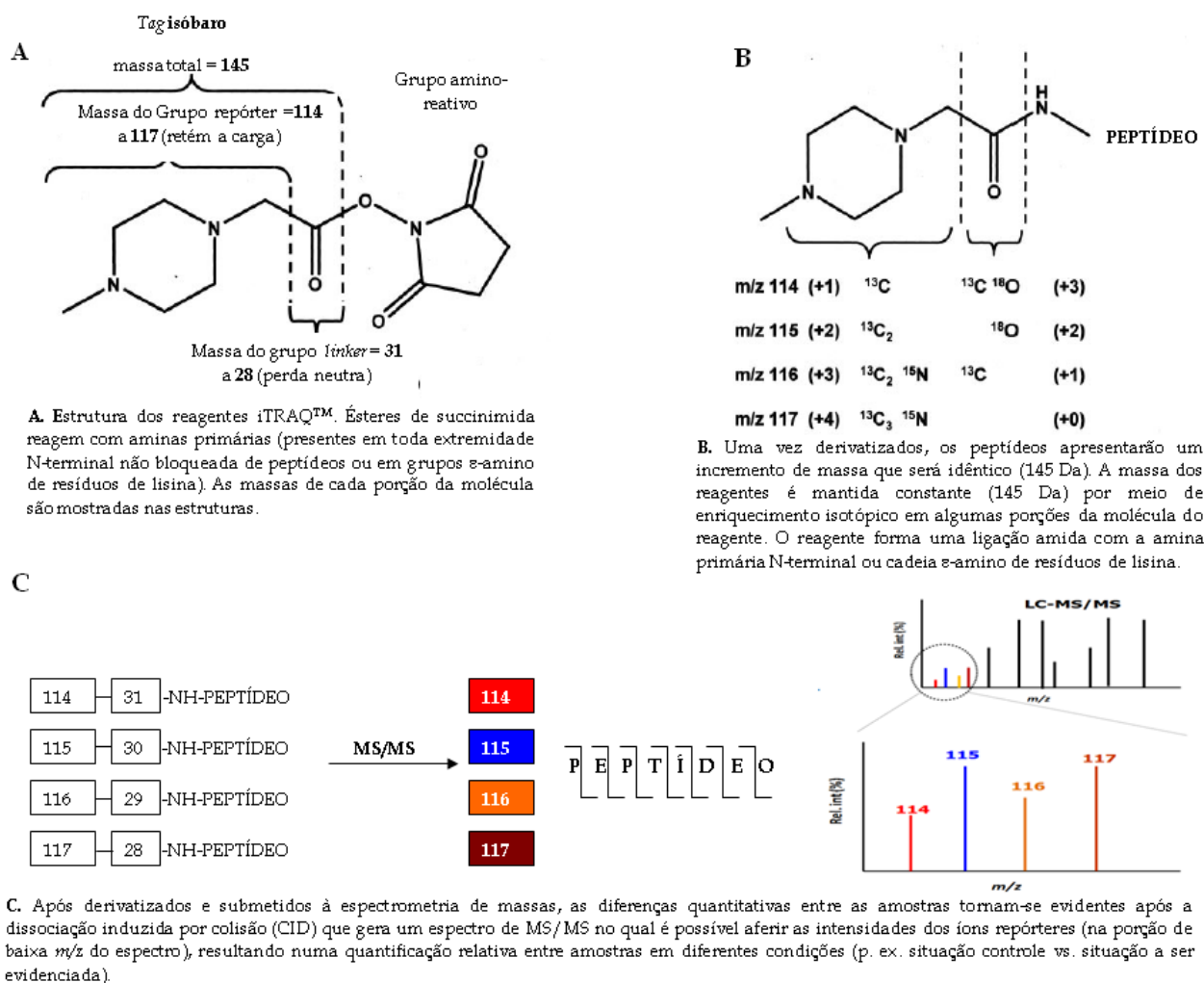


Figura 5: Estratégia experimental utilizada para análise quantitativa dos proteomas dos venenos de *B. jararaca* (Adaptado de Ross *et al.* 2004).

Digestão tripsínica em solução e derivatização dos peptídeos com tags isóbaros

Após a dosagem de proteínas dos venenos de filhotes e adultos (dissolvidos em água MilliQ®), um volume correspondente a 100 μg de proteínas de cada amostra foi separado. A esta alíquota foi adicionado o *dissolution buffer* (TEAB 500 mM) presente no kit iTRAQ 4-plex™ (Applied Biosystems) para um volume final de 20 μL . A amostra foi agitada brevemente e 1 μL do agente desnaturante foi adicionado (SDS 2%). Em seguida, adicionou-se 2 μL do agente redutor (TCEP 50 mM), as amostras foram gentilmente agitadas e incubadas a 60°C por 1 h. Decorrido este

período, adicionou-se 1 μL do reagente alquilante (MMTS 200 mM em TEAB 500mM) e as amostras foram incubadas no escuro por 10 min. Por fim, a cada amostra foram adicionados 10 μL de uma solução de tripsina (*Proteomics grade* - Sigma) 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em HCl 0,1 mM e as amostras foram incubadas por 18 h a 37°C.

Cada reagente iTRAQ™ (114 a 117) foi ressuspendido em 70 μL de etanol absoluto (também fornecido pelo kit). Em seguida, os reagentes (70 μL cada) foram adicionados às respectivas amostras. Optamos por realizar a seguinte marcação:

Reagente 114 → veneno de filhotes

Reagente 115 → veneno de adultos

Reagente 116 → veneno de filhotes (duplicata)

Reagente 117 → veneno de adultos (duplicata)

As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por uma hora e, em seguida, o volume referente às 4 amostras foi agrupado em um só tubo.

Cromatografia de troca catiônica e LC-MS/MS

À mistura de peptídeos marcados (~500 μL) foram adicionados 400 μL de uma solução de ácido fosfórico 10 mM em 25% de acetonitrila, pH 2,2. A amostra foi submetida à cromatografia de troca catiônica em coluna MonoS (GE Healthcare), utilizando um sistema FPLC *Äkta purifier* (GE Healthcare) e fluxo constante de 1 mL/min. A eluição dos peptídeos foi feita com um gradiente linear de 0 a 300 mM de NaCl em solução de ácido fosfórico 10 mM em acetonitrila 25% pH 2,2. A eluição dos peptídeos marcados foi avaliada monitorando-se a absorbância a 280 nm.

Após a cromatografia, as frações foram agrupadas em *pools*, enumerados de 1 a 6. Cada *pool* foi seco em sistema de concentração à vácuo (*speed vac*), ressuspendido em 400 μL de ácido tri-fluoro-acético 0,5% (TFA) e submetido à dessalinização utilizando cartuchos C-18 de extração em fase sólida (Sep-Pack light, Waters),

conforme protocolo especificado pelo fabricante. Os eluatos (presentes na solução de acetonitrila 50%/TFA 0,5%) foram secos em *speed vac*. Após dessalinizados, cada *pool* foi ressuspendido em 20 μL de ácido fórmico 0,1% e um volume de 4,5 μL foi submetido à LC-MS/MS utilizando um Q-ToF conforme os parâmetros descritos no sub-item 3.2.3.2, com exceção das energias de colisão utilizadas, as quais foram acrescidas em 20% dos seus valores originais. As corridas de LC-MS/MS ocorreram com fluxo de 600 nL/min, utilizando um gradiente de 2 a 90% de acetonitrila (solvente B) em ácido fórmico 0,1% (solvente A), durante 95 min (2 a 10% de B em 10 min; 10 a 40% de B em 65 min; 40 a 80% de B, em 15 min; 80 a 90% de B em 2 min e 90 a 2% de B em 3 min). Para cada *pool* foram realizadas 4 corridas.

3.3 Análise glicoproteômica

3.3.1 Deglicosilação em condições desnaturantes

A deglicosilação total dos venenos de filhotes e adultos foi realizada utilizando o protocolo descrito por Murayama *et al.* (2003), com a utilização das enzimas *N*-glicosidase F ou *O*-glicosidase (Roche), que reconhecem e clivam a ligação glicosídica presente entre resíduos de polissacarídeos e o nitrogênio amídico da cadeia lateral de resíduos de asparagina (glicanos *N*-ligados) ou a ligação glicosídica ao oxigênio da cadeia lateral de resíduos de serina ou treonina (glicanos *O*-ligados), respectivamente. Inicialmente, as amostras de veneno (15 μg , em água MilliQ®) foram incubadas por 1 min a 95°C em SDS 10%. Em seguida, foram adicionados 8 μL do tampão fosfato de sódio 20mM (com azida sódica 0,08%, EDTA 10 mM e Triton X-100 2%, pH 7.0) e a solução foi incubada por 2 min a 95°C. Após esta etapa, a solução foi transferida para banho de gelo e 1U de *N*-glicosidase F (em tampão fosfato de sódio 100 mM contendo EDTA 25 mM, pH 7,2) ou 2,5 mU de *O*-glicosidase (em tampão fosfato de sódio 50 mM contendo 350 mM de NaCl, pH 7,5) foi adicionada a cada amostra de veneno. A solução foi incubada a 37°C por 18 h e o perfil protéico foi avaliado por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida em

condições redutoras. Alternativamente, as amostras de veneno de filhotes e adultos (30 µg, em água MilliQ®) foram N-deglicosiladas conforme descrito acima (utilizando 2 U de N glicosidase F neste caso) e o perfil protéico foi avaliado em géis bidimensionais, utilizando fitas de 7 cm gradiente de pH imobilizado na faixa de 4 a 7, conforme descrito no sub-item 3.2.2-B.

3.3.2 Cromatografia em coluna de afinidade e LC-MS/MS

Para a cromatografia em coluna de afinidade (Concanavalina A sepharose®, Sigma) as amostras de veneno (5 mg em 1 mL de *binding buffer* - Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, e CaCl₂ 5 mM, pH 7,4) foram submetidas à cromatografia em uma coluna (0,8 cm x 2,0 cm) preenchida pela resina de Concanavalina-A (ConA) ligada covalentemente à uma matriz de *Sepharose*®. Inicialmente as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min e a coluna foi mantida fechada para interação das amostras com a lectina presente na matriz. Após a eluição das proteínas não ligadas com 5 mL de *binding buffer*, as proteínas ligadas a resina foram eluídas com 5 mL de D-glicose 0,5 M em *binding buffer* (monitoramos a absorvância dos eluatos espectrofotometricamente a 280 nm e consideramos ausência de proteínas no eluato quando este valor era igual a zero). O eluato final (proteínas eluídas com 5 mL de D-glicose 0,5 M em *binding buffer*) foi concentrado para 400 µL usando um sistema de concentração por centrifugação (CentriconYM-3; Millipore) e submetido à digestão tripsínica em solução, conforme descrito a seguir.

O eluato da coluna de Concanavalina A teve seu teor protéico mensurado pelo método de Bradford e uma alíquota correspondente a 100 µg de proteínas foi submetida ao procedimento de digestão tripsínica em solução. Para tanto, a amostra foi incubada por 30 min a 95°C com 20 µL de DTT 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM. Em seguida, adicionou-se à esta mistura 20 µL de iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM e procedeu-se uma incubação adicional de 30 min no escuro. À mistura resultante adicionou-se 10 µL de uma solução de tripsina (0,2 µg/µL, em ácido clorídrico 0,1 mM) (*Proteomics grade* - Sigma) e as amostras foram incubadas a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 10 µL da mistura de peptídeos resultante foi injetada em uma pré-coluna preenchida por resina C-18 (180 µm. × 20

mm, Waters) para remoção de sais presentes na amostra. A coluna foi lavada com 100% do solvente A (ácido fórmico 0,1%) num fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 12,5 min. Para a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) utilizou-se uma coluna C18 analítica (75 $\mu\text{m} \times 100$ mm) (Waters) e os parâmetros descritos no item 3.3. A aquisição dos espectros foi feita utilizando-se um espectrômetro do tipo *Ion Trap* (LTQ XL, Thermo Scientific) conforme os parâmetros descritos no sub-item 3.2.3.2.

3.3.3 Análise de *N*-glicanos por espectrometria de massas

Os experimentos descritos a seguir foram realizados no *Glycomics Center*, na Universidade de New Hampshire, Durham, New Hampshire, Estados Unidos, durante um estágio de 2 meses (Junho a Agosto de 2010).

3.3.3.1 Deglicosilação em condições desnaturantes

Os venenos de filhotes e adultos foram submetidos à deglicosilação em condições desnaturantes utilizando-se a enzima PNGase F (New England Biolabs Inc), que reconhece e cliva a ligação glicosídica presente entre resíduos de glicanos e o nitrogênio amídico da cadeia lateral de resíduos de asparagina (glicanos *N*-ligados). Resumidamente, 1 mg de proteínas (quantificadas pelo método de Bradford) em 300 μL de bicarbonato de amônio 40 mM foram desnaturadas pela adição de 15 μL da solução desnaturante (SDS 5%, DTT 400 mM) e posterior aquecimento a 90°C por 15 min. Decorrida esta etapa, as amostras foram resfriadas a 4°C, por 10 min. Em seguida, foram adicionados 15 μL do tampão de reação (fosfato de sódio 500 mM, pH 7.5), 15 μL de NP-40 10% e, finalmente, 2 μL (1000 U) da enzima PNGase F. A reação foi incubada por 18 h a 37°C.

3.3.3.2 Redução e permetilação dos N-glicanos liberados enzimaticamente

Os N-glicanos liberados enzimaticamente pela PNGase F foram aplicados em cartuchos de extração em fase sólida C-18 (Solid Phase Extraction cartridges, Grace Davidson Discovery Sciences) e eluídos com 5 mL de uma solução de acetonitrila 5%/TFA 0,1%.

Preparação de colunas com carvão ativado

Colunas de carvão ativado (Porous Graphitized Carbograph -PGC) foram preparadas para utilização na dessalinização dos N-glicanos obtidos por meio da extração em fase sólida.

Uma suspensão de 20 mg/mL de carvão ativado em NaOH 1M foi preparada, agitada vigorosamente e, em seguida, centrifugada brevemente para sedimentação do carvão ativado. Em seguida, a fase aquosa foi removida e foi adicionado 1 mL de água grau HPLC (Fisher Scientific). A mistura foi novamente agitada e centrifugada para sedimentação do carvão ativado. Novamente, a fase aquosa foi removida e foi adicionado 1 mL de água grau HPLC. Após a centrifugação e remoção da fase aquosa, uma nova lavagem do carvão ativado foi realizada, desta vez utilizando uma solução de acetonitrila 80%/TFA 0,1%. O carvão ativado foi deixado nesta solução por 18h (ou até o momento do uso), a temperatura ambiente.

Dessalinização dos N-glicanos eluídos

Os N-glicanos, eluídos no passo de extração em fase sólida em cartuchos C-18, foram secos em *speed vac*, ressuspendidos em 1 mL de água grau HPLC e dessalinizados utilizando colunas preenchidas com carvão ativado. Para a dessalinização, colunas plásticas (5,5 cm x 0,7 cm - altura x diâmetro, respectivamente; uma coluna para cada amostra) foram preenchidas com 1 mL cada, da solução de carvão ativado em acetonitrila 80%/TFA 0,1%. Antes da aplicação das amostras as colunas foram lavadas 4 vezes com 5 mL de água grau HPLC. Em seguida as amostras de N-glicanos (1 mL) foram aplicadas nas colunas. O eluato foi descartado e as colunas foram novamente lavadas com água grau HPLC (4 x 5 mL).

Finalmente, os *N*-glicanos foram eluídos com em 5 mL de uma solução de acetonitrila 25%/TFA 0,1%.

Redução dos N-glicanos liberados

A solução de glicanos dessalinizada foi seca em *speed vac* e ressuspensa em 200 µL de NaBH₄ 1M em NaOH 10 mM (Ashline *et al.* 2005). As amostras foram incubadas nesta solução por 18 h, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi resfriada em banho de gelo e 2 mL de ácido acético concentrado foram adicionados. Para a remoção de ésteres de boro (formados durante o procedimento de redução), 2 mL de etanol absoluto foram adicionados e a solução deixada para secar sob corrente constante de nitrogênio. Em seguida foram adicionados 3 mL de uma solução de ácido acético 1% em metanol e a solução deixada novamente para secar sob corrente de nitrogênio. Esta etapa foi repetida mais uma vez e após completa remoção dos ésteres de boro a solução de *N*-glicanos foi ressuspensa em 1 mL de água grau HPLC e dessalinizada utilizando colunas preenchidas com carvão ativado, conforme descrito anteriormente.

Permetilação dos N-glicanos liberados

Para permetilação das hidroxilas livres (não anoméricas) dos *N*-glicanos foi utilizado o protocolo de micro-permetilação descrito por Ciucanu e Kerek (1984). Pastilhas de NaOH (750 mg) foram adicionadas a micro-colunas (*spin columns*, Harvard Apparatus) e lavadas com 500 µL de acetonitrila para prevenir absorção de umidade. A acetonitrila foi removida das micro-colunas por centrifugação a 1000 rpm em micro-centrífuga (Eppendorf Mini Spin) e, em seguida, a coluna foi lavada 3 vezes com 300 µL de dimetilsulfóxido (Sigma), seguido por centrifugação a 1000 rpm por 2 min. As amostras de *N*-glicanos reduzidos foram ressuspensas em 90 µL de DMSO, seguido pela adição de 0,9 µL de água grau HPLC e 16,8 µL de iodometano (Sigma). As amostras foram aplicadas nas colunas preenchidas com NaOH, centrifugadas a 1000 rpm por 2 min e os eluatos foram re-aplicados nas colunas repetidamente (por 10 vezes). Os tubos contendo os eluatos foram incubados em

banho de gelo e 300 μL de água grau HPLC (gelada) foram adicionados. Em seguida, o mesmo volume de clorofórmio foi adicionado à mistura contendo os *N*-glicanos permetilados. A fase orgânica foi lavada 10 vezes com água grau HPLC (por meio de sucessivos ciclos de centrifugação a 1000 rpm, 2 min) para remoção de qualquer impureza derivada do processo de permetilação (hidróxido de sódio ou iodometano). Finalmente, as amostras permetiladas foram secas em *speed vac* e acondicionadas em *freezer* (-20°C) ou dissolvidas em metanol 80% para análise por espectrometria de massas. A Figura 6 apresenta resumidamente o processo de derivatização de glicanos descrito neste sub-item.

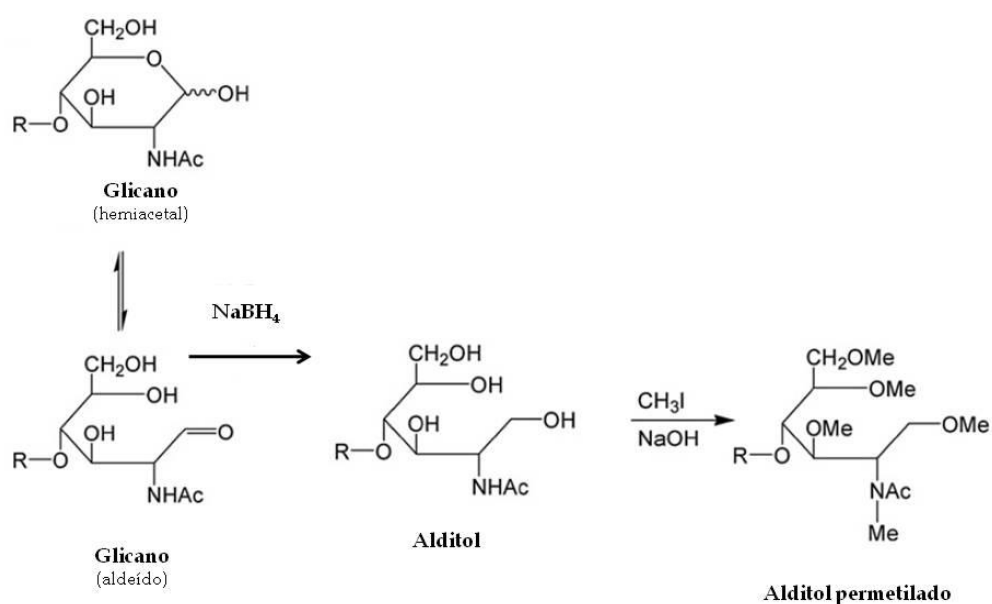


Figura 6: Derivatização de glicanos para análise por espectrometria de massas. A forma de anel fechado (hemiacetal) dos açúcares (neste exemplo, a *N*-acetil glicosamina) existe em equilíbrio com a forma aberta (aldeído). A forma de aldeído pode ser reduzida para produzir um alditol. O processo de permetilação converte todos os grupos OH dos alditóis em O-metil (O-Me, no exemplo acima) e todos os grupos NH em N-metil. R= resíduo de glicano.

3.3.3.3 Análise por espectrometria de massas sequencial (MS^n)

A análise dos *N*-glicanos por espectrometria de massas foi realizada em um *Ion Trap* (LTQ XL) (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de ionização por injeção direta baseada em *chip* (Triversa Nanomate, Advion). Um volume de 5 a 10 μL da solução de *N*-glicanos em metanol 80% foi aplicado por injeção direta no espectrômetro. Os espectros foram visualizados com o programa Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific). Para os eventos de *full scan* (MS^1), a análise foi efetuada usando

25 a 50 varreduras (*scan events*) sendo 3 micro-varreduras (*microscans*) para cada varredura. Para otimizar os sinais nos espectros de MS^n , o número de varreduras, bem como o de micro-varreduras foram aumentados de acordo com a intensidade do íon a ser analisado. Esses valores variaram de 25 a 200 para as varreduras e 5 a 10 para as micro-varreduras. Os parâmetros de energia de colisão foram deixados no modo *default* (energia de colisão ajustada para 35% ou para um valor que resultasse no menor sinal detectável do íon precursor). O valor de ativação (*Activation Q*) foi ajustado para 0,25, o tempo de ativação para 30 milisseg e o isolamento dos íons precursores foi realizado numa janela de m/z de 1 Da.

Para determinação das composições prováveis de *N*-glicanos nas amostras analisadas por espectrometria de massas utilizamos o programa *GlycoMod* (disponível em <http://ca.expasy.org/tools/glycomod/>) (Cooper *et al.* 2001). Os parâmetros de busca utilizados foram: resíduos de glicanos na forma de adutos de sódio, massas monoisotópicas, derivatização por permetilação e tolerância de massa de 2 Da.

3.4 Análise peptidômica

O perfil peptidômico dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* foi analisado por espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro do tipo MALDI-ToF (Ettan MALDI-TOF/Pro Mass Spectrometer, GE Healthcare). Inicialmente, uma solução de veneno (0,2 mg/mL) foi preparada em ácido trifluoroacético 0,1% (TFA 0,1%) na ausência ou presença de inibidores de metaloproteinases ou serinoproteinases (EDTA 10 mM ou PMSF 2 mM, respectivamente). Quando da utilização dos inibidores, as amostras foram incubadas previamente por 30 minutos a temperatura ambiente em solução de TFA 0,1% contendo EDTA ou PMSF. Cinco microlitros desta solução foram submetidos a um processo de cromatografia em micro-escala utilizando ponteiras preenchidas com resina C-18 (sistema ZipTip™, Millipore®), seguindo as especificações fornecidas

pelo fabricante. Os peptídeos/proteínas foram eluídos em uma solução de acetonitrila/TFA 0,1% (50/50, v/v). Em seguida, 0,35 µL da mistura de peptídeos eluídos foram pipetados no *slide* do espectrômetro, em duplicata, e após volatilização do solvente, foram adicionados 0,35 µL da matriz (ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico, solução saturada de 10 mg/mL em acetonitrila 50%/TFA 0,1%). Como calibrantes externos utilizamos P₁₄R ([M+H]⁺1,533.8582) e angiotensina II ([M+H]⁺ 1,046.5423) (Sigma). O espectrômetro foi operado no modo *reflectron*, com resolução de 10000 e a aquisição dos espectros foi feita pelo programa *Ettan Maldi Software - Evaluation Mode* versão 2.01.03 (GE Healthcare).

Alternativamente, os venenos de filhotes ou adultos (10 mg/mL em TFA 0,1%) foram submetidos a um processo cromatográfico utilizando-se cartuchos C-18 de extração em fase sólida (Sep-Pack light, Waters), conforme o protocolo descrito por Menin *et al.* (2008). Os peptídeos/proteínas foram eluídos em uma solução de acetonitrila/TFA 0,1% (30/70, v/v), secos em sistema de concentração à vácuo (*speed vac*) e, em seguida, ressuspendidos em 200 µL de ácido fórmico 0,5%. Uma alíquota de 2,5 µL do eluato concentrado foi submetida ao processo de LC-MS/MS utilizando-se o espectrômetro LTQ XL, conforme os parâmetros descritos no subitem 3.2.3.2. Para as corridas de LC-MS/MS o fluxo foi ajustado para 400 nL/min e um gradiente de 105 min foi utilizado. Os solventes utilizados foram: A (ácido fórmico 0,1%) e B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila); o gradiente era composto por: 15%-50% do solvente B em 50 min, mantendo-se em 50% de B por 20 min; 50%-65% de B em 22,5 min e, finalmente, para 100% de A em 12,5 min.

3.5 Análise bioinformática - Proteômica

3.5.1 Processamento dos espectros

Os dados brutos (*Raw files*) referentes às análises de MS/MS utilizando o espectrômetro LTQ XL foram processados utilizando o software *Bioworks*TM versão

3.3.1 (Thermo Scientific). Os parâmetros utilizados foram: de-isotopização dos picos, auto-deteção do estado de carga dos íons e CID como modo de ativação selecionado. Para cada amostra, os arquivos resultantes dos espectros adquiridos (com extensão *.DTA) foram concatenados usando um *script* do Perl (merge.pl), (disponível no site www.matrixscience.com/help/instruments_xcalibur.html) e convertidos para a extensão MGF (*Mascot Generic Format*). Alternativamente, utilizamos também a plataforma *Trans-Proteomic Pipeline* (Keller *et al.* 2005) para converter os arquivos brutos no formato MGF. Neste caso, utilizamos os parâmetros-padrão (*default*) do programa.

Para os espectros obtidos com o espectrômetro Q-ToF Ultima, foi utilizado o programa ProteinLynx™ versão 2.3 (Waters). Neste caso, os arquivos resultantes (extensão *.PKL) 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.

3.5.2 Busca em bancos de dados e identificação de peptídeos/proteínas

Os arquivos resultantes (extensão *.MGF, para os dados obtidos com o LTQ XL e extensão *.PKL para os dados do Q-ToF Ultima) foram utilizados para buscas em banco de dados utilizando o programa Mascot (Matrix Science), acessado através de um servidor instalado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (*Mascot Server* versão 2.2).

Utilizamos o banco não-redundante de proteínas do *National Center for Biotechnology Information (nrNCBI Databank - www.ncbi.nlm.nih.gov)* e restringimos o universo de busca à taxonomia **Serpentes**, que contava com 9500 seqüências depositadas na data 1º de Setembro de 2009. Como parâmetros de busca utilizamos uma clivagem perdida pela tripsina; resíduos de cisteína carbamidometilados

(escolhidos como uma modificação fixa) e resíduos de metionina oxidados (escolhidos como uma modificação variável). Para o experimento de proteômica quantitativa, selecionamos também como modificação fixa a derivatização de lisinas e da porção N-terminal dos peptídeos tripsínicos com o reagente iTRAQ™. Os espectros de MS/MS em que se verificou uma intensidade relativa dos íons repórteres (*tags*) menor que 5% não foram considerados para quantificação relativa. No caso do experimento de peptidoma, não selecionamos especificidade enzimática. Neste caso particular, selecionamos como modificações variáveis a presença de resíduos de ácido glutâmico ou glutamina cíclicos (na forma de ácido piroglutâmico) na extremidade N-terminal, característica presente nos peptídeos potenciadores de bradicinina de venenos de serpentes.

Utilizando o algoritmo Mascot, foram considerados os peptídeos cujos íons individuais excederam os valores de *homology score* associados e cujos *scores* para os íons de carga +1,+2, +3 e +4 apresentaram valores maiores ou iguais a 10, 20, 40 e 40, respectivamente. Os resultados das buscas com o algoritmo Mascot foram submetidos ainda a uma segunda análise, utilizando o programa Scaffold™ 3 versão 3_00_01 (Proteome Software Inc.) (Searle, 2010). A tolerância de massa para íons precursores foi ajustada para $\pm 1,5$ Da e $\pm 0,8$ para os íons-filho (para os dados obtidos com o LTQ XL) e $\pm 0,1$ tanto para os íons precursores quanto para os íons-filho (para os dados obtidos com o Q-ToF Ultima).

Para estimativa da taxa de falsos positivos (TFP) nos experimentos de digestão tripsínica em solução (listados nos itens 3.2.3.3 e 3.3.2) um banco de dados *Decoy* foi gerado. Este banco foi elaborado por meio da ordenação reversa e randômica das seqüências presentes no nosso banco de dados original (Serpentes).

Assim, a TFP foi calculada seguindo a expressão:

$$TFP = FP/FP+PV$$

em que FP= n° de falsos positivos e PV = n° de positivos verdadeiros.

Utilizando os parâmetros de busca descritos acima, as TFPs calculadas para os experimentos listados nos itens 3.2.3.3 e 3.3.2 foram $\leq 1\%$. Para o experimento de

peptidoma (LC-MS/MS), uma inspeção visual dos espectros foi realizada após a busca em banco de dados.

3.6 Análise transcriptômica

3.6.1 Extração, purificação e análise do RNA

RNA total

Utilizamos, ao todo, 6 pares de glândulas de adultos (sendo 3 de machos e 3 de fêmeas) e 20 pares de glândulas de filhotes (sendo 10 de machos e 10 de fêmeas). Para a extração do RNA total foi utilizado o reagente TRIZOL® (Invitrogen), um método baseado na modificação do procedimento descrito por Chomczynski e Sachi (1987). Inicialmente, as glândulas (ainda congeladas em nitrogênio líquido) foram pesadas e colocadas em tubos plásticos estéreis e livres de RNAsases (*RNAase-free*) para homogenização. Utilizamos 1 mL do reagente TRIZOL® para cada 100 mg de tecido. As glândulas foram homogeneizadas num homogeneizador automático (Polytron PT 3100, Kinematica AG). Em seguida, a amostra foi incubada por 5 min a temperatura ambiente para dissociação dos complexos nucleoprotéicos e 0,2 mL de clorofórmio foram adicionados para cada 1 mL de TRIZOL® utilizado. O conteúdo foi então transferido para microtubos de 2 mL, agitado vigorosamente com as mãos por 15 seg e incubado a temperatura ambiente por 3 min. Após esta etapa, a amostra foi centrifugada por 15 min a 12 000 x g, a 4°C. Como resultado, formou-se uma fase inferior (fenol-clorofórmio), uma interface e uma fase superior (aquosa) transparente, de cerca de 60% do volume, onde o RNA estava presente. A fase superior foi recolhida e 0,5 mL de isopropanol foi adicionado para cada 1 mL de TRIZOL® usados no início do procedimento. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 min e, em seguida, centrifugada novamente por 10 min a 12 000 x g, a 4°C. Um precipitado (RNA) foi formado no fundo dos tubos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1 mL de etanol 75% para cada

1 mL de TRIZOL[®] usado na homogeneização). A amostra foi misturada por agitação e centrifugada por 5 min a 7500 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o precipitado (RNA) foi seco em fluxo laminar a temperatura ambiente.

O RNA total extraído das glândulas de adultos ou de filhotes foi ressuspenso em 200 µL ou 100 µL de água tratada com di-etil-pirocarbonato (DEPC), respectivamente.

RNA mensageiro (mRNA)

Os RNAs mensageiros (mRNA) foram purificados a partir do RNA total, em colunas de oligo d(T)-celulose, conforme descrito por Sambroock *et al.* (1989) e Ausbell *et al.* (1994). Para tanto, foi utilizado o sistema comercial *Illustra mRNA purification kit* (GE Healthcare), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Ao final do procedimento, o mRNA eluído em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,4) foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto gelado e 10 µL de uma solução de glicogênio (10 mg/mL), seguido por centrifugação por 20 min a 16 000 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o mRNA foi seco em fluxo laminar a temperatura ambiente. O mRNA foi ressuspenso em 10 µL de água tratada com DEPC e estocado a -80°C até o momento do uso.

Análise do RNA

A integridade do RNA total extraído foi avaliada pela discriminação das bandas correspondentes às frações 18S e 28S do RNA ribossômico em eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante contendo formaldeído (1,85% concentração final) e brometo de etídeo (0,1 µg/mL), seguindo o protocolo descrito por Sambroock *et al.* (1989). Para tanto, foram adicionados aproximadamente 10 µg de RNA total extraídos de cada amostra. Durante a eletroforese a voltagem foi fixada em 80V e a corrida ocorreu a temperatura ambiente por aproximadamente 2 h, utilizando-se como tampão de corrida o MOPS pH 8,0 (MOPS 20 mM, acetato de sódio 2 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) (Sambroock *et al.* 1989).

Tanto o RNA total quanto os mRNAs purificados (uma alíquota de 1 μL) foram quantificados utilizando um espectrofotômetro para micro-volumes (*NanoDrop 2000*, Thermo Scientific).

3.6.2 Construção das bibliotecas de cDNA

Para a construção das bibliotecas de cDNA utilizamos o sistema comercial *SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning* (Invitrogen) com algumas modificações que serão descritas a seguir. É pertinente ressaltar que, em decorrência do tamanho das glândulas dos animais, a concentração de mRNA purificado variou entre as amostras analisadas (filhotes e adultos). Optamos por construir duas bibliotecas de cDNA de adultos: uma de machos adultos (utilizando 4,4 μg de mRNA) e uma de fêmeas adultas (utilizando 5 μg de mRNA). No caso da biblioteca de filhotes não foi possível efetuar a mesma separação (baseada no sexo), de forma que iniciamos a construção desta biblioteca utilizando 4 μg de mRNA.

Síntese da primeira fita

Os volumes correspondentes aos mRNAs das amostras de filhotes, adultos machos e adultos fêmeas foram transferidos para microtubos plásticos de 1,5 mL e o volume final foi completado para 9 μL com água tratada com DEPC. Em seguida, 4 μL do *Not I primer adapter* foram adicionados e a mistura aquecida a 70°C por 10 min e resfriada no gelo.

Os seguintes componentes foram adicionados:

4 μL do *5X First Strand Buffer*
2 μL de 0,1 M de DTT
1 μL de 10 mM de DNTP Mix

A mistura foi agitada e em seguida incubada a temperatura ambiente por 2 min. Em seguida, adicionou-se 4 μL (4U) da enzima *SuperScript II RT* (5 μL para a

amostra de adultos), em um volume final de 20 μL . A transcrição reversa ocorreu pela incubação das amostras por 30 min a 37°C, seguida por mais 30 min a 42°C e, finalmente, 30 min a 45°C. A reação foi interrompida pela incubação dos tubos em banho de gelo.

Síntese da segunda fita

Aos tubos contendo os 20 μL de reação da síntese da primeira fita acrescentamos os seguintes reagentes (nesta ordem):

91 μL de água tratada com DEPC
30 μL de *5X Second Strand Buffer*
3 μL de 10mM de DNTP Mix
1 μL de *E.coli* DNA ligase (10u/ μL)
4 μL de *E.coli* DNA polimerase I (10u/ μL)
1 μL de *E.coli* RNase H (2u/ μL)

A mistura foi agitada gentilmente e incubada por 2 h a 16°C. Decorrido este período, 2 μL (10 U) de *T4 DNA polymerase I* foi adicionada e a solução novamente incubada a 16°C por 5 min. A reação foi interrompida pela incubação da mistura em banho de gelo e 10 μL de EDTA 0,5 M foram adicionados.

Primeira seleção de tamanhos em gel de agarose

Foi preparado um gel de agarose 1% com brometo de etídeo (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), com poços para até 200 μL de amostra. Ao cDNA sintetizado, foram acrescentados 10 μL de tampão de amostra *Ficoll Dye*. A eletroforese ocorreu utilizando voltagem fixa de 80V e foi interrompida após as amostras terem percorrido cerca de 1 cm. Em seguida, no transiluminador, utilizando baixa intensidade de luz ultravioleta, cortou-se duas faixas do gel com a amostra. A menor, de 450 a 800 pb e a maior, acima de 800 pb. O cDNA foi purificado do gel utilizando o sistema comercial *GFX™ PCR and DNA Gel band Purification Kit* (GE Healthcare), seguindo as

especificações fornecidas pelo fabricante. A eluição do cDNA foi feita em um volume de 50 μL de água tratada com DEPC.

Ligação dos adaptadores Eco RI

Os cDNAs de alta e baixa massa molecular foram secos em sistema de concentração à vácuo (*speed vac*), para redução dos volumes de 50 para 25 μL . A cada um deles foi adicionado:

10 μL de 5X T4 DNA ligase buffer
10 μL de adaptadores *Sal I* (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
5 μL de T4 DNA ligase (1u/ μL)

A mistura foi agitada gentilmente e incubada por 16 h a 16°C. Ao final deste período, os cDNAs foram precipitados pela adição de 50 μL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada por 5 min a 14 000 x g, a temperatura ambiente para que fosse separada em duas fases. A fase superior (aquosa) de aproximadamente 45 μL foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e precipitada pela adição de 5 μL de acetato de sódio 3M, seguido por mais 100 μL de etanol absoluto gelado. Novamente, a mistura foi agitada vigorosamente e incubada por uma hora a -80°C. Em seguida, a solução foi centrifugada por 20 min a 14 000 x g, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e desprezado. Acrescentou-se 500 μL de etanol 70% gelado, sem ressuspender o precipitado, e a solução foi centrifugada novamente a 14 000 x g, por 5 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então removido e o precipitado seco a 37°C por 10 min, ao fim dos quais foram adicionados 41 μL de água tratada com DEPC.

Digestão com Not I

Aos cDNAs diluídos em 41 μL foram adicionados 5 μL de *REact buffer* e 4 μL (45U) da enzima de restrição *Not I*. A solução foi gentilmente agitada e incubada por 2 h, a 37°C.

Segunda seleção de tamanhos em gel de agarose

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (como descrito anteriormente) e, no transiluminador, usando baixa intensidade de luz ultravioleta, cortou-se uma faixa do gel, que abrigava cDNA de tamanho acima de 400 pb, para eliminar o excesso de adaptadores. Tal como descrito anteriormente, o cDNA foi purificado do gel utilizando o sistema comercial *GFX™ PCR and DNA Gel band Purification Kit* (GE Healthcare), seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante. A eluição do cDNA foi feita em um volume de 50 μL de água tratada com DEPC.

Ligação dos cDNAs com o vetor pSPORT1

Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 4 μL de *5X T4 Ligase buffer*, 1 μL (50 ng) do vetor pSPORT1 (digerido com *Sal I* e *Not I*), 14 μL do cDNA purificado do gel e o volume foi ajustado para 19 μL com água tratada com DEPC (o mapa do vetor pSPORT1 está mostrado na Figura 7). Em seguida, foi adicionado 1 μL de *T4 DNA ligase* e a solução misturada por aspiração com pipeta. A mistura foi incubada por 16 h a 16°C.

Após a incubação, foram adicionados 5 μL de tRNA de levedura (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 12,5 μL de acetato de amônia 7,5 M e, em seguida, 70 μL de etanol absoluto gelado. A solução foi misturada gentilmente e incubada a temperatura ambiente por uma hora a -80°C. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 20 min a 14 000 $\times g$, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então removido e 500 μL de etanol 70%

gelado foram acrescentados e a solução resultante centrifugada por 5 min a 14000 x g, a temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente removido e o precipitado seco por incubação a 37°C por 10 min.

O precipitado foi ressuspendido em 5 µL de água tratada com DEPC e estocado a -80°C até o momento do uso.

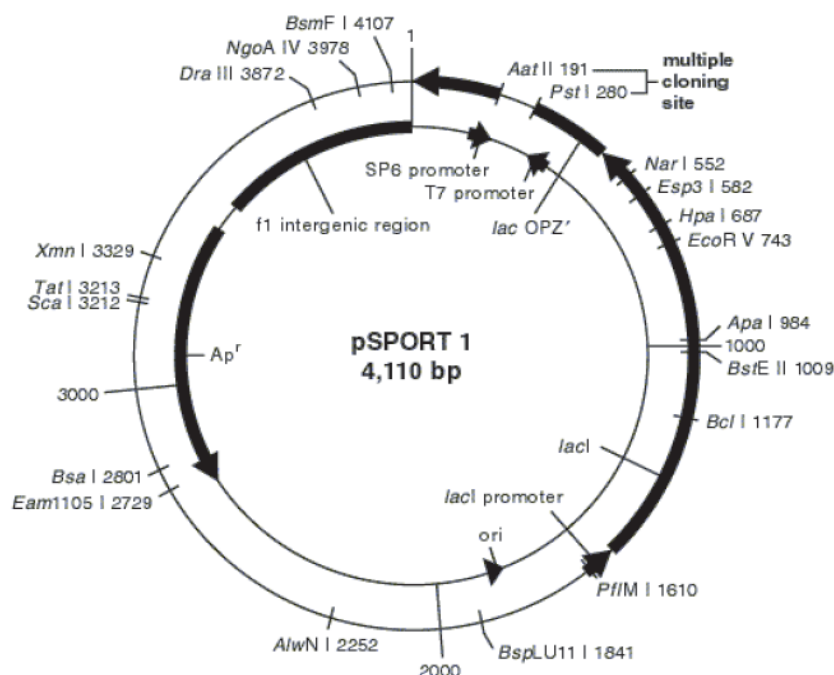


Figura 7: Mapa do vetor pSPORT1. Fonte: Invitrogen.

Transformação

O vetor contendo os insertos foi introduzido em bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes. Para tanto, as células (50 µL) foram previamente descongeladas em gelo por aproximadamente 15 min. Em seguida, as células foram colocadas em uma cubeta de eletroporação, 1 µL de cada reação de ligação foi adicionado e a mistura eletroporada, utilizando voltagem de 2,5 kV por aproximadamente 4,5 milisseg. Após a eletroporação, 350 µL de meio SOC

(Sambroock *et al.* 1989), previamente aquecido a 37 °C, foram adicionados e a mistura incubada por uma hora a 37 °C, sob agitação constante de 190 rpm.

A suspensão foi distribuída em placas de 140 mm de diâmetro contendo meio 2YT-ágar, contendo ampicilina (100 µg/mL) e deixadas por uma noite a 37°C.

3.6.3 Geração das ESTs

Preparação de DNA plasmidial e Estoque de clones

As colônias das placas contendo as bibliotecas eletroporadas foram coletadas e inoculadas individualmente em poços de placas de 96 poços contendo 1 mL de meio TB (*Terrific Broth*) previamente autoclavado e contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas por 22 h a 37°C, sob agitação constante de 220 rpm. Paralelamente as mesmas colônias foram também inoculadas em placas-estoque (também de 96 poços) contendo 150 µL de meio TB com ampicilina (100 µg/mL), mantendo-se a mesma ordem da placa inicial (por exemplo: o poço A1 da placa de 1 mL corresponde ao poço A1 da placa estoque). No dia seguinte, adicionou-se 150 µL de glicerol 50% estéril aos poços da placa-estoque e estas foram congeladas a -80°C.

A preparação de DNA plasmidial a partir das colônias que cresceram nas placas de 1 mL foi realizada utilizando-se placas de filtro (Multiscreen MAGVN2250, Millipore) que retêm os detritos celulares gerados durante o processo de extração após a lise alcalina e digestão com RNAases, conforme o protocolo descrito a seguir. Para este procedimento, as seguintes soluções foram preparadas:

- GTE (glicose 0,92%, Tris-HCl 26 mM, EDTA 100 mM pH 7,4) – A solução foi esterelizada por autoclavagem e armazenada a 8°C (o pH foi ajustado com gotas de HCl concentrado).
- Acetato de potássio 3M pH 5.5 (o pH foi ajustado com ácido acético glacial).

- Glicerol 50% estéril (a solução foi submetida a filtração em membrana de 0,22 μm no fluxo laminar).

A suspensão de bactérias foi centrifugada por 10 min a 1500 x g, 4°C e o sobrenadante descartado. A cada poço das placas foram adicionados 240 μL de GTE, e a mistura agitada vigorosamente até completa dissolução do precipitado. Em seguida, a solução foi novamente centrifugada a 1500 x g por 6 min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 84 μL de GTE e 5 μL de RNAase A (10 mg/mL) por poço das placas. Em seguida, a mistura foi novamente agitada vigorosamente até completa dissolução do precipitado. A solução foi então transferida para placa com fundo em "U" e 60 μL de NaOH 0,2N/SDS1% foram adicionados por poço. As placas foram agitadas lentamente por inversão e incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi neutralizada pela adição de 60 μL de acetato de potássio 3M por poço. As placas foram novamente agitadas lentamente por inversão e incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Após este período as placas foram centrifugadas por 15 min a 1500 x g e incubadas por 15 min no gelo.

Decorrida a incubação em gelo, as placas foram incubadas a 90°C por 30 min, seguidos por mais 10 min de incubação em gelo. As placas foram então centrifugadas a 1500 x g por 15 min a 4 °C.

O sobrenadante (aproximadamente 110 μL) foi transferido para o filtro acoplado a placas de fundo em "V" e centrifugado por 5 min a 1500 x g, a 4 °C. Foram adicionados 110 μL de isopropanol 75% gelado a cada poço das placas. As placas foram agitadas lentamente e, em seguida, centrifugadas por 45 min a 1500 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 μL de etanol 70% (gelado) por poço. A solução foi centrifugada por 10 min a 1500 x g, a 4 °C e o sobrenadante descartado.

Finalmente, o DNA precipitado foi incubado a 37°C por 20 min, foram adicionados 40 μL de água MilliQ® autoclavada e a solução foi incubada por 16 h a temperatura ambiente.

Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs) (Sanger *et al.* 1977), marcados com diferentes fluoróforos. A reação de seqüenciamento, para cada amostra, foi realizada seguindo o esquema descrito a seguir.

2 µL de DNA
 3,5 µL de água MilliQ® autoclavada
 3 µL do tampão *Save Money** (Tris-HCl 200 mM e 5 mM de MgCl₂ pH 9,0)
 0,5 µL do *primer M13 Reverse* (3,2 pmol/µL)
 1 µL do reagente *Big Dye**

*Reagentes do *Kit Big Dye* (Applied Biosystems).

O programa de termociclagem utilizado está representado na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de termociclagem utilizados na reação de PCR que precede o seqüenciamento.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Duração (ciclos)
1	96	10	40
2	52	20	
3	60	240	
4	4	Indeterminado	

Após a reação, foi realizada uma precipitação alcoólica do produto da termociclagem, seguindo o protocolo a descrito a seguir.

A cada amostra (produto da termociclagem) foram adicionados 100 µL de isopropanol 75% gelado, agitando-se gentilmente em seguida. A solução foi incubada à -20°C por 10 min e, em seguida, centrifugada a 1500 x g por 50 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 150 µL de etanol 70% gelado foram adicionados, seguidos por centrifugação das amostras a 1500 x g por 10 min a 4°C. Em seguida o precipitado foi incubado a 37°C por 30 min e as amostras foram submetidas ao seqüenciamento utilizando um seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.7. Análise bioinformática -Transcriptômica

3.7.1 Análise bioinformática das ESTs

Os arquivos contendo as seqüências geradas foram carregados em um *pipeline* de análise de dados instalado em um terminal LINUX para tratamento das seqüências e montagem dos *clusters*. Primeiramente, as seqüências dos clones foram “tratadas” eletronicamente para a eliminação de regiões do vetor de clonagem e das regiões de baixa qualidade. Para isso, utilizou-se o programa Phred (Ewing *et al.* 1998), onde se aceitou trechos de seqüência (janela de 75 bases) com 75% de bases com qualidade (valor de Phred) igual ou acima de 25. As seqüências correspondentes aos adaptadores utilizados na construção das bibliotecas e aos vetores de clonagem foram removidas utilizando o programa *CrossMatch*. Após estes tratamentos, as seqüências menores que 150 pares de bases foram excluídas das análises. Finalmente, as ESTs foram agrupadas em clusters (conjuntos de seqüências contíguas), utilizando-se o programa CAP3 (Huang e Madan, 1999). Para o agrupamento das ESTs em clusters de seqüências contíguas foi utilizado um valor de 98% de identidade entre as ESTs. As seqüências únicas (que não foram agrupadas em nenhum cluster) foram tratadas como singletes.

As seqüências dos clusters foram então submetidas à comparação automática com o banco de dados não redundante (*nr- Non redundant*) disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o software Blast2Go (Conesa *et al.* 2005) com os algoritmos BlastX (nucleotídeos x aminoácidos) e BlastN (nucleotídeos x nucleotídeos). (Altschul *et al.* 1997). Para a identificação putativa foi adotado um valor mínimo de confiabilidade (*e-value*) de 10^{-5} sobre pelo menos 50 posições. Após inspeção individual e avaliação caso a caso dos produtos encontrados, foi preparada uma tabela em planilha Microsoft® Excel, contendo informações relevantes para interpretação do banco de clusters. Clusters que não apresentaram resultados após análise por BlastX e BlastN no banco “nr” do NCBI foram submetidos à busca utilizando-se o banco de ESTs do NCBI (*dbEST - www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest*).

Com relação à composição geral dos clusters/singletes analisados foram estabelecidas 3 categorias: Toxinas, Não-toxinas (transcritos celulares) e *No hit* (clusters/singletes que não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência depositada nos bancos de dados analisados).

3.8 Caracterização funcional dos venenos

3.8.1 Atividades biológicas

3.8.1.1 Dose letal 50% (DL_{50})

Camundongos machos da linhagem Swiss (n=4), pesando entre 18 e 22 g, receberam, pela da via intra-peritoneal, 0,5 mL da solução de veneno em diferentes concentrações, em NaCl 0,15 M. A DL_{50} foi avaliada também em aves (*Gallus domesticus* - pintinhos machos de 1 dia, linhagem Bovans White pesando entre 40 e 45g) provenientes da Granja Kunitomo, Mogi das Cruzes, São Paulo. Os animais (n=4) receberam injeção de diferentes concentrações das amostras de veneno (em solução de NaCl 0,15 M) pela via intra-muscular, em um volume de 0,1 mL no músculo peitoral esquerdo, conforme descrito por Zelanis *et al.* (2008). O número de animais mortos nas doses analisadas foi avaliado em um período de 48 h (camundongos) (Silles Villarroel, 1978/79) e 24 h (aves) (Zelanis *et al.* 2008). A DL_{50} foi calculada segundo o método de Probita (Finney, 1971).

3.8.1.2 Atividade hemorrágica – Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

A atividade hemorrágica foi avaliada segundo o método de Kondo *et al.* (1960) modificado por Gutiérrez *et al.*, (1985). Grupos de 4 camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 18 a 22 g foram inoculados na região abdominal, pela via intra-dérmica, com diferentes doses de veneno em um volume de 100 μ L.

Após 2 h, os camundongos foram mortos por inalação de gás carbônico, a pele

foi removida, colocada sobre um transiluminador, e a área hemorrágica foi avaliada através da sobreposição com folhas de papel milimetrado. A Dose Mínima Hemorrágica (D.M.H.) é definida como a concentração de veneno que produz uma área hemorrágica de 78,5 mm².

3.8.2 Atividades enzimáticas

3.8.2.1 Atividade coagulante sobre o plasma– Dose Mínima Coagulante (DMC)

A Dose Mínima Coagulante (D.M.C.) é definida como a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de fibrinogênio ou plasma citratado em 60 seg a 37°C (Theakston e Reid, 1983). Para este ensaio foi utilizada uma solução de plasma humano citratado (citrato de sódio 3,8%). O ensaio foi realizado em duplicata. A 200 µL de plasma foram adicionados 100 µL de veneno em diferentes concentrações (obtidas através de diluições seriadas). As soluções de plasma e fibrinogênio foram mantidas em banho de gelo durante o uso, e a 37°C, quando nas cubetas do fibrômetro (BBL Fibrosystem, Becton Dickinson). Alternativamente, as amostras de veneno foram incubadas a temperatura ambiente por uma hora, na presença ou ausência de inibidores (EDTA 10 mM e PMSF 2 mM, concentrações finais no ensaio), para se correlacionar a atividade coagulante como decorrência da atividade de metaloproteinases ou serinoproteinases, respectivamente.

3.8.2.2 Ativação da protrombina (Fator II)

A ação ativadora de protrombina foi testada pelo ensaio de formação de trombina a partir de protrombina (HYPHEN Biomed) usando o substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix). Para isto, as amostras de veneno (0,2 µg) foram pré-incubadas a 37° C com protrombina (500 nM, concentração final no ensaio),

juntamente com o tampão Tris-HCl 20 mM contendo CaCl_2 10 mM e NaCl 200 mM, pH 8,3 em um volume final de 100 μL . Após 10 min de incubação, o substrato S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA·2HCl), foi adicionado (400 μM , concentração final no ensaio) e sua hidrólise monitorada a 405 nm por 30 min à 37°C, utilizando um leitor de microplacas (Victor3™ 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer). A ação amidolítica direta das amostras sobre o S-2238 foi monitorada nas mesmas condições, porém na ausência da protrombina.

3.8.2.3 Ativação do Fator X

A ação ativadora dos venenos sobre o fator X (HYPHEN Biomed) foi testada usando o substrato cromogênico S-2765 (Chromogenix) específico para fator Xa. Inicialmente, as amostras de veneno (0,1 μg) foram pré-incubadas, durante 10 min a 37° C, com Fator X (90 nM, concentração final no ensaio) e tampão Tris-HCl 20mM, contendo NaCl 200mM e CaCl_2 10mM, pH 8,3 em um volume final de 100 μL . A hidrólise do S-2765 (N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl), (400 μM , concentração final no ensaio) pelo fator Xa resultante da ação do veneno sobre o fator X, foi monitorada a 405 nm durante 30 min a 37 °C, utilizando um leitor de microplacas (Victor3™ 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer). A atividade amidolítica direta das amostras sobre o S-2765 foi monitorada nas mesmas condições, porém na ausência do fator X.

3.8.2.4 Atividade proteolítica sobre a caseína

A atividade proteolítica sobre a caseína foi determinada conforme descrito por Menezes *et al.* (2006). A 490 μL de uma solução-tampão (Tris-HCl 100 mM, contendo CaCl_2 10mM, pH 8,8) foram adicionados 10 μL da solução de veneno (1 mg/mL em Tris-HCl 100 mM, com CaCl_2 10mM, pH 8,8) e 500 μL de uma solução de N,N-caseína dimetilada 2% (Sigma) solubilizada no mesmo tampão. A mistura foi incubada por 30 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido

tri-cloroacético (TCA) 5%. Em seguida a amostra foi incubada em banho de gelo por 10 min, centrifugada a 14 000 x g por 15 min a 4°C e a absorvância dos sobrenadantes foi mensurada em espectrofotômetro utilizando-se o comprimento de onda de 280 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de veneno responsável pelo aumento de uma unidade de absorvância por minuto a 280 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por miligrama de proteína (U/mg).

3.8.2.5 Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi determinada conforme descrito por Oliveira *et al.* (2009). Uma solução de 50 µL fibrinogênio humano (10 mg/mL) em solução-tampão Tris-HCl 100 mM, contendo CaCl₂ 10mM, pH 8,8 foi incubada por 30 min a temperatura ambiente com 50 µL da solução de veneno (0,2 µg/mL, em Tris-HCl 100 mM, com CaCl₂ 10mM, pH 8,8) e a mistura foi incubada por 30 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Em seguida a mistura foi centrifugada a 10 000 x g por 15 min a 4°C e a absorvância dos sobrenadantes foi mensurada em espectrofotômetro utilizando-se o comprimento de onda de 280 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de veneno responsável pelo aumento de uma unidade de absorvância por minuto a 280 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por miligrama de proteína (U/mg).

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão e analisados utilizando o teste *t-student* com auxílio do programa *GraphPad InStat* versão 3.01 (GraphPad software). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

Embora uma análise da variabilidade sexual do veneno de *B. jararaca* não figurasse entre os objetivos deste projeto, realizamos alguns ensaios com os venenos de fêmeas e machos adultos, pois dispúnhamos destas amostras (separadas) antes da preparação do *pool* de adultos (conforme descrito no sub-item 3.1.1). Estes resultados serão apresentados ao longo desta seção juntamente com aqueles referentes às análises dos venenos de filhotes e adultos.

É pertinente ainda lembrar que todas as informações referentes à identificação de peptídeos por espectrometria de massas (tabelas contendo as estruturas primárias dos peptídeos) estão apresentadas no anexo deste trabalho.

4.1 Análise proteômica

4.1.1 Perfis eletroforéticos

Foi possível constatar uma expressiva diferença entre os perfis protéicos dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (unidimensional), principalmente na região acima de 68 kDa nos venenos dos filhotes e de aproximadamente 20 kDa nos venenos dos adultos (Figura 8). A análise sob condições não-redutoras mostrou uma maior presença de formas oligoméricas de proteínas (acima de 90 kDa) no veneno dos adultos.

As bandas diferenciais entre os venenos de filhotes e adultos foram recortadas e submetidas ao procedimento de digestão tripsínica *in gel* e subsequente análise por LC-MS/MS para identificação das proteínas correspondentes, conforme descrito na Tabela 6. A partir desta análise verificamos que as principais diferenças entre os venenos de filhotes e adultos está relacionada à abundância de metaloproteínas,

como se pode constatar pela identificação de peptídeos contidos nas bandas 1 a 5 (Figura 8).

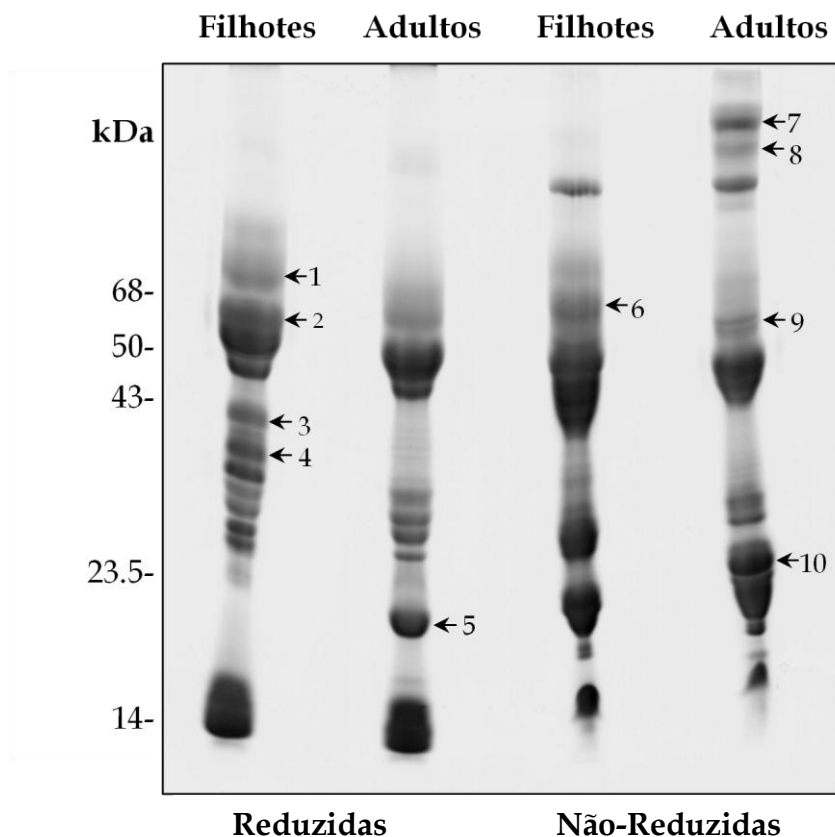


Figura 8: Perfil proteico dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* (50 µg) em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (gel em gradiente de 8%-18% de poliactilamida). Os marcadores de massa molecular estão indicados à esquerda da figura. As setas indicam bandas protéicas diferenciais entre as amostras, que foram recortadas e submetidas à digestão tripsínica *in gel* e LC-MS/MS. As proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

Outra importante diferença, avaliada sob condições não redutoras, foi a identificação de L-aminoácido oxidases na região de aproximadamente 55 kDa (banda 9) no veneno dos adultos. Da mesma forma, serino proteinases parecem mais abundantes no veneno dos adultos, como evidenciado pela identificação correspondente a banda 10.

Tabela 6: Análise de LC-MS/MS das proteínas diferencialmente expressas nos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* (indicadas na Figura 8).

Nº da banda	Proteína/ (Classe de toxina)	gi number ¹	Peptídeos identificados ²
1	Jerdonitin (MP)	gi 34329647	BXSBXMXPPPEBBR, ESMCDPBR, XTPGSBCADGXCCDBCR
2	HF3 (MP)	gi 82219706	LHSWVECESGECCDQCR
3	Insularinase-A (MP)	gi 82197476	SCXMASTXSB, ABCAEGXCCDBCR, GDNPDDRCTGBSADCPR, CTGBSADCPR
4	Jararafibrase-2 (MP)	gi 82219563	ARGDDMDDYCNGISAGCPR
5	Insularinase-A (MP)	gi 82197476	YXEXAVVADHGMFTB, YNSNXNTR, TRVHEMVNTXNGFFR, ASXANXEVWSB, TXTSFGEWR
6	Metalloproteinase VMP-III (MP)	gi 258618056	TPEBBAYXDAB*
7	Metalloprotease BOJUMET II (MP)	gi 32306927	YXXDNRPPCXXNXPXR, VCNSNRECVDVSTAY
8	Metalloprotease BOJUMET II (MP)	gi 32306927	YLIDNRPPCILNIPLR
9	L-amino-acid oxidase (LAAO)	gi 82127389	SAGBXYEESXQB
10	Serine proteinase HS114 (SP)	gi 82233395	NDDALDKDLMLVR, LDSPVSDSEHIAPLSLPPSPSV GSVCR, IMGWGSITPIQK, TNPDVPHCANINLLDDAVCR AAYPELPAEYR

¹gi number conforme o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI);

²A identificação dos peptídeos seguiu os critérios especificados no sub-item 3.5.2 (Material e Métodos); X= Ile ou Leu. B= Lys ou Gln;

Peptídeos correspondentes ao C-terminal da proteína estão mostrados em itálico;

*Peptídeo obtido por seqüenciamento *De novo* (BlastP *e-value* = 2e-5).

(Classe de toxinas identificadas: MP= metaloproteinase; SP = serino proteinase; LAAO = L-aminoácido oxidase).

No intuito de avaliar a complexidade dos proteomas dos venenos de filhotes e adultos de forma mais extensa, utilizamos a eletroforese bidimensional variando as faixas de gradiente de pH na primeira dimensão (fitas de 24 cm com gradiente de

pH variando de 3 a 10 e, alternativamente, 4 a 7). Os resultados desta análise estão mostrados na Figura 9.

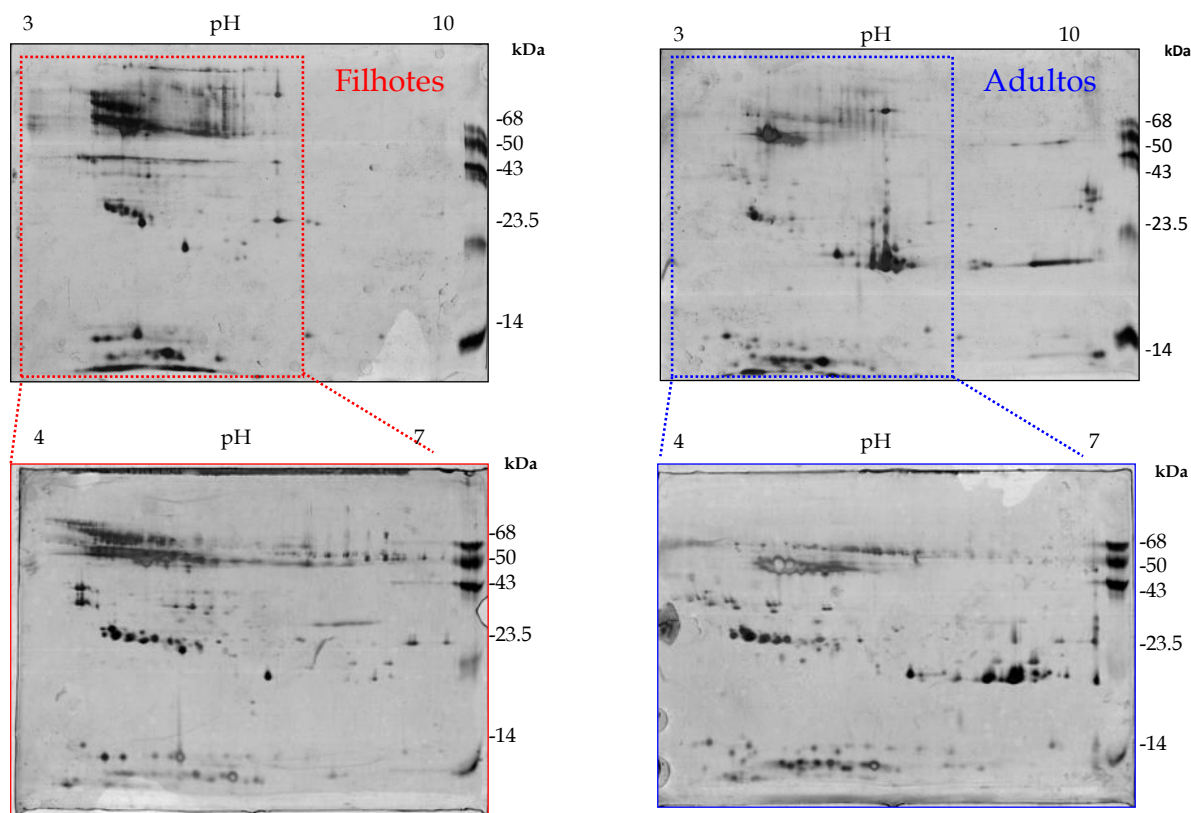


Figura 9: Eletroforese bidimensional sob diferentes gradientes de pH (fitas IPG de 24 cm, pH 4-7, linear; 12% SDS-poliacrilamida, géis de 20 x 26 cm x 1.5mm). Foi aplicado um volume correspondente a 350 μ g de proteínas em todos os géis. Os géis foram corados com nitrato de prata. Os retângulos representam as regiões dos géis com expressiva variabilidade que, alternativamente, foram também resolvidas utilizando um gradientes de pH variando de 4 a 7 na primeira dimensão.

Conforme análise da Figura 9 é possível perceber uma grande concentração de proteínas ácidas (apresentando pI variando dentro da faixa de 4 a aproximadamente 7) em ambos os venenos. De fato, esta região concentra a maior parte das diferenças verificadas e, por este motivo, optamos também por utilizar faixas estreitas de gradiente de pH (variando de 4 a 7) durante o procedimento de focalização isoeletrica (1^o dimensão). Com esta abordagem foi possível resolver melhor esta região complexa das amostras e verificar alguns padrões característicos entre as duas amostras. A análise por LC-MS/MS dos peptídeos tripsínicos extraídos das proteínas presentes nos *spots* diferenciais entre os géis bidimensionais dos

venenos de filhotes e adultos, bem como as proteínas identificadas estão apresentados na Figura 10 e Tabelas 7 e 8, respectivamente.

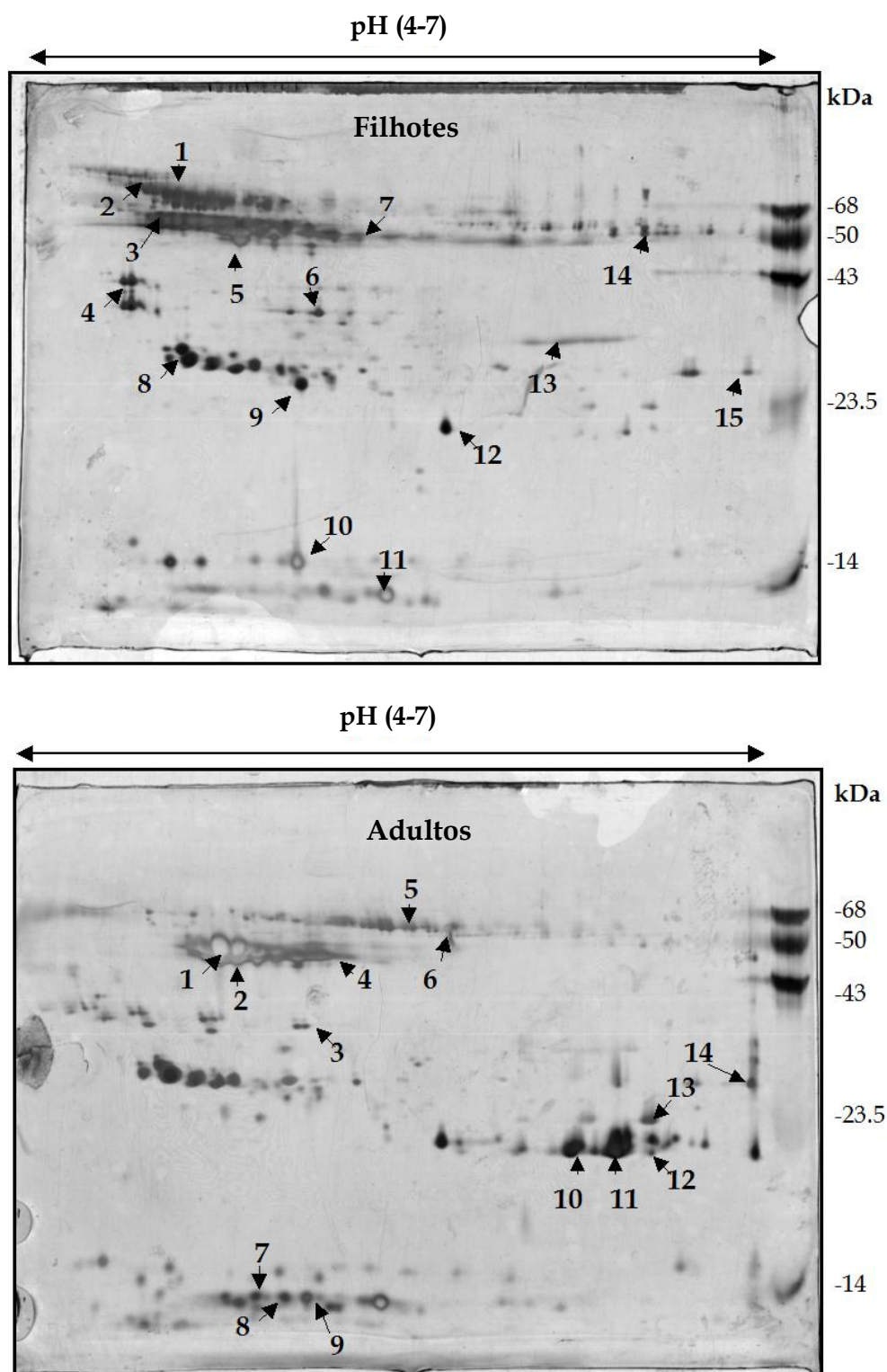


Figura 10: Eletroforese bidimensional (fitas IPG de 24 cm, pH 4-7, linear; 12% SDS-poliacrilamida 20x 26 cm x 1.5mm) do veneno de filhotes e adultos de *B. jararaca* (350 µg de proteínas). Coloração com nitrato de prata. Os spots indicados por números foram submetidos à digestão tripsinica *in gel* e analisados por LC-MS/MS, conforme descrito na seção Material e Métodos.

Tabela 7: Spots identificados no gel bidimensional do veneno de filhotes de *B. jararaca*.

Número do spot	MM (kDa)*	pI*	Número de acesso#	Proteína/ (Classe de toxina)	Cobertura de seqüência (%)
1	77	4,53	gi 123908731	Zinc-metalloproteinase-disintegrin bothrojarin (MP)	16
2	76	4,41	gi 48427991	Zinc-metalloproteinase jerdonitin (MP)	4
3	62	4,50	gi 82219706	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3 (MP)	8
4	40	4,40	gi 76365442	Metalloproteinase P-III (MP)	5
5	51	4,85	gi 82214993	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A (MP)	37
6	40	5,14	gi 82189787	Zinc metalloproteinase-disintegrin ACLD (MP)	3
7	53	5,29	gi 32306927	Metalloprotease BOJUMET II (MP)	8
8	30	4,61	gi 82233395	Venom serine proteinase HS114 (SP)	43
9	26	5,07	gi 82197476	Zinc metalloproteinase insularinase-A (MP)	9
10	15	5,05	gi 166012653	Phospholipase A2 (PLA2)	23
11	14	5,40	gi 158518414	Phospholipase A2 (PLA2)	54
12	22	5,65	gi 172044592	Zinc metalloproteinase BnP2 (MP)	42
13	34	6,11	gi 123911605	Zinc metalloproteinase (MP)	28
14	56	6,43	gi 195927838	L- amino acid oxidase (LAAO)	54
15	28	6,84	gi 48428846	Ablomin precursor (CRISP)	22

*Massas moleculares (MM) e pontos isoelétricos (pI) observados no gel

Número de acesso da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Classes de toxinas identificadas: MP= metaloproteinase; SP= serino proteinase; PLA2= fosfolipase A2; LAAO= L- aminoácido oxidase; CTL= lectina tipo-C; CRISP= proteína secretada rica em cisteínas.

Tabela 8: Spots identificados no gel bidimensional do veneno de adultos de *B. jararaca*.

Número do spot	MM (Da)*	pI*	Número de acesso#	Proteína/ (Classe de toxina)	Cobertura de seqüência (%)
1	50	4,75	gi 82214993	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A (MP)	31
2	50	4,80	gi 231997	Zinc metalloproteinase-disintegrin Jararhagina (MP)	30
3	37	5,07	gi 13959622	KN-BJ 2 (SP)	25
4	50	5,19	gi 82190823	Zinc metalloproteinase bothropasin (MP)	12
5	60	5,56	gi 82127389	L-amino-acid oxidase (LAAO)	19
6	60	5,67	gi 82127389	L-amino-acid oxidase (LAAO)	13
7	14	4,88	gi 41353970	C-type lectin (CTL)	43
8	14	5,01	gi 41353970	C-type lectin (CTL)	40
9	14	5,08	gi 41353970	C-type lectin (CTL)	57
10	22	6,13	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin (MP)	23
11	22	6,32	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin (MP)	23
12	22	6,46	gi 172044592	Zinc metalloproteinase BnP2 (MP)	42
13	23	6,46	gi 461511	Ancrod (Venombin-A) (SP)	100**
14	28	6,85	gi 48428846	Ablomin (CRISP)	11

*Massas moleculares (MM) e pontos isoelétricos (pI) observados no gel

Número de acesso da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Classes de toxinas identificadas: MP= metaloproteinase; SP= serino proteinase; PLA2= fosfolipase A2; LAAO= L- aminoácido oxidase; CTL= lectina tipo-C; CRISP= proteína secretada rica em cisteínas.** A entrada gi | 461511 | é, na realidade, um fragmento da serinoproteinase Venombin-A, que foi seqüenciado e depositado no banco de proteínas do NCBI.

A partir da identificação dos *spots* dos géis bidimensionais de filhotes e adultos de *B. jararaca* foi possível notar expressivas diferenças entre as amostras, corroborando também o perfil apresentado na Figura 8, na análise unidimensional dos venenos. A grande parte de proteínas ácidas e de alta massa molecular (massas moleculares entre 25 e 70 kDa e pontos isoelétricos variando entre 4,0 e 6,0) foi identificada, em todas as amostras, como sendo proteínas pertencentes à classe das metaloproteinases. Uma diferença marcante entre os perfis de filhotes e adultos é a abundância de isoformas ácidas e de alta massa molecular, identificadas como metaloproteinases, no veneno de filhotes de *B. jararaca* (*spots* 1, 2, 3 e 7; Figura 10-A). Metaloproteinases também constituem expressivos componentes no veneno de adultos (*spots* 1 e 2; Figura 10-B). A região ácida e de baixa massa molecular do gel do veneno de filhotes (*pI* 5,0 -5,4 e ~14 kDa, respectivamente) apresenta dois *spots* intensos (*spots* 10 e 11; Figura 10-A), identificados como fosfolipases A₂. Esta mesma região no gel do veneno de adultos apresenta uma diversidade de *spots* identificados, em sua maioria, como lectinas do tipo C (*spots* 7 a 9; Figura 10-B). Uma outra característica marcante do proteoma do veneno de adultos são algumas isoformas de metaloproteinases na região de 22 kDa e *pI* 5,0 a 5,6 (*spots* 10 a 12, Figura 10-B), praticamente ausentes no gel do veneno de filhotes (Figura 10-A). Identificamos também uma CRISP, que aparenta estar presente em ambos os venenos (*spots* 15 e 14 do gel do veneno de filhotes e adultos, respectivamente; Figura 10).

Analizamos ainda o veneno dos animais adultos (machos e fêmeas), no intuito de verificar possíveis diferenças em relação ao sexo do animal. A Figura 11 apresenta os perfis proteômicos dos venenos dos *pools* de machos e de fêmeas adultas de *B. jararaca* analisados por eletroforese bidimensional. É interessante notar que, diferente dos perfis obtidos para os venenos de filhotes e adultos, o dimorfismo sexual parece ser uma característica mais sutil, sendo observada principalmente na intensidade das proteínas visualizadas nos *spots* dos géis. Por este motivo, utilizamos 1 mg de proteínas para as comparações nos géis bidimensionais, um valor aproximadamente 3 vezes maior do que aquele utilizado para as comparações entre os venenos de filhotes e adultos (inicialmente tentamos aplicar a mesma quantidade de proteínas

utilizada nas comparações entre os venenos de filhotes e adultos -350 µg - contudo não observamos diferenças expressivas entre os perfis - dados não mostrados. Assim, optamos por usar a quantidade de 1 mg de proteínas). Utilizamos ainda, durante a focalização isoeletrica, um gradiente linear de pH variando de 4.0 a 7.0, por esta faixa compreender cerca de 95% das proteínas presentes nos venenos (conforme visto nas imagens dos géis bidimensionais anteriores).

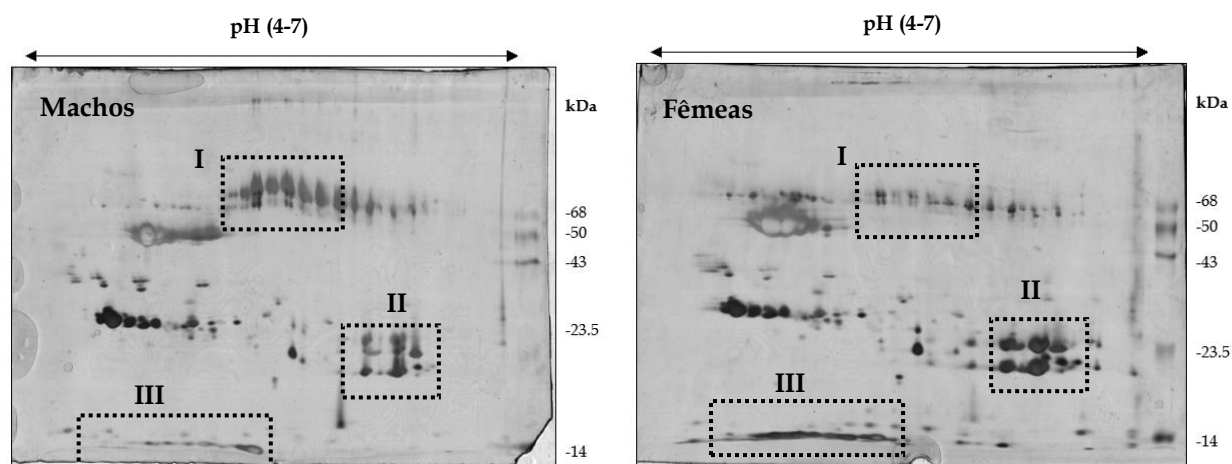


Figura 11: Eletroforese bidimensional (fitas IPG de 24 cm, pH 4-7, linear; 12% SDS-poliacrilamida 20x 26 cm x 1.5mm) do veneno de machos e fêmeas adultas de *B. jararaca* (1000 µg de proteínas). Os géis foram corados com nitrato de prata. Os retângulos indicados pelos algarismos romanos denotam as áreas de diferenças na intensidade dos *spots* entre as amostras.

Três regiões apresentam claras diferenças quanto à intensidade das proteínas presentes nos *spots*, são elas:

Região I: Apresenta isoformas de proteínas de alta massa molecular (aproximadamente 75 kDa), distribuídas em uma ampla faixa de *pI*, variando de 5 a 6,5. A comparação direta entre as amostras permite sugerir uma maior concentração destas proteínas no veneno dos machos, dada as diferenças de intensidade entre as amostras (e considerando que a mesma quantidade de proteínas foi aplicada em ambos os géis).

Região II: Apresenta isoformas de proteínas distribuídas numa faixa de massa molecular variando de 20 a 25 kDa e pontos isoeletricos variando de 6,0 a 6,4. É possível observar uma maior intensidade na região correspondente ao gel do

veneno de fêmeas. A comparação direta sugere uma maior concentração destas proteínas no veneno das fêmeas.

Região III: Apresenta isoformas de proteínas de baixa massa molecular 14 kDa e pontos isoelétricos variando de 4,4 a 5,5. Esta região apresenta diferenças qualitativas e quantitativas, no que diz respeito a presença e intensidade dos *spots* presentes, respectivamente. As imagens sugerem uma concentração maior destas proteínas no veneno das fêmeas. A Figura 12 e Tabela 9 apresentam os dados referentes a identificação de *spots* diferenciais nos géis bidimensionais dos venenos de machos e fêmeas adultas de *B. jararaca*.

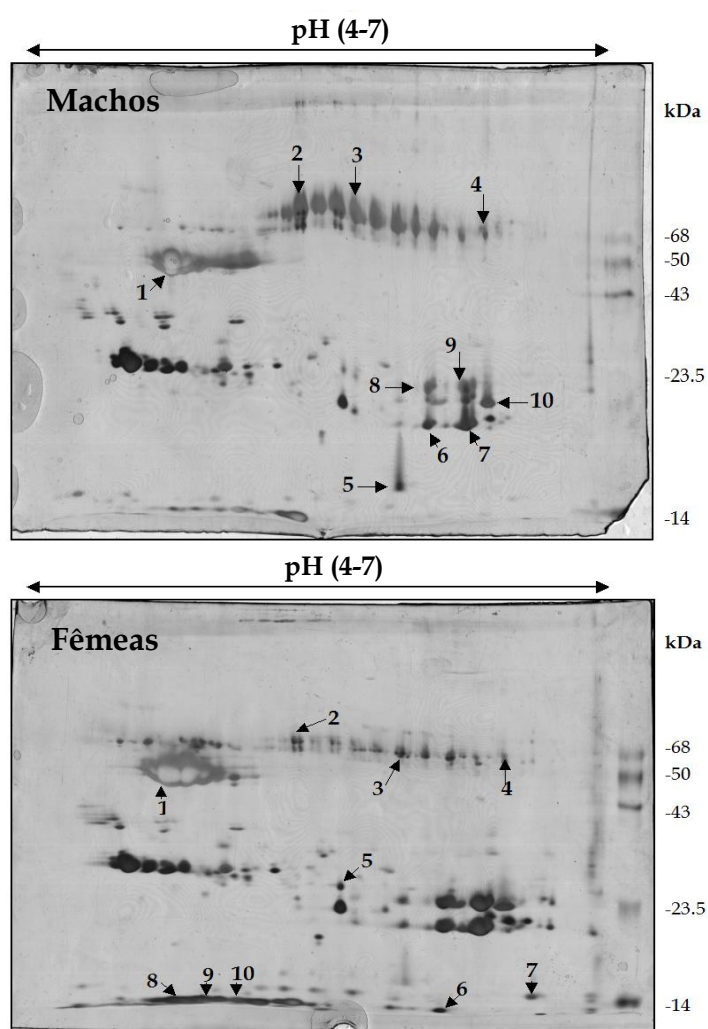


Figura 12: Eletroforese bidimensional do veneno de machos e fêmeas adultas de *B. jararaca* (1000 µg de proteínas) (fitas IPG de 24 cm, pH 4-7, linear; 12% SDS-poliacrilamida 20x 26 cm x 1.5mm). Coloração com nitrato de prata. Os *spots* indicados por números foram submetidos à digestão tripsínica *in gel* e analisados por LC-MS/MS, conforme descrito na seção Material e Métodos.

Tabela 9: Spots identificados no gel bidimensional do veneno de machos adultos de *B. jararaca*.

Número do spot	MM (Da)*	pI*	gi number#	Proteína/ (Classe de toxina)	Cobertura de sequência (%)
1	49	4,73	gi 82214993	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A (MP)	38
2	77	5,42	gi 195927838	L- amino acid oxidase (LAAO)	45
3	76	5,82	gi 195927838	L- amino acid oxidase (LAAO)	54
4	70	6,38	gi 195927838	L- amino acid oxidase (LAAO)	48
5	16	5,93	gi 82217029	Venom nerve growth factor (svNGF)	24
6	21	6,08	gi 82214994	Zinc metalloproteinase BITM02A (MP)	26
7	21	6,28	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin (MP)	20
8	25	6,08	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin (MP)	24
9	25	6,30	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin (MP)	29
10	23	6,41	gi 109254946	Serine proteinase isoform (SP)	23

*Massa moleculares (MM) e pontos isoelétricos (pI) observados no gel.

gi number da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Classes de toxinas identificadas: MP= metaloproteinase; SP= serino proteinase; LAAO= L-aminoácido oxidase; svNGF= fator de crescimento de nervo.

Tabela 10: *Spots* identificados no gel bidimensional do veneno de fêmeas adultas de *B. jararaca*.

Número do <i>spot</i>	MM (Da)*	pI*	<i>gi number</i> #	Proteína	Cobertura de seqüência (%)
1	49	4.71	gi 82214993	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A (MP)	34
2	76	5.36	gi 195927838	L- amino acid oxidase (LAAO)	34
3	66	5.89	gi 195927838	L- amino acid oxidase precursor (LAAO)	60
4	66	6.44	gi 195927838	L- amino acid oxidase (LAAO)	51
5	27	5.59	gi 172044592	Zinc metalloproteinase BnP2 (MP)	78
6	13	6.12	gi 62131098	Bothojaracin chain A (CTL)	40
7	14	6.61	gi 1839441	Platelet glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit (CTL)	84
8	14	4.74	gi 399125	Botrocetin alpha chain (CTL)	55
9	14	4.82	gi 41353970	C-type lectin (CTL)	56
10	14	4.96	gi 41353970	C-type lectin (CTL)	56

*Massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) observados no gel.

gi number da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Classes de toxinas identificadas: MP= metaloproteinase; SP= serino proteinase; LAAO= L-aminoácido oxidase; CTL= lectina tipo-C.

Em relação os venenos dos animais adultos, a principal diferença parece ser a intensidade dos *spots* (Figura 12, A e B). Isoformas de L-aminoácido-oxidase (LAAO) parecem estar em maior concentração no veneno de machos adultos (*spots* 2 a 4, Figura 12-A) e distribuem-se num amplo espectro de pontos isoelétricos (pI 5,4 a 6,8, Figura 12- A). Por outro lado, a região de 14 kDa e pI 4,7 a 6,6 no gel do veneno de fêmeas adultas apresenta uma maior diversidade de lectinas do tipo C (*spots* 6 a 10, Figura 12-B), uma característica diferencial em relação ao veneno de machos adultos.

Independente do sexo do animal, isoformas de metaloproteinases são componentes expressivos no veneno dos adultos, majoritariamente na faixa de 50 kDa e $pI \sim 5,0$ (*spot* 1 da Figura 12- A e B e isoformas adjacentes, por exemplo).

Uma característica interessante foi verificada no veneno dos machos adultos: um fator de crescimento de nervo (svNGF) (*spot* 5, Figura 12-A), pouco expressivo no veneno de fêmeas adultas.

4.1.2 Sub-proteoma de proteinases e reconhecimento pelo soro anti-botrópico produzido pelo Instituto Butantan

A análise do sub-proteoma de metaloproteinases dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* por imunocoloração (*Western blot* uni e bidimensional) com anticorpos específicos mostrou a presença expressiva de metaloproteinases tanto nos venenos de filhotes quanto de adultos. A Figura 13-A mostra a distribuição de metaloproteinases nos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*. É possível perceber uma grande reatividade do anticorpo com proteínas ácidas, variando de 70 a 20 kDa. O sub-proteoma de serinoproteinases também se mostrou similar entre os venenos de filhotes e adultos, contudo, o veneno de adultos apresentou maior reatividade com proteínas ácidas na faixa de aproximadamente 30 kDa (Figura 13-B).

Embora com algumas diferenças aparentemente relativas à idade, verificamos também um extenso reconhecimento de proteínas nos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* pelo soro anti-botrópico comercial, produzido pelo Instituto Butantan (Figura 13-C).

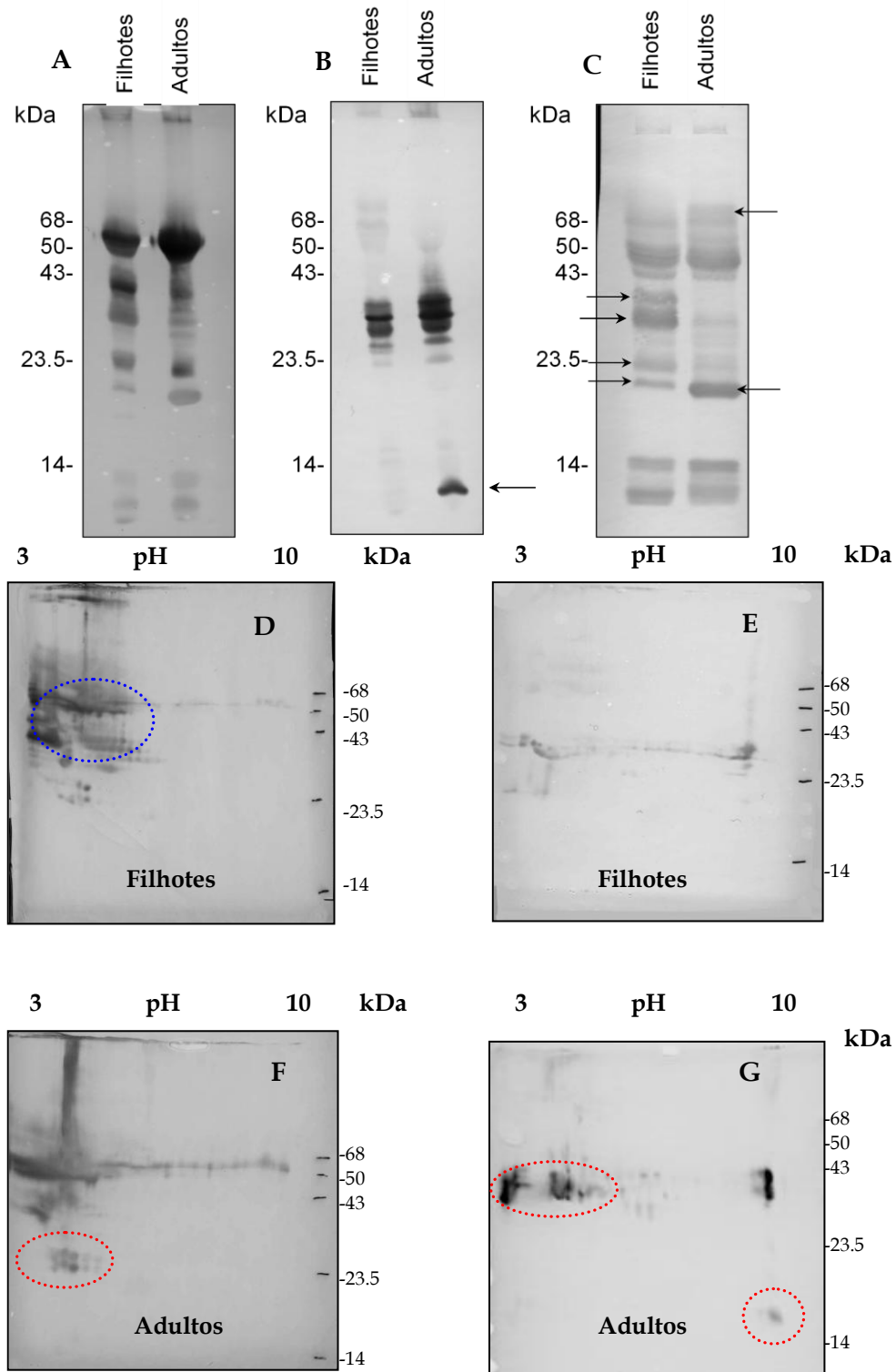


Figura 13: Sub-proteoma de proteinases dos venenos de filhotes e adultos de *B.jararaca* e reconhecimento dos venenos pelo soro antitetrápico. Fitas de pH imobilizado (7 cm, pH 3-10, linear) foram reidratadas com 200 μ g de solução de veneno de filhotes ou adultos de *B.jararaca* e, após a focalização isoeétrica e segunda dimensão (géis 12% SDS-poliacrilamida), as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à imunocoloração com anticorpos primários policlonais: **A, D e F** - anti-bothropasina (1:500 v/v); **B, E e G** - anti-MSP1/2 (1:500, v/v) ou **C** - soro anti-bothrótico (1:500). Nos géis unidimensionais foram aplicados 50 μ g de proteínas. As setas e elipses denotam diferenças majoritárias entre as amostras.

4.1.3 Sub-proteoma de gelatinases - Zimografia

A atividade proteolítica dos venenos de filhotes e adultos foi avaliada pela técnica de zimografia em que utilizamos um substrato (gelatina) co-polimerizado com o gel de SDS-poliacrilamida, tanto para os géis unidimensionais quanto para os bidimensionais. A Figura 14 mostra uma concentração de proteinases nas regiões de aproximadamente 45 e 20 kDa comuns aos venenos de venenos de filhotes e adultos. Contudo, levando-se em consideração a quantidade de proteína aplicada no gel (igual para as duas amostras -filhotes e adultos), é possível perceber que a área de gelatinólise é maior no veneno de adultos. A zimografia bidimensional mostra uma intensa atividade gelatinolítica na porção ácida do gel, sendo, portanto uma provável atividade de proteinases ácidas. Novamente, o veneno de adultos apresentou atividade mais intensa sobre este substrato.

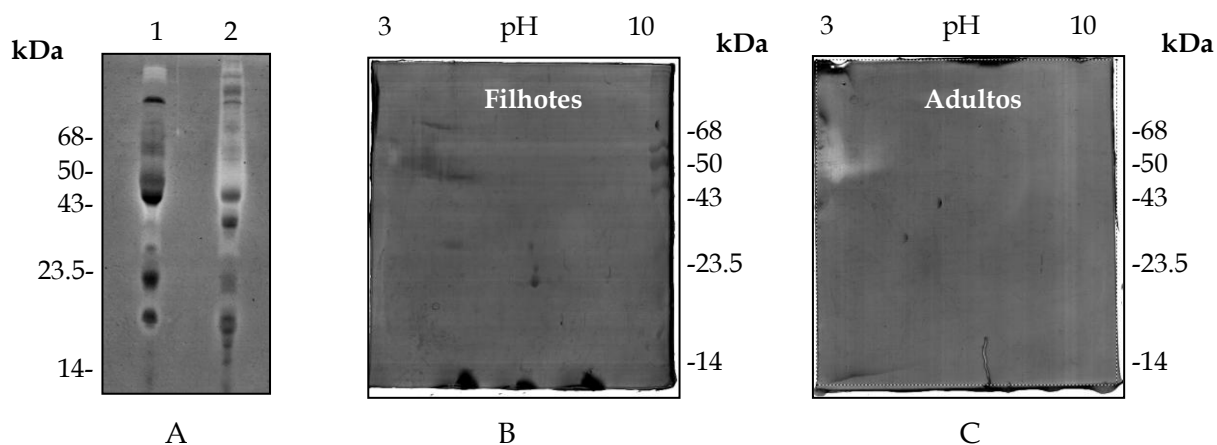


Figura 14: Zimografia em gel de SDS poliácridamida (12%) contendo gelatina. **A-**Zimografia do veneno de filhotes (1) e adultos (2) de *B. jararaca* (25 μ g de proteínas foram aplicados no gel unidimensional). **B e C-** Zimografia do veneno de filhotes e adultos de *B. jararaca*, respectivamente, em gel bidimensional (300 μ g de proteínas; fitas de 7 cm, pH 3 a 10, linear). Coloração com azul de Coomassie R-250.

4.1.4 Proteômica quantitativa

A Figura 15 apresenta o perfil de eluição dos peptídeos derivatizados com os reagentes iTRAQ™, posteriormente agrupados em *pools* e submetidos à cromatografia em coluna de fase reversa (conforme descrito no sub-item 3.2.3.3).

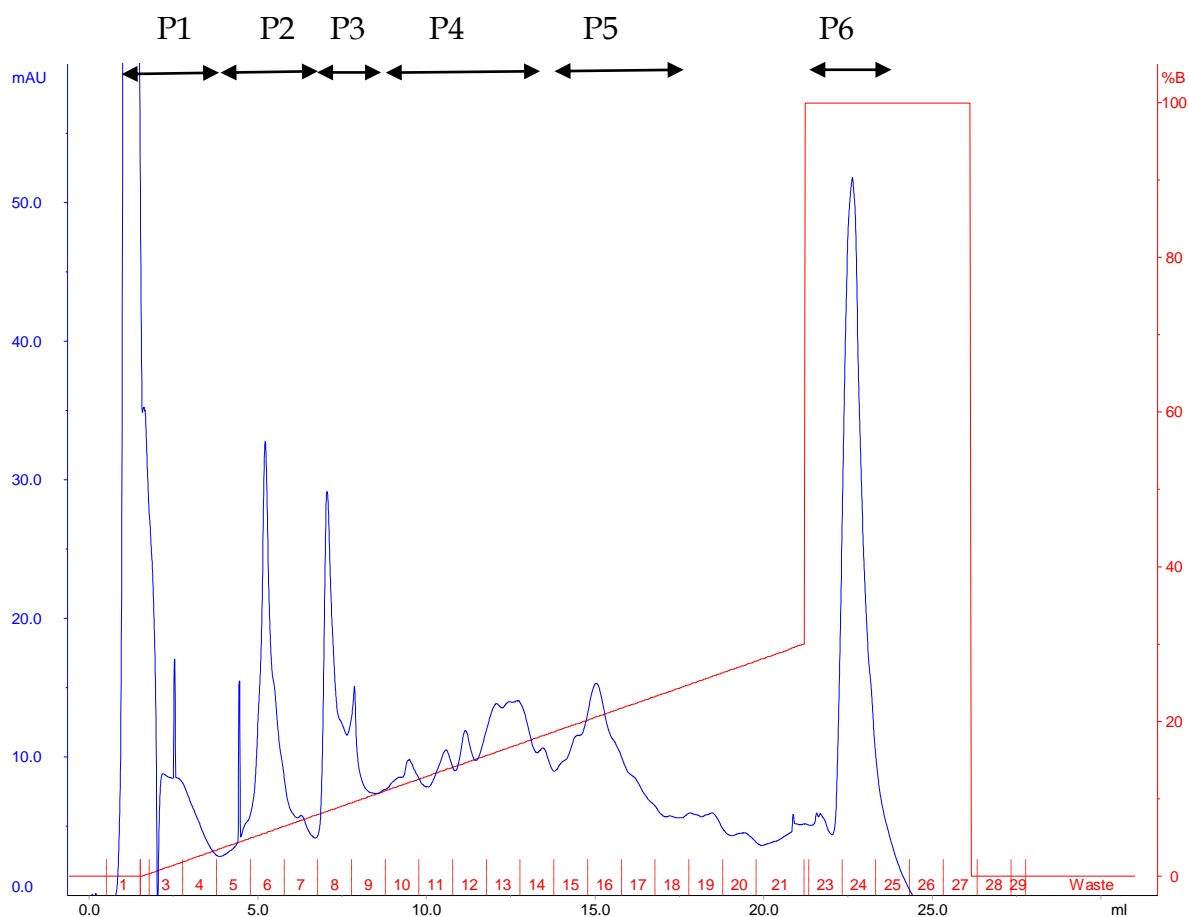


Figura 15: Perfil de eluição (monitorado a 280 nm) da mistura de peptídeos tripsínicos dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* (400 µg total) marcados com os reagentes iTRAQ™. As frações foram agrupadas em *pools* enumerados de 1 a 6.

Conforme descrito no sub-item 3.5.2, após as análises de LC-MS/MS das amostras que continham os peptídeos derivatizados, os resultados foram submetidos à identificação e quantificação e as identificações foram ainda avaliadas pelo programa Scaffold™ 3, seguindo os parâmetros especificados anteriormente. Por esta abordagem fomos capazes de identificar 55 proteínas, contudo os dados apresentados na Tabela 11 mostram apenas 29 proteínas. Esta diferença se deve ao fato de que consideramos apenas os peptídeos derivatizados com os reagentes

iTRAQ™, ou seja aqueles cuja informação quantitativa podia ser obtida; caso contrário não seria possível discriminar de qual amostra (veneno de filhotes ou de adultos) o(s) peptídeo(s) provinha(m), uma vez que os peptídeos das amostras foram agrupados após a derivatização. A Figura 16 apresenta o espectro representativo proveniente da fragmentação do íon de m/z 473,78²⁺ e a região dos íons repórteres (*tags*) que foram monitorados para a quantificação relativa.

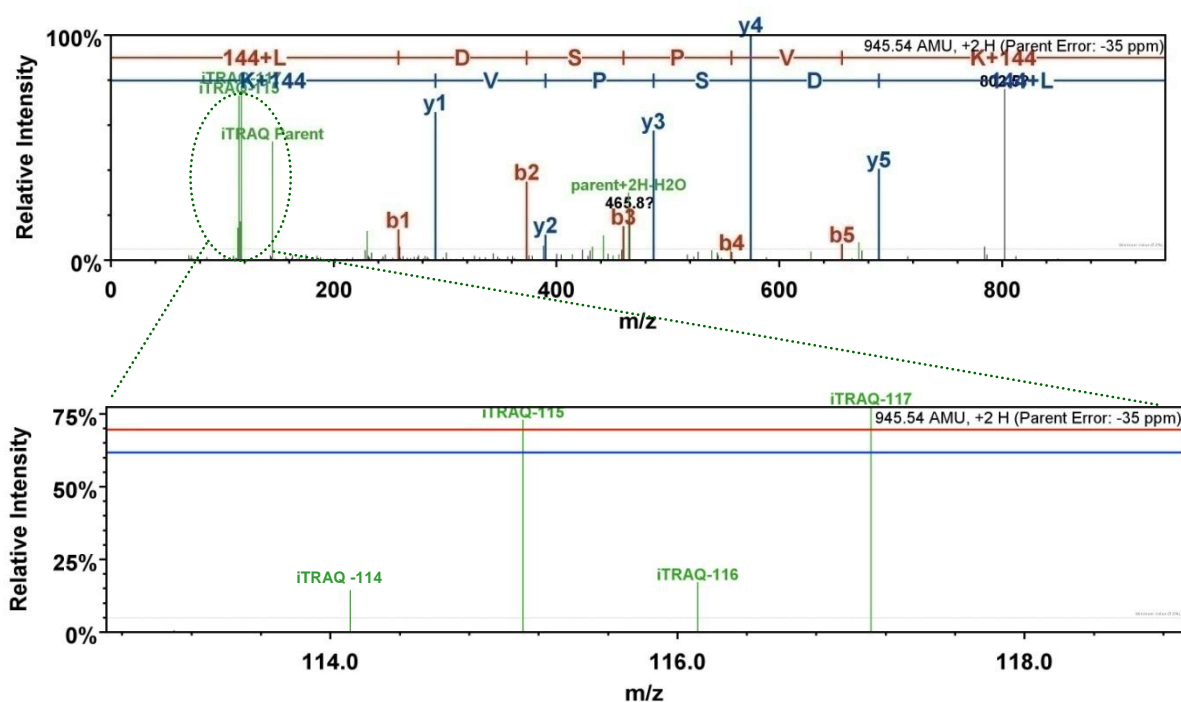
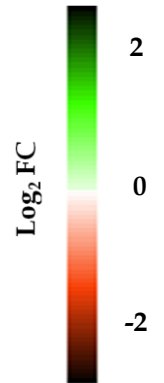


Figura 16: Espectro de fragmentação (MS/MS) do íon de m/z 473,78²⁺(peptídeo LDSPVK) identificado como sendo proveniente de uma serinoproteinase (KN-BJ; gi|13959622|). A figura inferior corresponde a uma ampliação da região de menor m/z do espectro, evidenciando a presença dos reagentes (*tags*) iTRAQ™. Espectros gerados pelo programa Scaffold™ 3.

Tabela 11: Proteínas identificadas e quantificadas no experimento de ITRAQ™.

Proteínas identificadas	NPU#	gi number*	log ₂ FC**	Desvio padrão	p-valor***
<i>Metaloproteinases (MP)</i>					
Zinc metalloproteinase-disintegrin ACLD	1	gi 82189787	-2,6	0,14	5,9E-14
Metalloproteinase atrolysin-E	1	gi 462320	-2,55	0,07	3,6E-11
Zinc metalloproteinase/ disintegrin	1	gi 82088458	-1,7	0,14	0,0022
Zinc metalloproteinase/ disintegrin	1	gi 31077169	-1,2	0,14	0,029
Zinc metalloproteinase/ disintegrin	1	gi 50400454	-0,65	0,07	8,70E-04
Metalloproteinase jararafibrase-2 (Bothrostatin)	2	gi 82219563	0,85	0,07	0,0477
Metalloproteinase insularinase-A	4	gi 82197476	1,05	0,07	0,0416
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin	4	gi 82190823	1,2	0,00	0,007
<i>Serinoproteinases (SP)</i>					
Venom serine proteinase 3	1	gi 13959638	0,0	0,28	0,62
Venom serine proteinase HS114	4	gi 82233395	0,3	0,00	0,26
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ	3	gi 6093643	0,85	0,21	0,52
Venom serine protease BthaTL	1	gi 82173559	1	0,00	0,0063
Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase 2	4	gi 13959622	1,7	0,00	1,8E-18
Venom serine protease homolog	2	gi 82240434	2,1	0,00	1,50E-06
Serine proteinase BITS01A	1	gi 82244284	-0,25	0,15	0,73
<i>Lectinas tipo C (CTL)</i>					
Bothroinsularin subunit beta	1	gi 229621685	-0,9	0,00	0,015
Bothroinsularin subunit alpha	1	gi 229621684	-0,85	0,07	0,0044
Glycoprotein IB-binding protein subunit alpha	2	gi 82116886	0,9	0,00	9,50E-04
C-type lectin clone 2100755	1	gi 82134956	2,1	0,14	0,00025



<i>Fosfolipases A2(PLA2)</i>					
Phospholipase A2, acidic	1	gi 129420	-2,5	0,00	1,30E-07
Phospholipase A2 2	2	gi 158518414	0,0	0,14	0,37
Phospholipase A2 homolog 1	1	gi 17368325	3,05	0,07	2,00E-08
Phospholipase A2 homolog 2	3	gi 17865560	3,4	0,00	7,5E-18
<i>L-aminoácido oxidases(LAAO)</i>					
L-amino acid oxidase precursor	11	gi 195927838	0,3	0,00	0,31
L-amino-acid oxidase	1	gi 123903691	0,1	0,00	0,78
L-amino-acid oxidase	1	gi 124106294	3,15	0,07	2,9E-15
<i>Proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs)</i>					
Catrin-1/2	3	gi 48428839	-1,1	0,00	0,0028
Ablomin	1	gi 48428846	-0,8	0,00	0,0043
<i>Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)</i>					
Vascular endothelial growth factor toxin	1	gi 48428663	-1,7	0,14	0,0037

#NPU: Número de Peptídeos Únicos;

**gi number* da proteína conforme o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI);

Os valores correspondem à média de 4 corridas de LC-MS/MS e estão apresentados na forma \log_2 FC (em que FC = *Fold Change*). **O valor de \log_2 FC foi calculado em relação ao veneno de filhotes (referência). Valores de \log_2 FC = 0,6 representam um aumento de 1,5 vezes na expressão relativa; \log_2 FC = 1 (2 vezes); \log_2 FC =2 (4 vezes); \log_2 FC = 3 (8 vezes);

****p*-valor obtido após Teste-t. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

De acordo com os dados contidos na Tabela 11 é possível perceber que a maioria das classes de toxinas foi amostrada com pelo menos uma proteína identificada. De uma forma geral, verificamos diferenças na quantificação relativa em todas as proteínas identificadas. Por exemplo, o peptídeo YILDK proveniente de uma L- aminoácido oxidase (Apoxina-1, gi|124106294|) apresentou uma maior abundância relativa no veneno de adultos (cerca de 8 vezes mais abundante). Por outro lado, as outras L-aminoácido oxidases identificadas não mostraram o mesmo padrão (gi|195927838| e gi|123903691|). Embora essas proteínas tenham cerca de 61% de similaridade entre si na estrutura primária (dados não mostrados), é possível que L-aminoácido oxidases de estrutura primária semelhante a Apoxina-1 (gi|124106294|) sejam de fato mais abundantes no veneno de adultos. Esse parece ser o caso também do peptídeo YWFFPAK, proveniente de uma fosfolipase ácida (gi|129420|), cuja abundância foi 6 vezes maior no veneno de filhotes. Por outro lado, os peptídeos identificados e quantificados, pertencentes à fosfolipases básicas (gi|17368325| e gi|17865560|) mostraram-se mais abundantes no veneno dos adultos. De forma semelhante, serinoproteinases também apresentaram maior abundância relativa no veneno de adultos. Outra importante diferença quantitativa entre o proteoma dos venenos de filhotes e adultos está na abundância de svVEGFs no veneno de filhotes, como evidenciado pela intensidade quase 4 vezes maior no veneno de filhotes do peptídeo NPEEGEPR (svVEGF, gi|48428663|). Embora de forma menos expressiva, proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs) apresentaram maior abundância relativa no veneno dos filhotes.

Aparentemente as metaloproteinases são mais expressas no veneno de filhotes, contudo a diferenciação entre a expressão das subclasses (P-I a P-III) não pôde ser feita. Considerações sobre este caso particular estão apresentadas na discussão deste trabalho.

4.2 Análise glicoproteômica

4.2.1 Glicoproteoma dos venenos de *B. jararaca* - coloração fluorescente para glicoproteínas e deglicosilação total das amostras de veneno

A coloração fluorescente para glicoproteínas revelou proteínas em uma ampla faixa de massa molecular e pontos isoelétricos nas amostras analisadas (variando de 14 kDa a aproximadamente 70 kDa e com *pI* variando entre 4,0 a 6,0 - Figura 17).

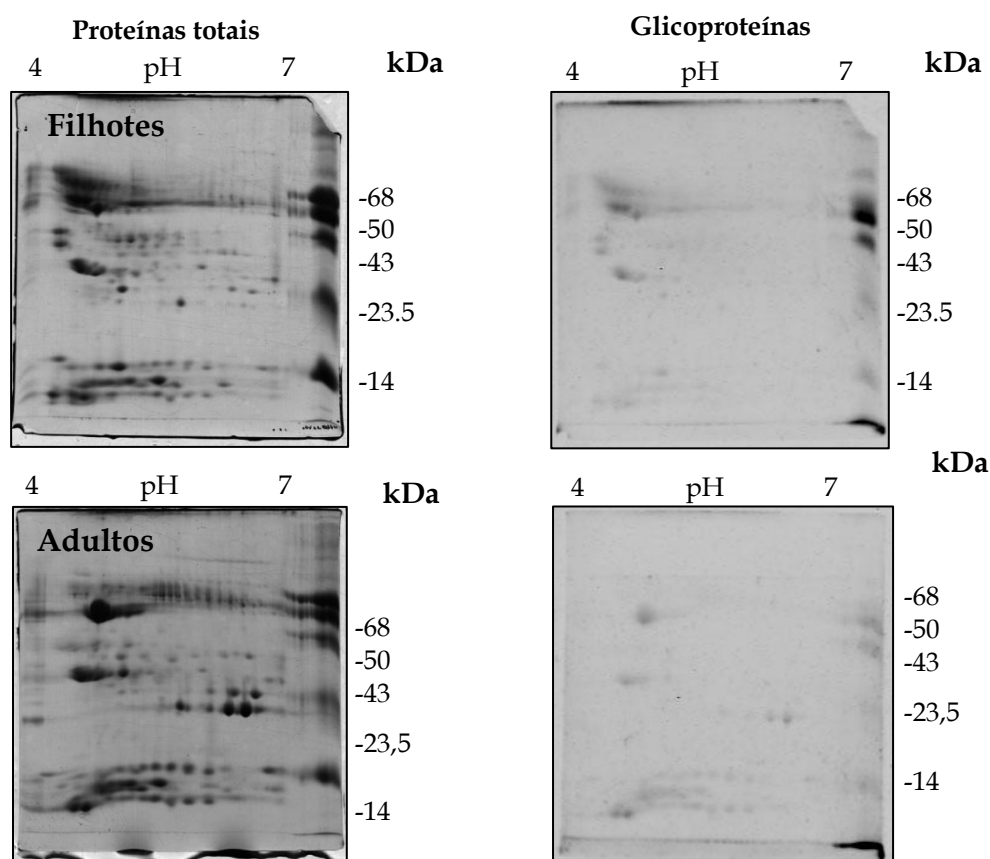


Figura 17: Coloração fluorescente para glicoproteínas (ProQ Emerald). As amostras (200µg) foram submetidas à focalização isoelétrica (fitas IPG de 7cm pH- 4-7, linear) e, em seguida, à segunda dimensão (SDS-PAGE, gel de 12% poliácridamida) em mini-géis (10 x 8 cm x 1.0 mm). Os géis da direita foram submetidos à coloração fluorescente para glicoproteínas e, em seguida à coloração com Coomassie Blue R-250 (proteínas totais- géis apresentados à esquerda). As proteínas que constituíram o nosso padrão de massa molecular serviram de controle para o experimento: soroalbumina bovina, 68 kDa (não glicosilada), cadeias pesada e leve da imunoglobulina G, 50 kDa e 23,5 kDa, respectivamente (ambas glicosiladas), ovoalbumina, 43 kDa (glicosilada) e ribonuclease A, 14 kDa (glicosilada).

Uma expressiva diferença nos perfis protéicos em géis unidimensionais foi também verificada nas análises de *N*- e *O*-deglicosilação dos venenos brutos de filhotes e adultos, sugerindo um alto (e distinto) teor de glicosilações nestes venenos (Figura 18). Optamos por realizar a deglicosilação em condições desnaturantes para poder acessar praticamente todo o conteúdo de carboidratos das proteínas dos venenos de filhotes e adultos, o que permitiu observar diferenças expressivas no perfil protéico em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

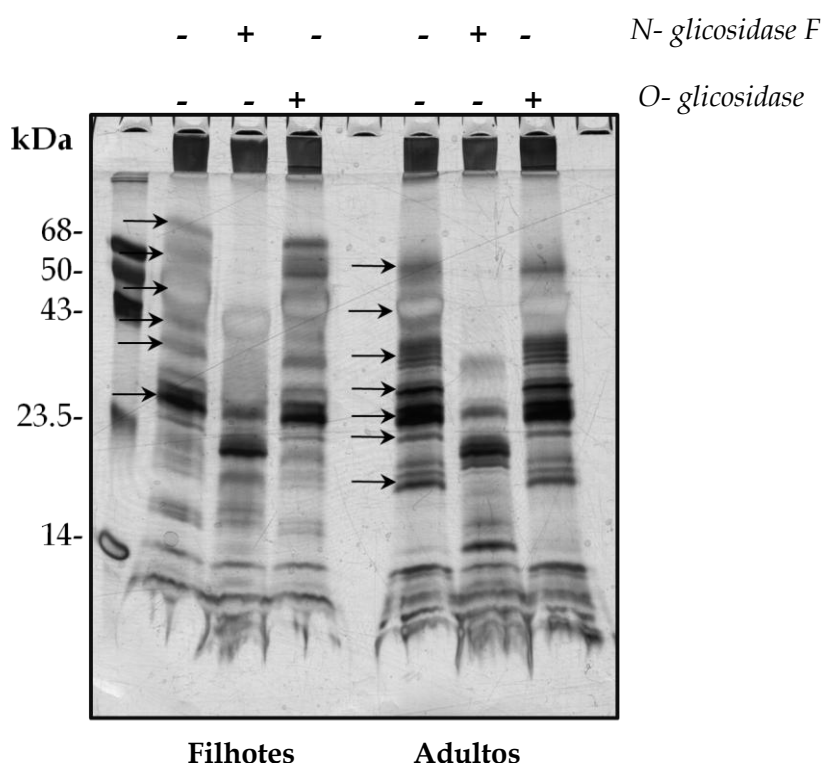


Figura 18: Deglicosilação dos venenos (15 μ g) de filhotes e adultos de *B. jararaca*, avaliada por eletroforese em gel de gradiente (8-18%) de poliácridamida. As setas representam proteínas cuja mobilidade eletroforética foi alterada após a deglicosilação. As amostras foram reduzidas com β -mercaptoetanol. Coloração com nitrato de prata.

A julgar pela diferença na mobilidade eletroforética visualizada após deglicosilação, *N*-glicosilações parecem ser mais frequentes em ambos os venenos em relação a *O*-glicosilações. Pela análise dos géis da Figura 18 foi possível perceber que proteínas de alta massa molecular (aproximadamente 50 kDa) encontram-se altamente *N*-glicosiladas em ambos os venenos (filhotes e adultos). De certa forma, os resultados da coloração fluorescente para glicoproteínas (Figura 17) têm

correspondência com aqueles apresentados na Figura 18 para os perfis protéicos das amostras de venenos de filhotes e adultos após total *N*-deglicosilação.

Visto que *N*-glicosilações parecem ser proeminentes em ambas as amostras de veneno, submetemos também os venenos à *N*-deglicosilação total sob condições desnaturantes, seguido por eletroforese bidimensional (Figura 19).

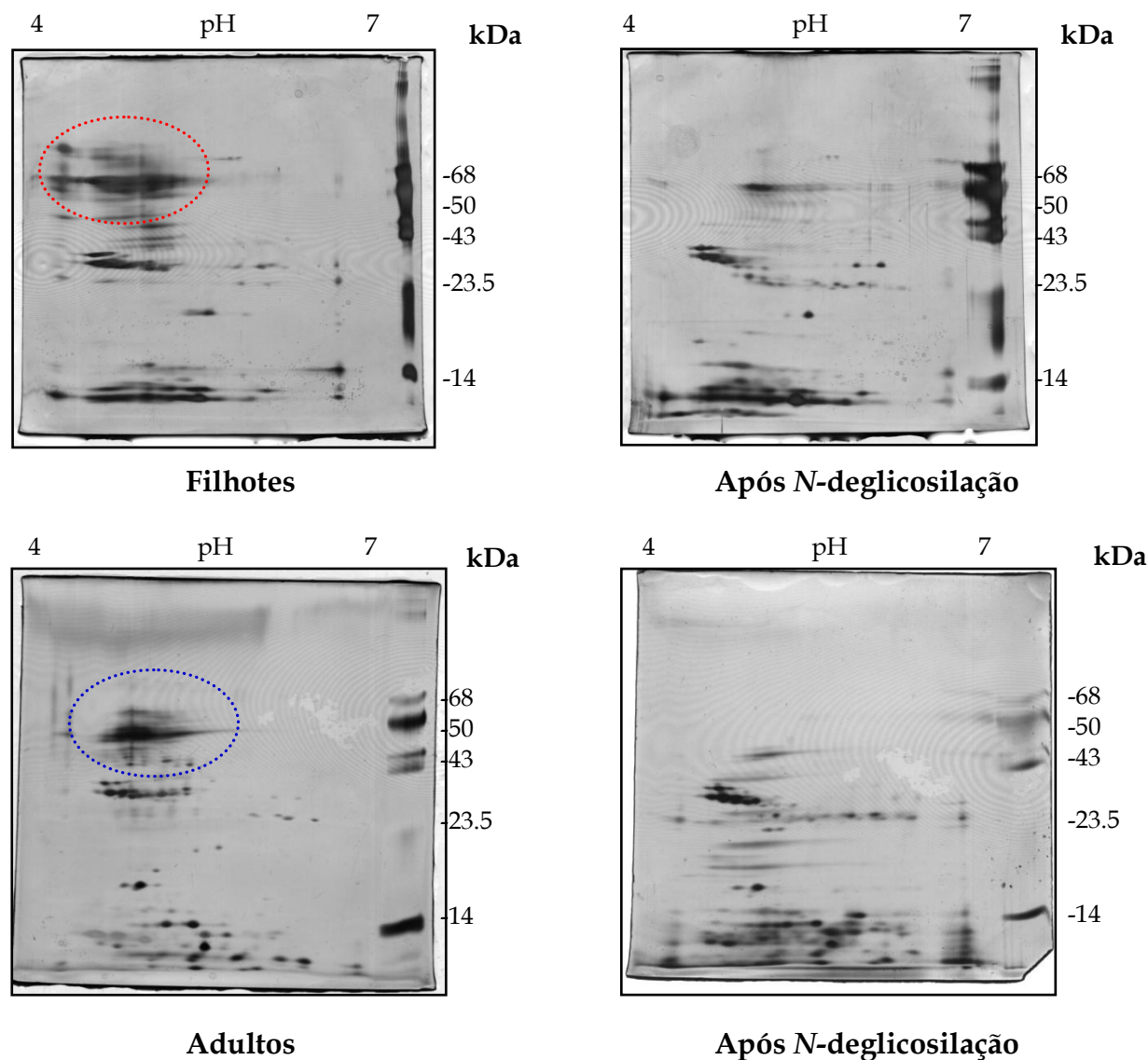


Figura 19: *N*-deglicosilação total dos venenos de filhotes e adultos sob condições desnaturantes avaliada por eletroforese bidimensional. As amostras (30 μ g) *N*-deglicosiladas ou não foram submetidas à focalização isoelétrica (fitas IPG de 7cm pH- 4-7, linear) e, em seguida, à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12% em mini-géis (10 x 8 cm x 1.0 mm). A região demarcada dnota a área que sofre grandes alterações após a *N*-deglicosilação das amostras. Coloração com nitrato de prata.

Após a completa *N*-deglicosilação dos venenos é possível perceber a ausência de proteínas ácidas, na faixa de 68 a 40 kDa, em todas as amostras analisadas. Por outro lado, verificamos também o aparecimento de uma grande quantidade de *spots* na faixa de 18 a 14 kDa (em toda a extensão de pontos isoelétricos do gel). De uma forma geral, após a completa *N*-deglicosilação dos venenos, os perfis dos venenos de filhotes e adultos, assemelham-se, embora algumas diferenças ainda possam ser notadas. Estes resultados demonstram o importante papel de modificações pós-traducionais (*N*-glicosilações) na variabilidade dos venenos, como será discutido adiante.

4.2.2 Cromatografia em coluna de afinidade (Concanavalina A - sepharose) e análise proteômica (LC-MS/MS) das proteínas ligadas

Após a cromatografia dos venenos de filhotes ou adultos na coluna de Concanavalina A - sepharose verificamos que apenas cerca de 5% da proteínas interagiu com a resina, conforme observado na Tabela 12, e que a recuperação foi similar entre as amostras analisadas.

Tabela 12: Cálculo de rendimento de glicoproteínas presentes nas amostras de veneno submetidas à cromatografia em coluna de Concanavalina A- Sepharose.

Amostras	Recuperação (%)*
Veneno de filhotes	100%
Proteínas não adsorvidas (<i>flowthrough</i>)	67,6%
Eluato	4,9%
Veneno de adultos	100%
Proteínas não adsorvidas (<i>flowthrough</i>)	66%
Eluato	5,1%

*A recuperação foi calculada levando-se em consideração que uma solução de veneno de filhotes e adultos na concentração de 1 mg/mL em *binding buffer* apresentava uma absorbância (a 280 nm) de 1,089 e 1,549, respectivamente. O cálculo da recuperação foi efetuado a partir deste valor (levando-se em consideração os valores de leitura espectrofotométrica a 280 nm das amostras eluídas da coluna).

Pela análise da Figura 20 é possível perceber que a maior parte das proteínas que interagiram com a lectina Concanavalina A estão na faixa de 70 a 25 kDa em ambas as amostras de veneno (filhotes e adultos).

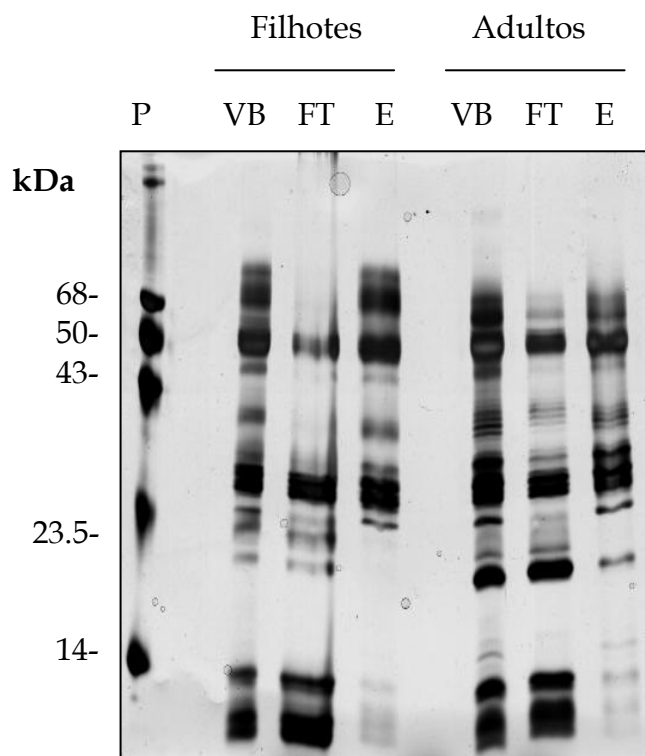


Figura 20: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) dos venenos (5 μ g) de filhotes e adultos de *B. jararaca* sob condições redutoras. **P:** padrão de massa molecular; **VB:** Veneno bruto; **FT:** material não adsorvido à coluna de Concanavalina-A (*flowthrough*); **E:** eluato. Coloração com nitrato de prata.

No intuito de se verificar a identidade das proteínas que interagiram com a coluna de concanavalina A, submetemos os eluatos de ambas as amostras à digestão tripsínica em solução, seguida por análise por LC-MS/MS. O resultado desta abordagem mostrou que metaloproteinases, serinoproteinases, lectinas tipo C e L-aminoácido oxidases estão entre as classes de toxinas que apresentaram interação com a lectina (Tabela 13), sendo eluídas na fração de 0,5 M de D-glicose em *binding buffer*. Uma análise bioinformática de predição de sítios de glicosilação mostrou que estas proteínas, em sua maioria, apresentam sítios putativos de glicosilação, fato que valida a estratégia utilizada para captura de glicoproteínas, embora a grande heterogeneidade de glicanos associados a proteínas possa ser um dos principais fatores responsáveis pelo pequeno rendimento (teor protéico) obtido neste experimento.

Tabela 13: Identificação de proteínas (LC-MS/MS) presentes no eluato da cromatografia realizada na coluna de concanavalina A- Sepharose.

Proteína identificada	gi number ¹	Classe de toxina NPU ²	CS(%) ³				Sítios de glicosilação ⁴
			F	A	F	A	
Venom serine proteinase HS114	gi 82233395	SP	7	5	41.1	36.8	N20
Venom serine proteinase-like	gi 123883733	SP	7	7	36.8	39.4	N20
Venom serine protease homolog	gi 82240434	SP	7	3	42.7	24.2	N59
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ	gi 6093643	SP	4	2	17.5	19.8	N20; S23
Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase 2	gi 13959622	SP	-	2	-	12.8	N78;N145;N226
Thrombin-like enzyme batroxobin	gi 114837	SP	2	-	13.3		N225
Putative serine protease	gi 126035656	SP	2	2	12.4	12.4	N23;N27;N117;N131;N135
Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	MP	4	6	14.3	17.2	N183
Batroxstatin-1	gi 205278803	MP	4	-	20.6		N29;N74
Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	MP	2	2	12	6.93	N69;N123;N183;N329;N394
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-2	gi 123905787	MP	6	-	39		-
Zinc metalloproteinase-disintegrin atrolysin-A	gi 75570463	MP	2	-	8.83		N72;N326
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-3	gi 123905786	MP	2	-	25.5		-
Zinc metalloproteinase/disintegrin	gi 52000724	MP	4	-	12.2		N107; N159
Zinc metalloproteinase-disintegrin berythactivase	gi 82216043	MP	3	-	10.3		N73;N161;N187
Batroxstatin-3	gi 205278807	MP	2	-	9.66		N7;T27;N70
L-amino acid oxidase precursor	gi 195927838	LAAO	15	6	35.8	24.1	N172; T332
Coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit B	gi 82116580	LTC	2	-	93.3		-
Glycoprotein IB-binding protein subunit beta	gi 82116883	LTC	2	-	24.4		-

¹ gi number de acordo com a nomenclatura adotada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI);

²Número de Peptídeos Únicos-NPU- (proteínas identificadas com apenas um único peptídeo não foram consideradas para análise);³Porcentagem de

cobertura de seqüência; ⁴Sítios de N e O glicosilação, preditos a partir da estrutura primária das proteínas maduras utilizando-se os softwares NetNGlyc

Server 1.0 e OGPET v 1.0, respectivamente (disponíveis em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> e

<http://www.ogpet.utep.edu/OGPET/index.php>, respectivamente). MP- Metaloproteinase; SP - Serinoproteinase; LAAO - L-aminoácido oxidase; LTC -

4.2.3 N-glicoma dos venenos de filhotes e adultos

A análise do N-glicoma dos venenos de filhotes e adultos revelou que as principais classes de N-glicanos são do tipo híbrido/complexo, seguida pelo tipo rico em manose (Tabela 14).

Tabela 14: Lista da composição de N-glicanos liberados de glicoproteínas das amostras de veneno de filhotes e adultos de *B. jararaca*. As massas em itálico representam íons que foram selecionados para análise de MSⁿ.

Massa observada	z	Estrutura putativa*	Erro	Massa da glicofoma	Tipo**	GSDB***
809.6	2	(Hex)2 + (Man)3(GlcNAc)2	0.485	1510.7	RM	4027-2818 e 4027-2059
815.0	2	(HexNAc)1 (Desoxihexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.569	1521.8	H/C	
830.0	2	(Hex)1 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.359	1551.7	H/C	
911.7	2	(Hex)3 + (Man)3(GlcNAc)2	0.586	1714.8	RM	4037-2818 e 4037-2059
917.1	2	(Hex)1 (HexNAc)1 (Desoxihexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.47	1725.8	H/C	
932.8	2	(Hex)2 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.659	1755.8	H/C	
937.8	2	(HexNAc)2 (Desoxihexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.643	1766.8	H/C	3099-1432
1013.7	2	(Hex)4 + (Man)3(GlcNAc)2	0.486	1918.9	RM	4039-2818 e 4039-2059
1019.2	2	(Hex)2 (HexNAc)1 (Desoxihexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.57	1929.9	H/C	
1034.2	2	(Hex)3 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.559	1959.9	H/C	
1039.8	2	(Hex)1 (HexNAc)2 (Desoxihexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.543	1970.9	H/C	3097-1432
1054.7	2	(Hex)2 (HexNAc)2 + (Man)3(GlcNAc)2	0.433	2001.0	H/C	
1074.4	2	(Hex)1 (HexNAc)3 + (Man)3(GlcNAc)2	-1.293	2042.0	H/C	
1115.8	2	(Hex)5 + (Man)3(GlcNAc)2	0.486	2123.0	RM	4041-2818 e 4041-2059
1121.3	2	(Hex)3 (HexNAc)1 (Desoxihexose)1 + (Man)3(GlcNAc)2	0.57	2134.0	H/C	
1135.8	2	(Hex)4 (HexNAc)1 + (Man)3(GlcNAc)2	-0.54	2164.0	H/C	

1141.8	2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.444	2175.0	H/C	3095-1432
1156.8	2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.433	2205.1	H/C	
1175.7	2	(HexNAc) ₁ (Desoxihexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	-0.777	2244.1	H/C	
1182.8	2	(HexNAc) ₄ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.391	2257.1	H/C	1149-1432
1243.9	2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.544	2379.1	H/C	
1264.3	2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.417	2420.	H/C	
1307.3	2	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Desoxihexose) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.38	2506.2	H/C	
1314.9	2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Desoxihexose) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	-1.534	2523.2	H/C	6879-2818
1321.9	2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Desoxihexose) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	-0.529	2536.2	H/C	1395-1097
1326.3	2	(Hex) ₅ (HexNAc) ₁ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1.67	2542.2	H/C	
1359.4	2	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Desoxihexose) ₄ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1.528	2609.3	H/C	
1362.9	2	(HexNAc) ₄ (Desoxihexose) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	-0.582	2618.3	H/C	3105-1432
1366.4	2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.517	2624.3	H/C	
1391.9	1	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂	0.185	1306.6		4025-2059
1539.9	2	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Desoxihexose) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂ (Hex) ₁	-0.76	2972.4	H/C	
1551.0	2	(HexNAc) ₇ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1.412	2992.5	H/C	
1591.5	2	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1.491	3073.5	H/C	
1596.0	1	(Hex) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.185	1510.7	RM	4027-2818 e 4027-2059
1678.0	1	(HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.132	1592.8	H/C	
1800.0	1	(Hex) ₃ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	0.186	1714.8	RM	4027-2818 e 4027-2059
2710.4	1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Desoxihexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂	1.017	2624.3	H/C	

Abreviações: Hex= hexose, GlcNAc = N-acetilglicosamina, Man= manose, NeuAc= ácido neuramínico.

* De acordo com o programa Glycomod (<http://ca.expasy.org/tools/glycomod/>).

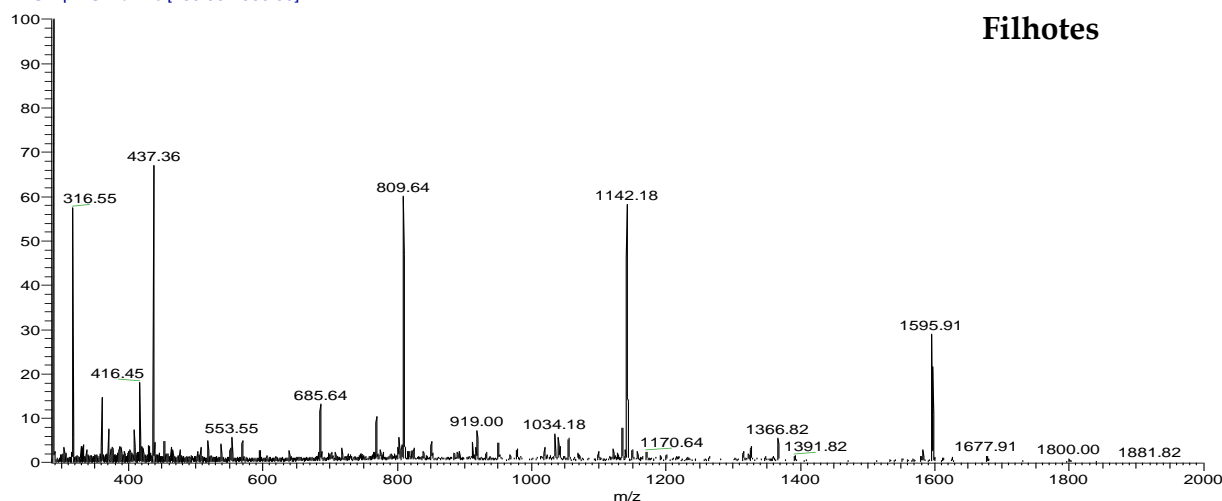
**Classificação da estrutura: RM= rico em manose; H/C= híbrido/ complexo

*** *GlycoSuite database accession number* (<http://glycosuitedb.expasy.org/glycosuite/glycodb>).

As massas apresentadas em **vermelho** correspondem aos íons selecionados para MSⁿ para determinação da topologia isomérica.

Uma característica interessante inerente a esta análise foi que não verificamos nenhuma composição de *N*-glicanos que pudesse indicar uma diferença entre as amostras analisadas, ou seja, a composição de *N*-glicanos liberados das glicoproteínas dos venenos de filhotes e adultos foi idêntica (Figura 21).

Newborn_N glycans_full scan #1-25 RT: 0.00-0.21 AV: 25 NL: 5.42E5
T: ITMS + p ESI Full ms [285.00-2000.00]



Adult_N glycans_full #1-26 RT: 0.00-0.20 AV: 26 NL: 8.50E5
T: ITMS + p ESI Full ms [300.00-2000.00]

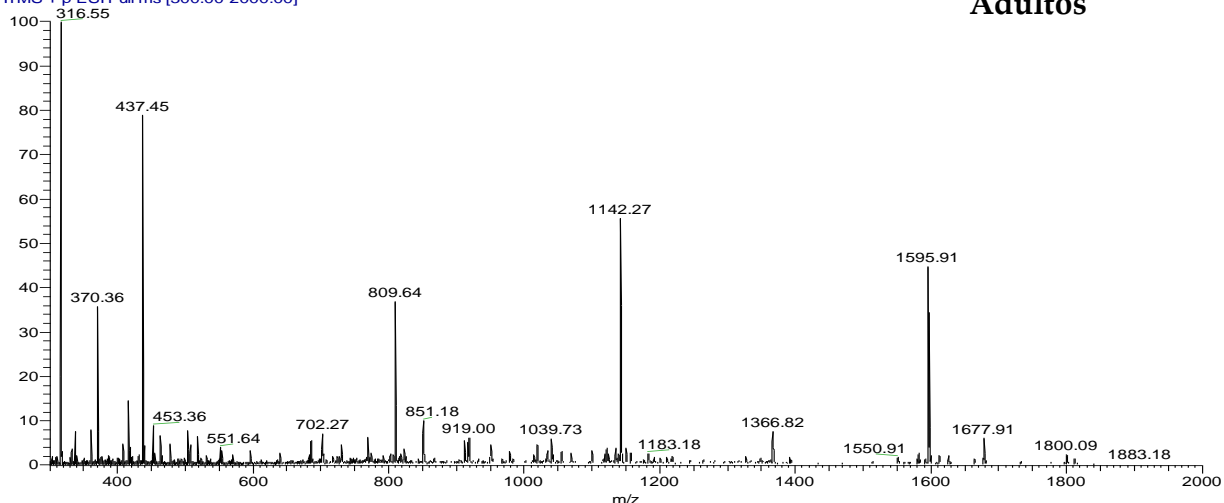


Figura 21: Espectro representativo (MS^1) da análise de dos *N*-glicanos liberados das glicoproteínas (1 mg) dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Como apresentado na Tabela 14, foram verificados alguns íons que apresentaram identidade no banco de dados de composição de glicanos *GlycoSuite database* (GSDB; <http://glycosuitedb.expasy.org/glycosuite/glycodb>). Por exemplo, a composição $(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_2$, já havia sido reportada para o íon 1596.0

$[M+Na]^+$ como sendo a de um glicano *N*-ligado a uma lectina com especificidade por galactose, isolada do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* (número de acesso no GSDB 4027-2059) (Zeng *et al.* 1999), ou *N*-ligado ao *Cobra Venom Factor* isolado da serpente *Naja kaouthia* (número de acesso no GSDB 4027-2818) (Gowda *et al.* 2001).

Dado o fato de uma mesma composição glicídica poder apresentar uma diversidade de estruturas possíveis (isômeros estruturais), três dos íons mais abundantes presentes no espectro de MS^1 de *N*-glicanos do veneno de filhotes e adultos foram selecionados para determinação da topologia isomérica. A lógica por trás deste tipo de abordagem que utiliza espectrômetros do tipo *Ion Trap* (pioneiramente introduzida pelo grupo do professor Dr. Vernon N. Reinhold do *Glycomics Center*, da Universidade de New Hampshire, Durham, Estados Unidos) está apresentada na Figura 22 e revisada em Ashline *et al.* (2005).

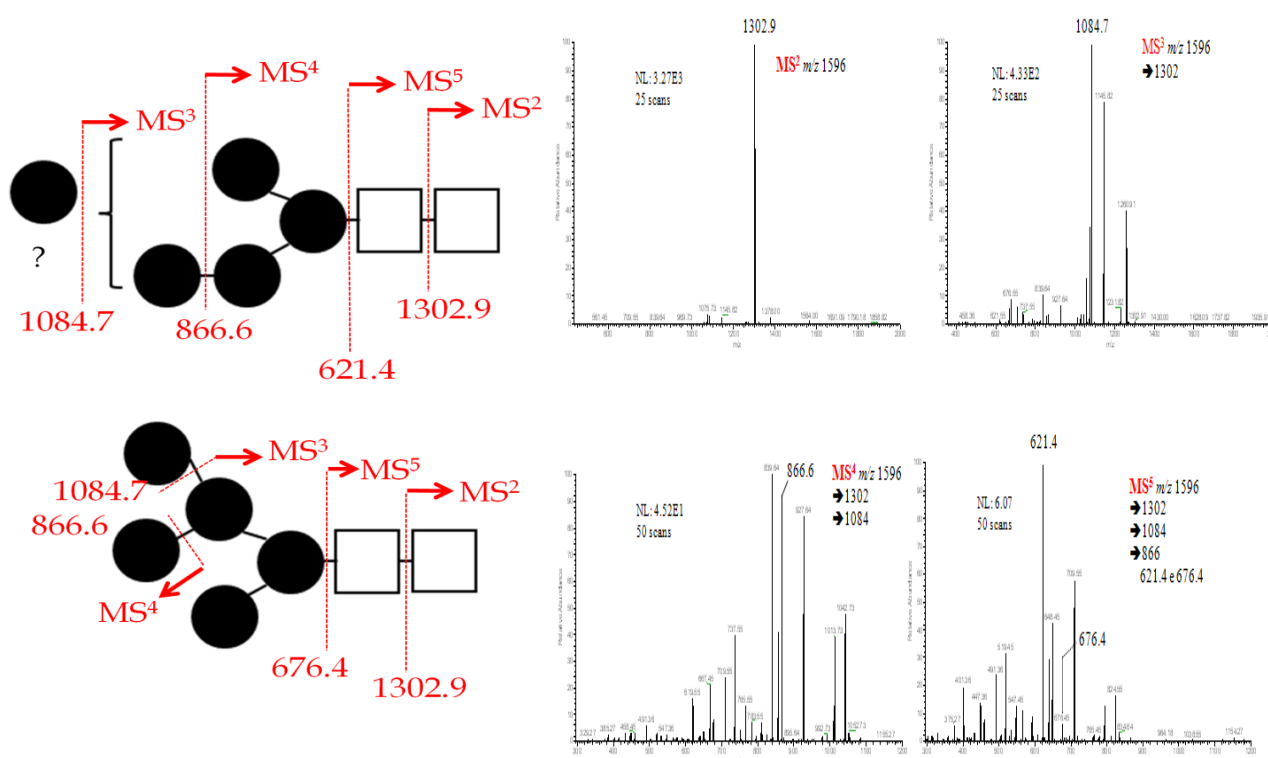


Figura 22: Detalhes estruturais de glicanos revelados por MS^n . A parte esquerda da figura apresenta duas topologias possíveis para o íon 1596.0 $[M+Na]^+$ (de composição $(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_2$) que são resolvidas por etapas seqüenciais de espectrometria de massas (MS^n) para as diferentes topologias (figura da direita).

As Figuras 23, 24 e 25 apresentam os íons selecionados para a verificação da topologia isomérica; são eles: 1596.0 $[M+Na]^+$ (composição: $(Hex)_2(Man)_3(GlcNAc)_2$), 815.1 $[M+2Na]^{2+}$ (composição: $(HexNAc)_1(Desoxihexose)_1(Man)_3(GlcNAc)_2$) e 932.2 $[M+2Na]^{2+}$ (composição: $(Hex)_2(HexNAc)_1(Man)_3(GlcNAc)_2$).

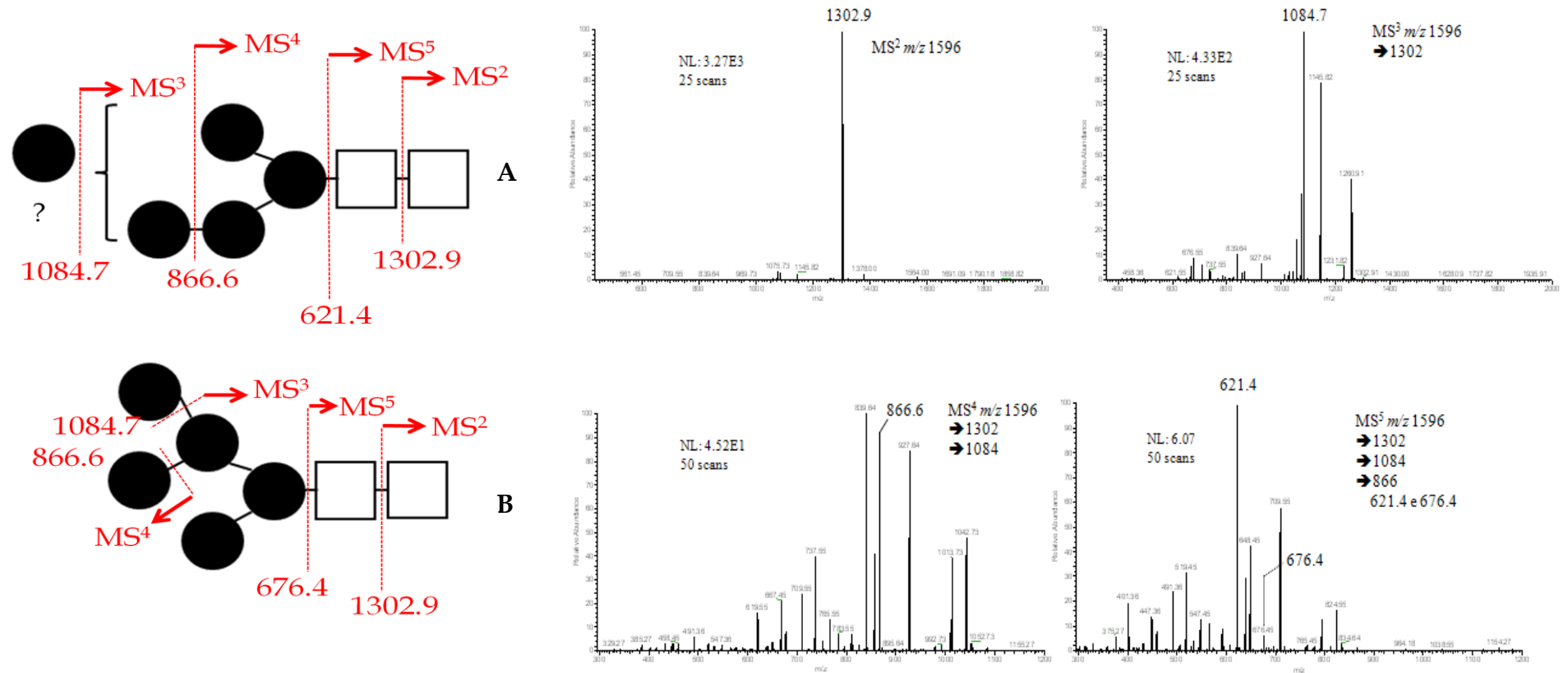


Figura 23: Vias de fragmentação seguidas para determinação de topologia de isômeros para o íon de m/z 1596. Os espectros são representativos para os *N*-glicanos de filhotes e adultos. A porção esquerda da figura indica as topologias verificadas e os espectros da direita representam as vias (MS^n) seguidas. NL: *Normalization Level intensity*. A interrogação indica posições não resolvidas do resíduo de hexose na estrutura encontrada. A e B indicam as duas topologias encontradas.

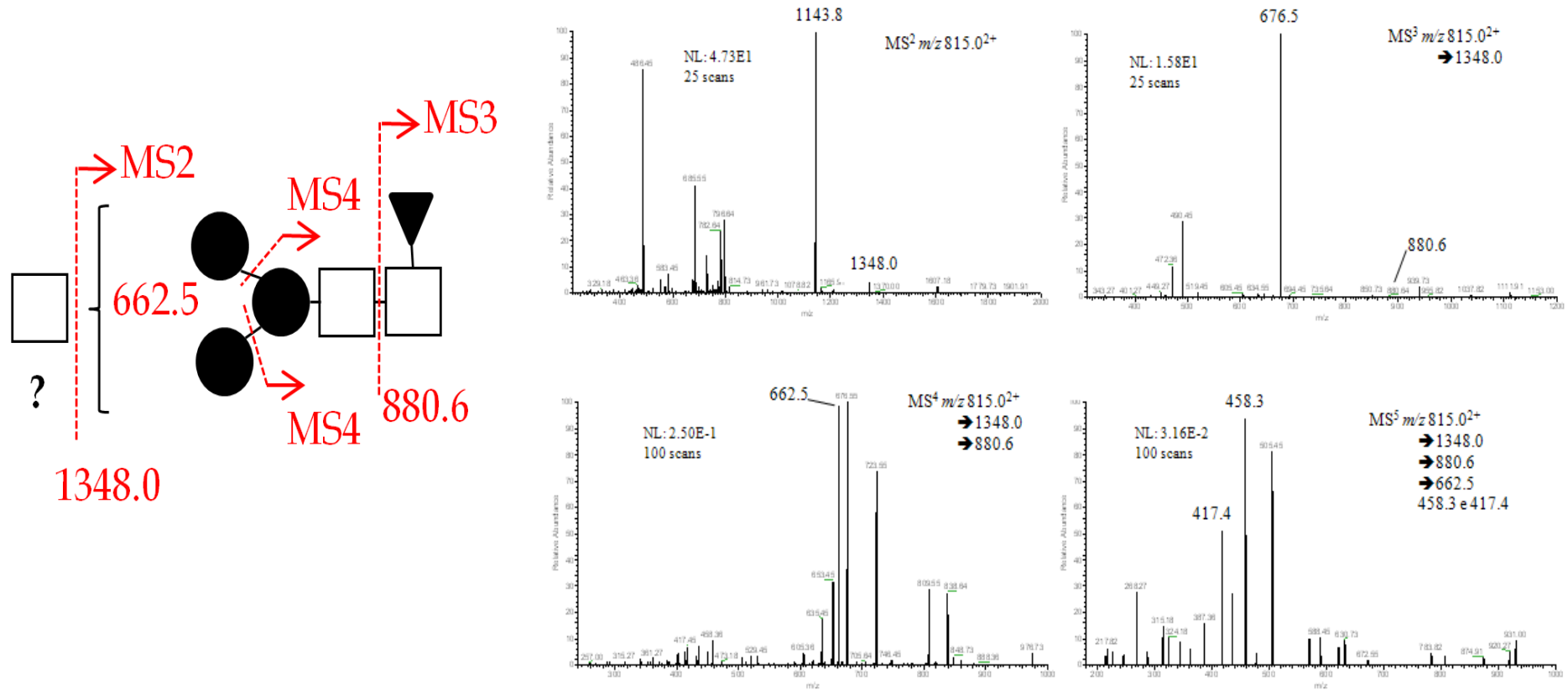


Figura 24: Vias de fragmentação seguidas para determinação de topologia de isômeros para o íon de m/z 815.02⁺. Os espectros são representativos para os *N*-glicanos de filhotes e adultos. A porção esquerda da figura indica a topologia verificada e os espectros da direita representam as vias (MSⁿ) seguidas. NL: *Normalization Level intensity*. A interrogação indica posições não resolvidas do resíduo de *N*-acetil hexosamina na estrutura encontrada.

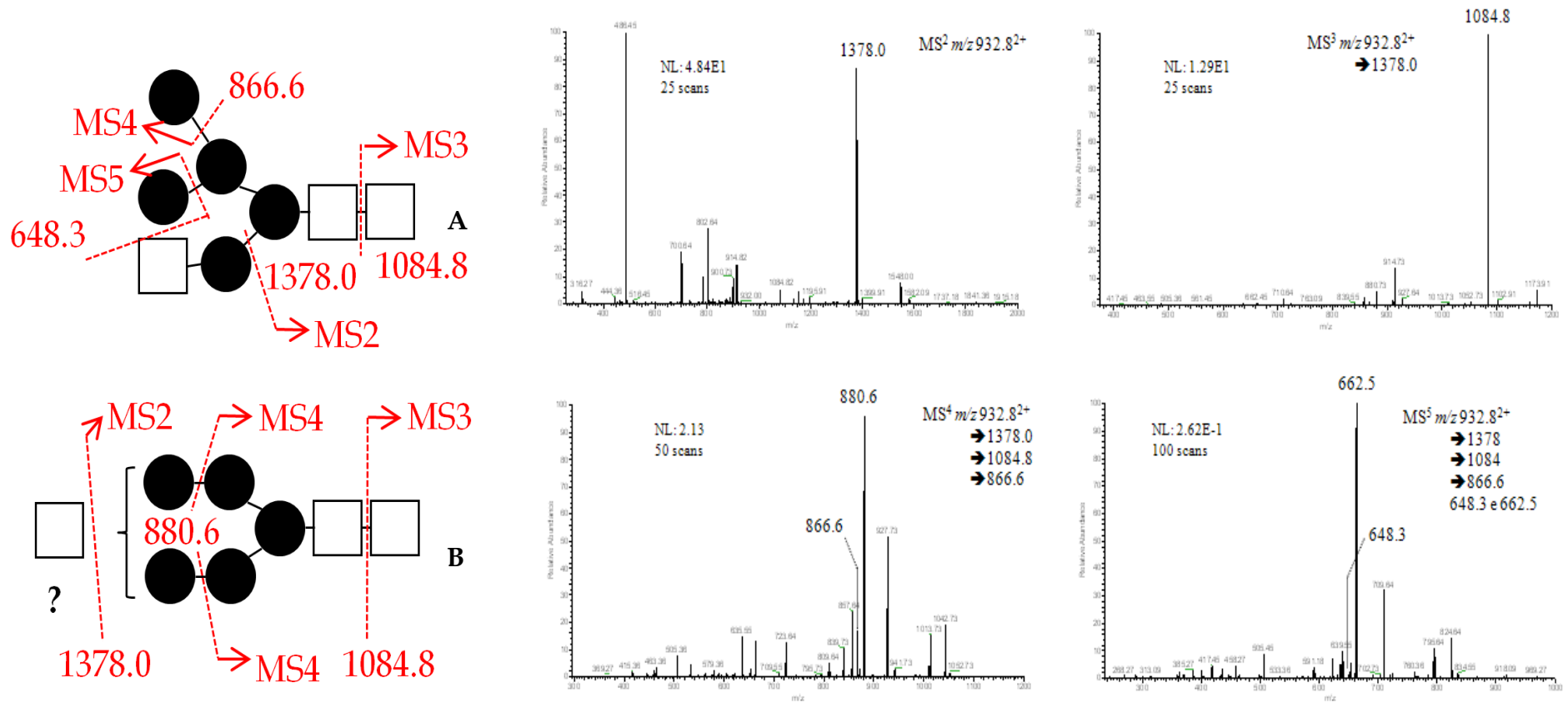


Figura 25: Vias de fragmentação seguidas para determinação de topologia de isômeros para o íon de m/z 932.8²⁺. Os espectros são representativos para os *N*-glicanos de filhotes e adultos. A porção esquerda da figura indica a topologia verificada e os espectros da direita representam as vias (MSⁿ) seguidas. NL: *Normalization Level intensity*. A interrogação indica posições não resolvidas do resíduo de *N*-acetil hexosamina na estrutura encontrada. **A** e **B** indicam as duas topologias encontradas.

A fragmentação (MS^2) do precursor de m/z 1596.0 resultou num íon proeminente da série B (m/z 1302.9), como resultado da perda neutra da extremidade redutora, como apresentado na Figura 23. A seleção deste produto (m/z 1302.9) para fragmentação posterior (MS^3) gerou um íon de m/z 1084.7, resultado da perda neutra de uma hexose terminal completamente metilada em suas hidroxilas, mas com uma hidroxila livre (originalmente participante da ligação glicosídica). Uma fragmentação subsequente (MS^4) deste produto (m/z 1084.7) resultou em outra perda neutra de uma hexose terminal completamente metilada, gerando o íon de m/z 866.6. Nesta etapa (MS^4) ainda não há uma distinção clara das duas topologias (A e B) apresentadas na Figura 23. Contudo, a fragmentação (MS^5) e análise dos íons-filho deste produto (m/z 866.6) sugerem duas topologias distintas. O fragmento de m/z 621.5 corresponde a perda neutra de um resíduo de HexNAc com uma hidroxila livre e o fragmento de m/z 676.4 corresponde a perda neutra de uma hexose com duas ramificações. Assim, de forma resumida, as vias de fragmentação (MS^n) que foram seguidas para as estruturas propostas na Figura 23 são: $1596.0 \rightarrow 1302.9 \rightarrow 1084.7 \rightarrow 866.6 \rightarrow 621.5$ (topologia A) e 676.5 (topologia B).

A fragmentação (MS^2) do precursor duplamente carregado de m/z 815.0²⁺ (Figura 24) gerou o fragmento de m/z 1348.0, como resultado da perda neutra de uma HexNAc completamente metilada com uma hidroxila livre. Contudo, o íon mais intenso deste espectro de MS^2 apresenta m/z 1143.8. Selecionando o íon m/z 1348.0 para fragmentação (MS^3) obtivemos um íon proeminente de m/z 880.6, resultado de uma perda neutra correspondente a um resíduo de HexNAc fucosilado (proveniente da extremidade redutora). A fragmentação (MS^4) deste produto (m/z 880.6) resultou no íon de m/z 662.5, que corresponde a perda neutra de um resíduo de HexNAc interno com uma hidroxila livre. Neste ponto, a estrutura mais provável é aquela apresentada na Figura 24. Embora não necessária, uma fragmentação subsequente (MS^5) do produto de m/z 662.5, gerou os íons de m/z 458.3 e m/z 417.4, que são o resultado de perdas neutras de uma hexose ramificada com uma hidroxila livre e um resíduo de HexNAc interno, respectivamente. Assim, a via de MS^n proposta para a estrutura apresentada na Figura 24 é: $1630 (= 815.0^{2+}) \rightarrow 1348.0 \rightarrow 880.6 \rightarrow 662.5$.

Finalmente, a fragmentação (MS^2) do íon duplamente carregado, de m/z 932.8²⁺, (Figura 25) gerou o fragmento m/z 1378.0, resultado da perda neutra correspondente aos resíduos HexNAc-Hex (este último com uma hidroxila livre). Selecionando este íon (1378.0) para o passo seguinte de fragmentação (MS^3), obtivemos o fragmento de m/z 1084.8, correspondente a perda neutra da extremidade redutora (Figura 25). Novamente, até este estágio (MS^3) ainda não havia nenhum indício das duas topologias (A e B) propostas pela Figura 25. A análise subsequente (MS^4) do íon de m/z 1084.8 resultou nos íons de m/z 866.6 e m/z 880.6, que correspondem a perdas neutras de uma hexose totalmente metilada e uma hexose interna com uma hidroxila livre, respectivamente. Este último produto (m/z 880.6) é um forte indício da topologia A proposta na Figura 25, enquanto o primeiro (de m/z 866.6) poderia ter vindo de ambas as topologias A e B. Por fim, a fragmentação (MS^5) do íon de m/z 866.6 gerou o íon de m/z 648.3, resultado da perda neutra de uma hexose terminal completamente metilada, evidenciando assim a estrutura proposta em B (Figura 25). Contudo, o sinal mais intenso neste espectro de MS^5 é o íon de m/z 662.5, que é o resultado da perda neutra de uma hexose ramificada com uma hidroxila livre (presente no isômero A). Assim, a via de MS^n proposta para as topologias A e B na Figura 25 são: 1865.6 (=932.8²⁺) → 1378.0 → 1084.8 → 880.6 (topologia A) e 1865.6 → 1378.0 → 1084.8 → 866.6 → 648.3 (topologia B).

Uma observação importante deste experimento de MS^n é que não verificamos nenhuma estrutura exclusiva para os *N*-glicanos liberados dos venenos de filhotes ou adultos, isto é, seguindo as vias informadas, as topologias A e B (Figuras 23 e 35) e a topologia apresentada na Figura 24 foram exatamente as mesmas para ambas as amostras de *N*-glicanos. Contudo este resultado não implica na inexistência de outras topologias para estes íons (além daquelas apresentadas nesta análise) ou mesmo outras topologias para as diversas composições que não foram analisadas por MS^n (Tabela 14). Desta forma, assumindo que a composição de *N*-glicanos parece não diferir entre as amostras é possível sugerir que as diferenças principais entre os *N*-glicanos de ambos os venenos estariam na utilização dos sítios de *N*-glicosilação, como apresentado na Figura 26 (um detalhamento pormenorizado desta hipótese será apresentado na discussão deste trabalho).

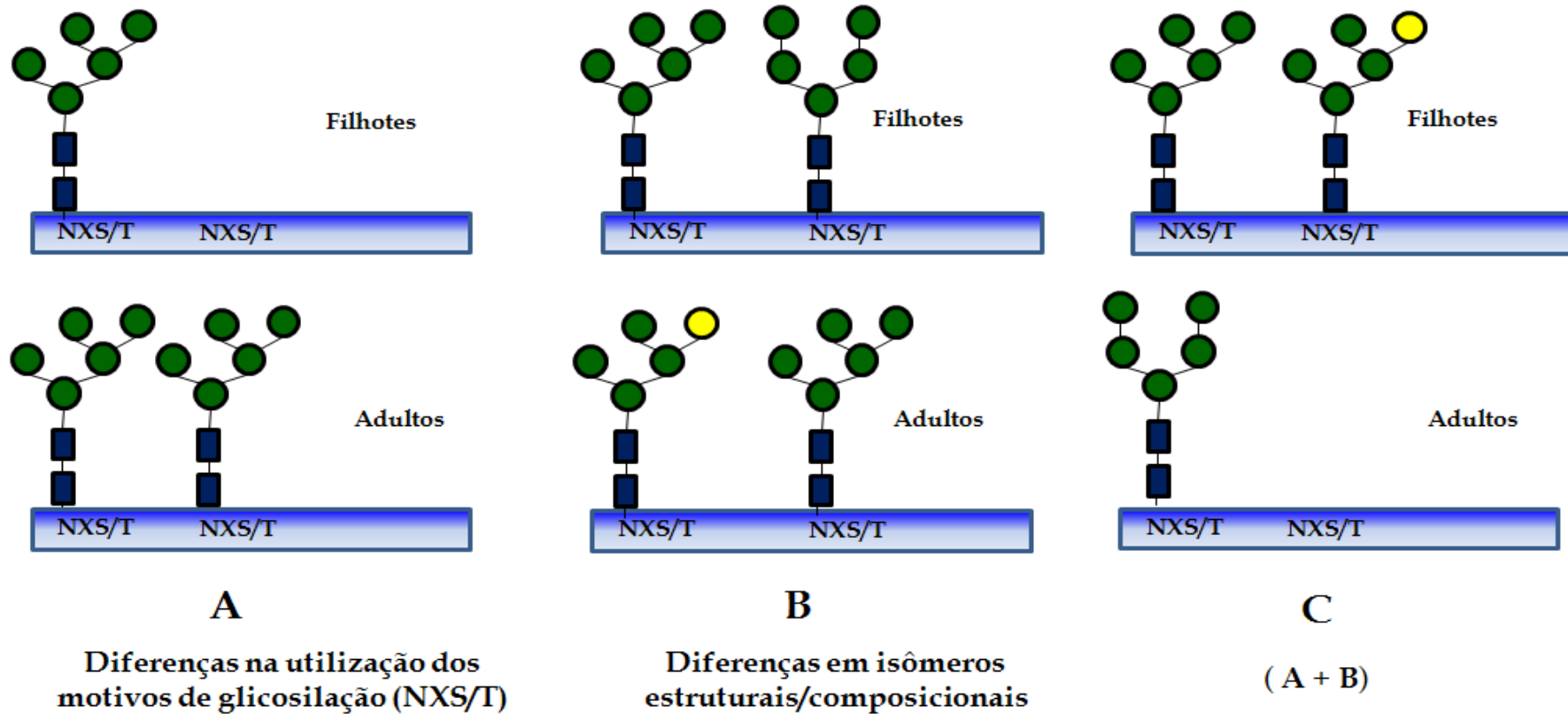


Figura 26: Hipóteses para a geração de variabilidade nas glicofomas de glicoproteínas com açúcares *N*-ligados nos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

4.3 Análise peptidômica

Pela análise do perfil peptídico dos venenos por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF, observamos perfis distintos para os venenos de filhotes e de adultos (Figura 27).

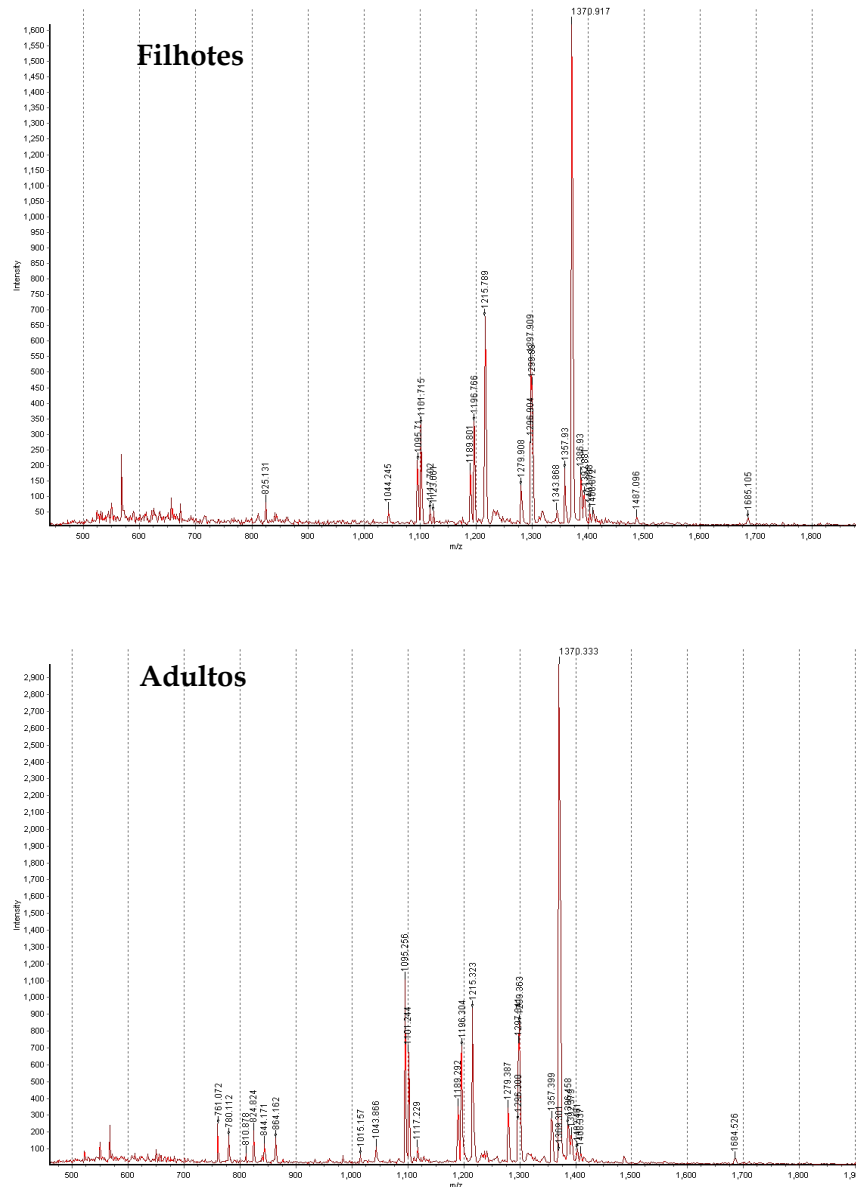


Figura 27: Espectro de massas representativo da fração peptídica dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* analisada por MALDI-ToF.

Uma incubação prévia dos venenos com inibidores de metaloproteinases e serinoproteinases (EDTA 10 mM e PMSF 2 mM, respectivamente) resultou em uma diminuição da complexidade no espectro de massas observado (Figura 28). Esses resultados sugerem a participação destas classes de enzimas em processos de proteólise de componentes dos venenos (ou até mesmo processos autolíticos), que serão discutidos adiante. A Tabela 15 apresenta as massas observadas por MALDI-ToF antes e após a incubação prévia com os inibidores (EDTA e PMSF).

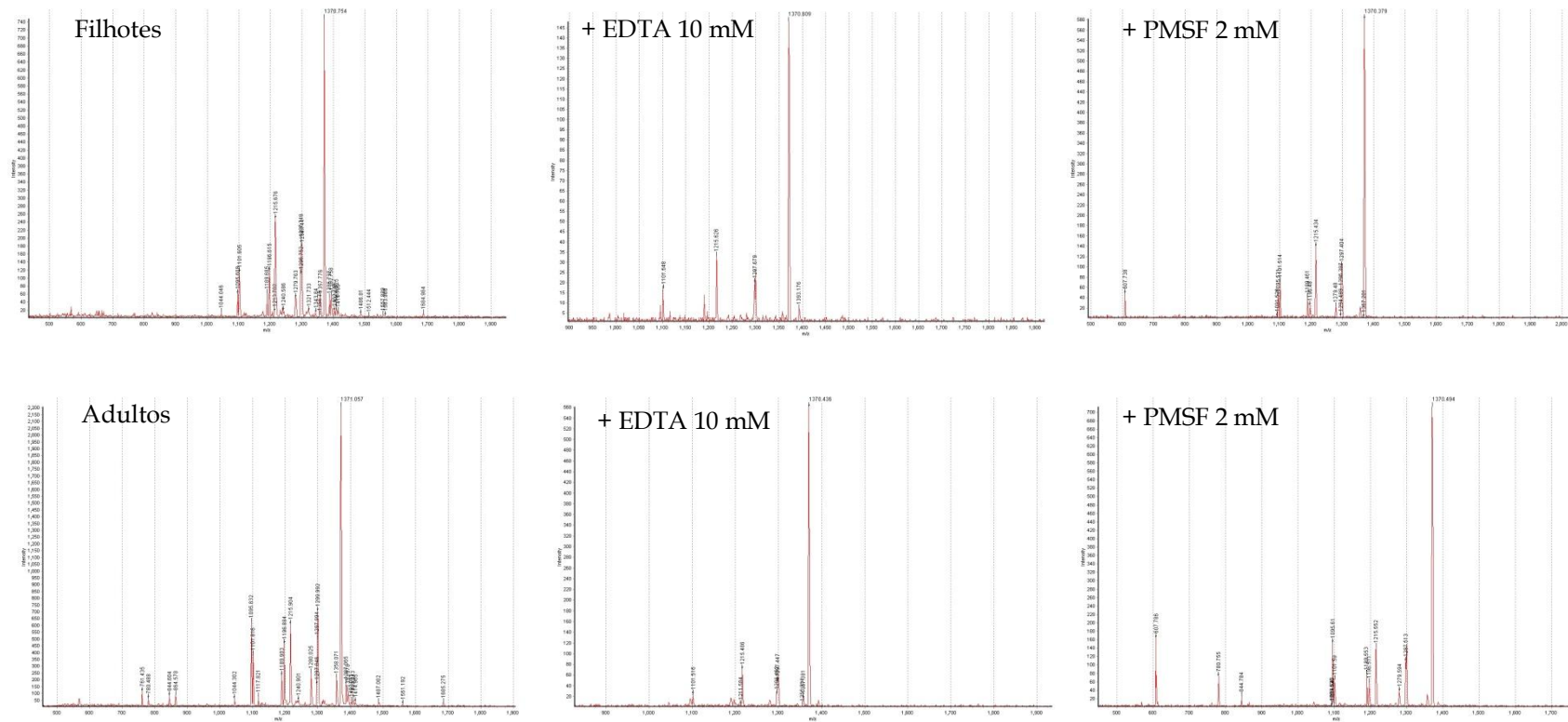


Figura 28: Espectro de massas (MALDI-ToF) representativo dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* na ausência ou presença de inibidores (EDTA 10 mM ou PMSF 2 mM).

Tabela 15: Valores de m/z obtidos na análise dos venenos de *B. jararaca* por espectrometria de massas (MALDI-ToF). Os números marcados em vermelho representam massas de peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), já descritos no veneno de *B. jararaca* (conforme Ianzer *et al.* 2004).

Amostra	m/z [M+H] ⁺	+ EDTA 10 mM	+PMSF 2 mM
Veneno de filhotes	825,1; 844,4; 1044,1; 1095,7 ; 1101,7 ; 1117,7; 1123,7;	1101,52 ;	607,74;
	1189,7 ; 1196,7 ; 1213,7; 1215,7 ; 1237,7; 1240,6;	1189,45 ;	1095,53;
	1259,7; 1279,8; 1296,8; 1297,8 ; 1299,8 ; 1331,8;	1215,65 ;	1098,53;
	1321,7; 1343,9 1353,8; 1357,9; 1368,8; 1370,8 ;	1297,55 ;	1101,50 ;
	1386,8; 1392,8; 1402,8; 1408,8; 1414,8; 1486,9 ;	1370,60	1189,46 ;
	1512,4; 1557,9; 1564,0; 1685,0 ; 1813,1		1193,48;
			1196,48 ;
			1215,42 ;
			1297,42 ;
			1343,19;
			1353,24;
			1357,15;
			1367,83;
			1370,40
Veneno de adultos	761,4; 780,4; 811,2; 825,2; 841,4; 844,6; 864,5;	607,76;	607,41;
	1015,2; 1044,3; 1095,8 ; 1011,8 ; 1117,7; 1189,8 ;	1095,61 ;	780,75;
	1196,8 ; 1215,9 ; 1240,9; 1280,0; 1296,4; 1297,2 ;	1218,43;	844,78;
	1298,1; 1300,0 ; 1358,0; 1370,3 ; 1386,9; 1393,1;	1189,53 ;	1095,29 ;
	1402,5; 1408,8; 1415,0; 1487,1; 1524,2; 1685,1	1297,45 ;	1101,43 ;
		1370,49	1187,32;
			1189,45;
			1196,37 ;
			1213,37;
			1215,43 ;
		1294,40;	
		1297,46 ;	
		1367,53;	
		1370,46 ;	

O conteúdo de peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) conhecidos não pareceu diferir expressivamente entre as amostras de veneno de filhotes e adultos. Curiosamente, o espectro obtido após a incubação prévia das amostras com EDTA 10 mM mostra que a massa 607,76 aparece apenas no veneno de adultos. Quando previamente incubado com EDTA 10 mM o peptidoma do veneno de filhotes apresentou apenas massas correspondentes a de BPPs conhecidos.

Em uma abordagem complementar, exploramos o peptidoma dos venenos de filhotes e adultos por LC-MS/MS e os espectros resultantes foram submetidos à busca em banco de dados. Neste tipo de abordagem foi possível verificar, além de espectros correspondentes a estruturas primárias de BPPs já descritos (Ianzer *et al.* 2004) alguns “novos” BPPs (Tabela 16), com estruturas primárias que diferem daquelas canônicas já reportadas na literatura toxicológica (Murayama *et al.* 1997; Ianzer *et al.* 2004). O precursor dos BPPs de *B. jararaca* foi descrito inicialmente por Murayama e colaboradores (Murayama *et al.* 1997) e apresenta uma estrutura singular, representada na Figura 29.

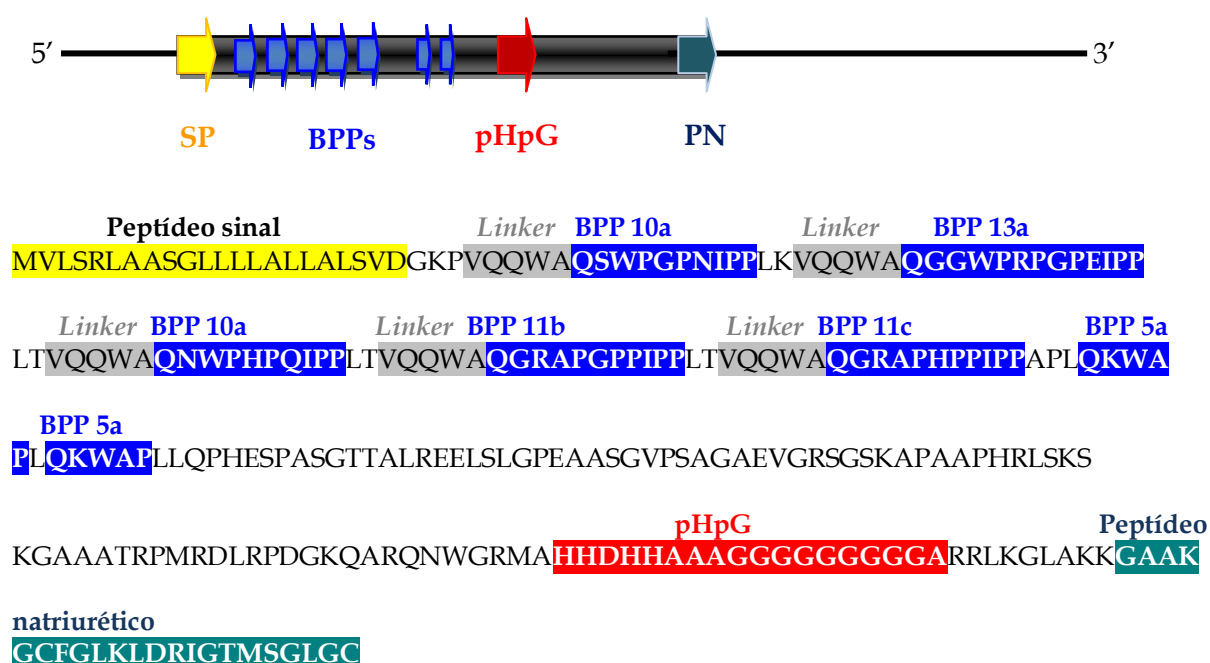


Figura 29: Representação esquemática do precursor dos BPPs de *B. jararaca* (baseado na entrada BAA12879.1 – do banco de dados *Swiss-Prot*). SP: Peptídeo sinal; BPPs: Peptídeos potenciadores de bradicinina; pHpG: peptídeo rico em histidinas e glicinas; PN: Peptídeo natriurético.

Tabela 16: Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs) identificados no veneno de *B. jararaca* no experimento de LC-MS/MS.

BPP identificado*	Estrutura primária	gi number**	m/z	z
<i>Veneno de filhotes</i>				
BPP 10a	<ESWPGPNIPP	gi 1580720	538.28	+2
BPP 10b	<ENWPRPQIPP	gi 1580720	608.34	+2
BPP 10c + <EQWA (na extremidade N-terminal)	<EQWAQNWPHPQIPP	gi 82095681	855.29	+2
BPP 11e +AP (na extremidade C-terminal)	<EARPPHPPIPPAP	gi 82095681	679.39	+2
BPP 11e +APL (na extremidade C-terminal)	<EARPPHPPIPPAPL	gi 82095681	735.84	+2
BPP 12c	<EWAQWPRPQIPP	gi 150438850	743.76	+2
BPP 13a	<EGGWPRPGPEIPP	gi 82095681	685.75	+2
BPP 13a sem<EG (na extremidade N-terminal)	GWPRPGPEIPP	gi 82095681	601.83	+2
BPP 13a +<EWA (na extremidade N-terminal)	<EWAQGGWPRPGPEIPP	gi 82095681	878.80	+2
BPP 13a +<EQWA (na extremidade N-terminal)	<EQWAQGGWPRPGPEIPP	gi 82095681	942.77	+2
BPP 14a	<EWAQWPRTPQIPP	gi 150438852	843.27	+2
<i>Veneno de adultos</i>				
BPP 10a	<ESWPGPNIPP	gi 1580720	538.28	+2
BPP 10b	<ENWPRPQIPP	gi 1580720	608.32	+2
BPP 10c +<EQWA (na extremidade N-terminal)	<EQWAQNWPHPQIPP	gi 82095681	855.61	+2
BPP 11e +AP (na extremidade C-terminal)	<EARPPHPPIPPAP	gi 82095681	679.29	+2
BPP 11e +<EQWA (na extremidade N-terminal) e AP (na extremidade C-terminal)	<EQWAQARPPHPPIPPAP	gi 82095681	935.78	+2
BPP 13a	<EGGWPRPGPEIPP	gi 82095681	685.74	+2
BPP 13a +<EWA (na extremidade N-terminal)	<EWAQGGWPRPGPEIPP	gi 82095681	878.77	+2
BPP 13a +<EQWA (na extremidade N-terminal)	<EQWAQGGWPRPGPEIPP	gi 82095681	942.70	+2
BPP 14a	<EWAQWPRTPQIPP	gi 150438852	842.71	+2
BPP/CNP precursor - <i>Bothrops insularis</i>	<ELGPPRPQIPP	gi 20069129	640.40	+2

<E representa um resíduo de ácido piroglutâmico;*De acordo com nomenclatura descrita por Ianzer et al. (2004); **gi number conforme o National Center of Biotechnology Information (NCBI). As letras em negrito denotam as estruturas canônicas dos BPPs.

De acordo com os dados presentes na Tabela 16 é possível notar algumas estruturas primárias destoantes daquelas já relatadas para BPPs, como por exemplo, a presença de um tetrapeptídeo N-terminal (<E-Q-W-A; parte da seqüência denominada *linker*, V-Q-Q-W-A, na Figura 29) que precede o início do BPP “maduro”.

4.4 Análise transcriptômica

4.4.1 Construção das bibliotecas de cDNA de filhotes e adultos de *B. jararaca*

A quantidade de RNA total extraído variou expressivamente entre filhotes e adultos, uma característica previsível dado o tamanho dos animais e das respectivas glândulas de veneno. Obtivemos cerca de 1 mg de RNA total extraído das glândulas de filhotes e um valor 5 vezes maior para as glândulas de adultos (5,5 mg, sendo 3,9 mg da glândula de fêmeas adultas e 1,7 mg da glândula de machos adultos). A Figura 30 apresenta o perfil eletroforético do RNA total extraído das glândulas de filhotes e adultos e avaliado em gel de agarose-formaldeído.

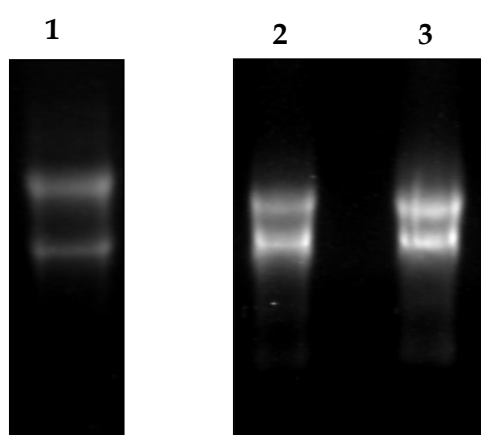


Figura 30: Gel de agarose (1,2%)-formaldeído evidenciando o perfil do RNA total (10 µg) extraído e utilizado na construção das bibliotecas de filhotes e adultos. (as bandas majoritárias correspondem às subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico). **1:** RNA total extraído das glândulas de filhotes; **2 e 3** RNA total extraído das glândulas de machos adultos e fêmeas adultas, respectivamente.

Durante a purificação do RNA mensageiro (mRNA) optamos por realizar uma recromatografia do material eluído, o que apresentou como vantagem a maior pureza do mRNA, contudo diminuiu o rendimento do produto purificado. De acordo com nossos cálculos, o rendimento final do mRNA purificado variou de 4 µg para filhotes a aproximadamente 21 µg para adultos (8,8 µg para machos adultos e 12,7 µg para fêmeas adultas). Após a construção das bibliotecas e subsequente transformação de células bacterianas eletrocompetentes, selecionamos aleatoriamente alguns clones das bibliotecas de adultos, que foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Bam* HI para observação do tamanho dos insertos inseridos (Figura 31).

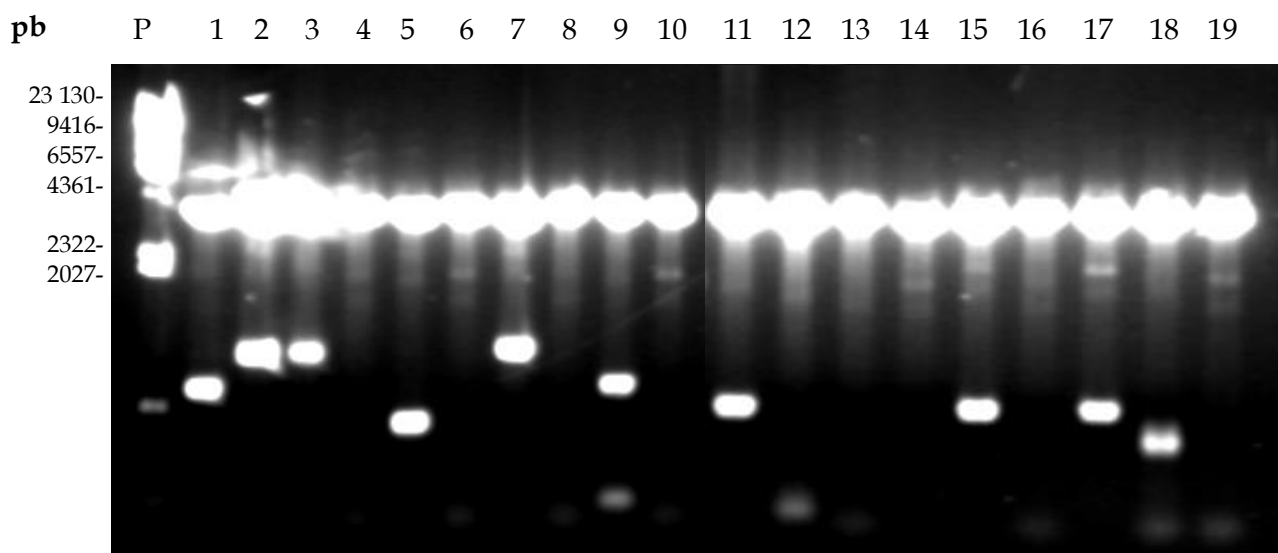


Figura 31: Gel de agarose 1% evidenciando a distribuição dos insertos de clones aleatórios das bibliotecas de cDNA dos animais adultos (machos e fêmeas). **P:** padrão de DNA (λ /*Hind* III). Poços 1 a 10: clones da biblioteca de machos adultos. Poços 11 a 19: clones da biblioteca de fêmeas adultas.

É possível notar uma distribuição de insertos variando entre aproximadamente 1,5 kb e 400 pb; contudo, há que se ressaltar que alguns insertos podem ter sido fragmentados pela presença (em sua estrutura) de sítios de restrição para as enzimas utilizadas nesta análise (*Eco* RI e/ou *Bam* HI). A análise do tamanho dos insertos de clones aleatórios da biblioteca de cDNA de filhotes apresentou um padrão similar, evidenciado na Figura 32.

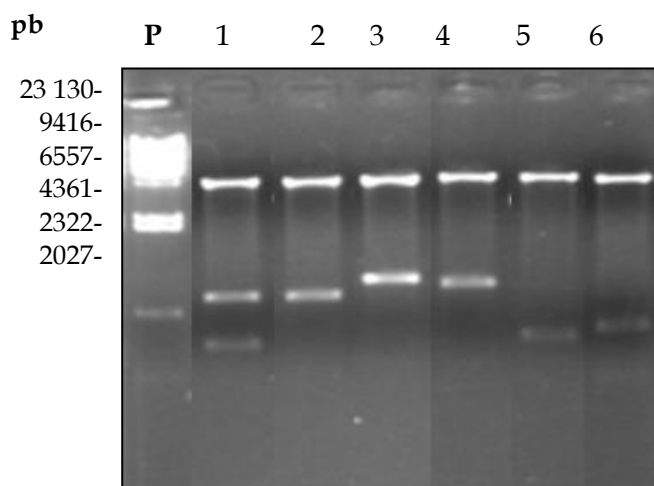


Figura 32: Gel de agarose 1% mostrando a distribuição de tamanho dos insertos da biblioteca de filhotes. **P:** padrão de DNA (λ /Hind III). Poços 1 a 6: DNA plasmidial extraído de clones aleatórios que foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI para liberação dos insertos.

4.4.2 Montagem e análise dos *clusters*

Ao longo deste projeto, foram seqüenciados 2166 clones aleatórios das bibliotecas de cDNA das glândulas de veneno de *B. jararaca*. Estes clones foram distribuídos da seguinte forma: 1045 clones da biblioteca de filhotes e 1121 clones da biblioteca de adultos (sendo 533 da biblioteca de fêmeas adultas e 588 da biblioteca de machos adultos). Após o seqüenciamento, todas as seqüências obtidas foram tratadas para remoção de segmentos do vetor, caudas poli (A/T) e regiões de baixa qualidade, conforme os parâmetros descritos no sub-item 3.7.1.

A montagem dos *clusters* foi feita utilizando-se *todas* as ESTs, independente da idade ou sexo do animal. Optamos por efetuar a montagem desta forma no intuito de otimizar a sobreposição das ESTs. Depois de agrupadas em *clusters* ou singletes (seqüências não agrupadas em nenhum *cluster*) o tamanho das seqüências variou de 153 a 2340 pb, com uma média de 509,6 pb. Para as análises seguintes os *clusters* foram tratados como transcritos únicos, embora haja a possibilidade de que alguns deles compreendam porções diferentes de um mesmo transcrito.

Conforme descrito no sub-item 3.7.1, foram estabelecidas 3 categorias gerais: Toxinas, Não-toxinas (transcritos celulares) e *No hit* (clusters que não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência depositada nos bancos de dados analisados). A Figura 33 apresenta a composição relativa das categorias com base nos clusters analisados.

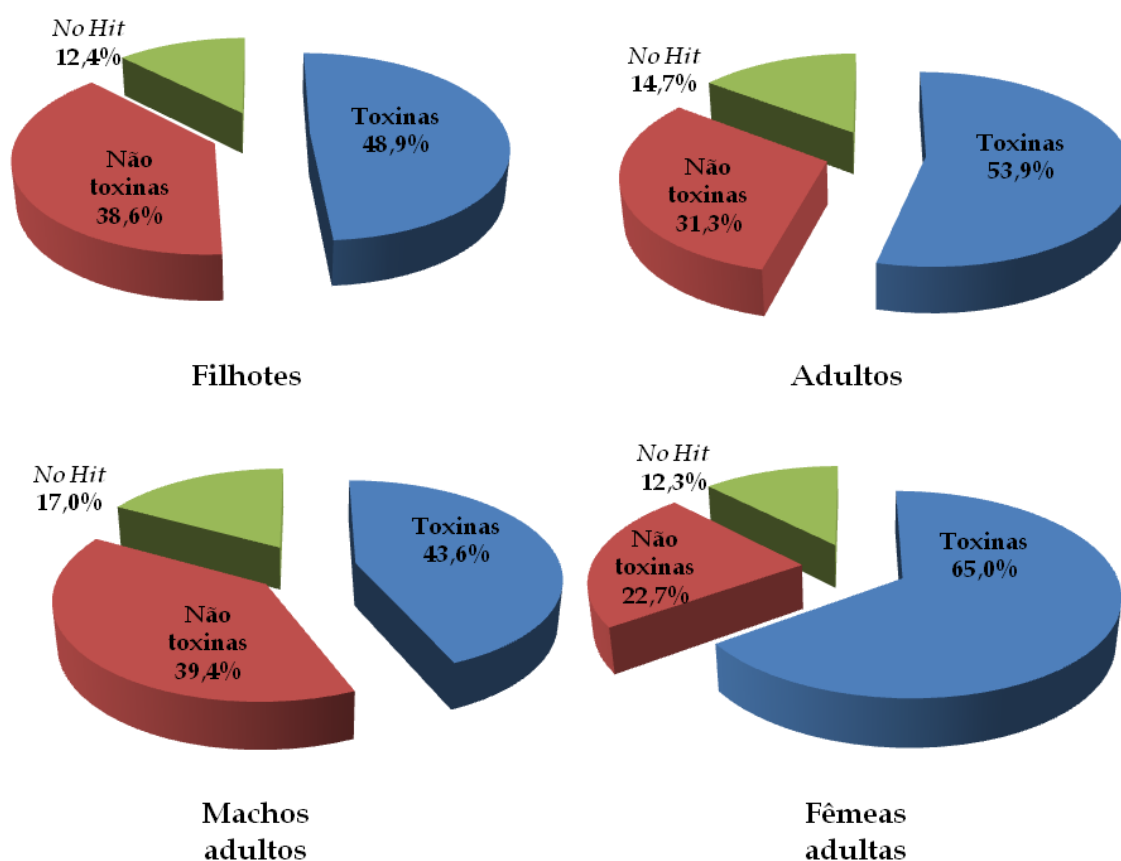


Figura 33: Participação dos clones das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca* na composição das categorias analisadas (Toxinas, Não toxinas e *No hit*).

De uma forma geral, a distribuição das porcentagens nas categorias foi semelhante entre as amostras analisadas (filhotes, adultos, machos adultos e fêmeas adultas). Por se tratar de um tecido altamente especializado na produção, armazenamento e secreção de toxinas, não surpreendentemente a maioria dos transcritos amostrados correspondeu a toxinas, seguido por transcritos celulares e transcritos cuja similaridade não foi correlacionada com nenhuma seqüência conhecida até o momento da análise dos dados. A Tabela 17 mostra uma

representação dos 965 clusters montados a partir de 2166 clones derivados das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*. Cerca de 61% das seqüências identificadas corresponderam a toxinas, enquanto aproximadamente 39% corresponderam a transcritos celulares. Contudo, a diversidade desta última categoria é quase duas vezes maior que aquela verificada para os transcritos correspondentes a toxinas.

Tabela 17: Representação dos 965 clusters montados a partir das ESTs derivadas de 2166 clones das bibliotecas de cDNA das glândulas de veneno de filhotes e adultos (machos e fêmeas) de *B. jararaca*.

Categoria	Nº de clusters	Nº de clones	Redundância (Clone/cluster)	Representação sobre os clones identificados
<i>No hit</i>	255	283	1,1	-
Função desconhecida	38	46	1,2	-
DNA mitocondrial	41	89	2,1	-
Seqüências identificadas				100%
Similares a transcritos/proteínas de toxinas	235	1071	4,5	61,2%
Similares a transcritos/proteínas celulares	396	677	1,7	38,8%
TOTAL	965	2166		

4.4.3 Análise dos clusters de toxinas

É importante ressaltar que o enfoque da análise deste trabalho não é de descrever o transcriptoma da glândula de veneno de *B. jararaca* (mesmo porque uma análise deste tipo já foi reportada por Cidade *et al.* (2006)), mas sim apontar as diferenças/semelhanças no padrão de expressão gênica entre as diferentes amostras analisadas (machos e fêmeas adultas e filhotes e adultos).

Os clusters correspondentes a toxinas estão apresentados na Tabela A7 (clusters correspondentes a DNA mitocondrial e aqueles da categoria *No hit* não estão apresentados). É possível perceber que dentre as famílias de toxinas verificadas, as metaloproteinases apresentam uma grande diversidade, com 89 clusters, seguido por lectinas tipo C (58 clusters), serino proteinases (27 clusters), peptídeos potenciadores de bradicinina (25 clusters) e fosfolipases A2 (12 clusters).

Na categoria **Outras** foram agrupados singletes em sua maioria. Nesta categoria estão presentes transcritos variados, como nucleotidases, hialuronidasas, peptidases e neurotoxinas. O baixo número de clones correspondentes a estes elementos sugere que estas toxinas são componentes minoritários no veneno desta espécie.

Os resultados apresentados na Figura 34 e Tabela 18 apontaram importantes diferenças na expressão de toxinas putativas entre as bibliotecas de cDNA analisadas (filhotes e adultos; machos e fêmeas adultas).

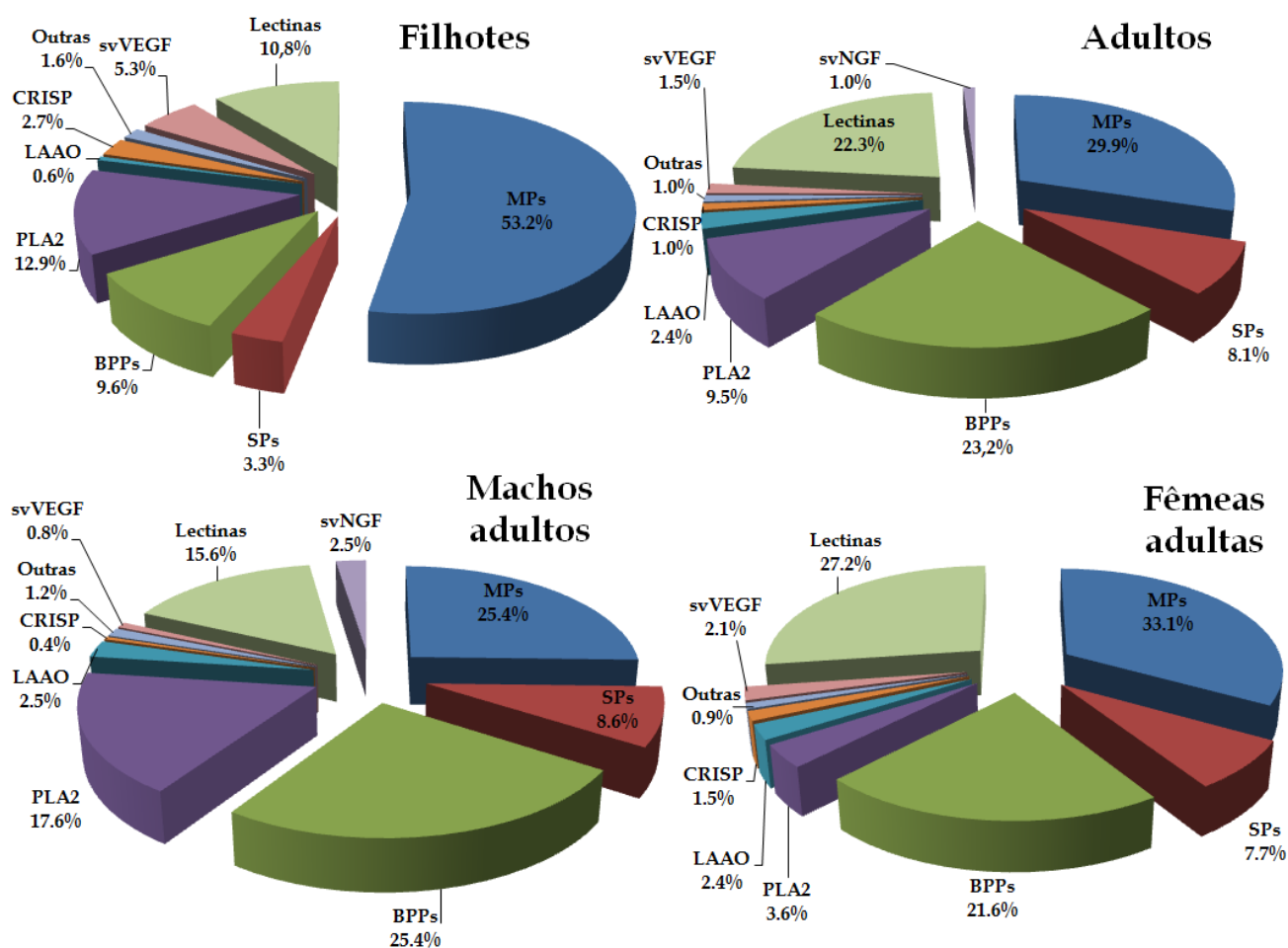


Figura 34: Representação dos transcritos de toxinas putativas de *B. jararaca*. **MPs:** metaloproteínas; **SPs:** serino proteinases; **BPPs:** peptídeos potenciadores de bradicinina; **PLA2:** fosfolipases A₂; **LAAO:** L-aminoácido oxidases; **CRISPs:** proteínas secretadas ricas em cisteínas; **svVEGF:** fatores de crescimento do endotélio vascular; **svNGF:** fatores de crescimento de nervo.

Tabela 18: Clusters correspondentes a toxinas putativas das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*, suas proporções e redundâncias (clones/cluster). **A-** Biblioteca de filhotes; **B-** Biblioteca de adultos; **C-** Biblioteca de machos adultos; **D-** Biblioteca de fêmeas adultas.

A

Categoria	N° de clusters	N° de clones	% no total*	% na categoria (toxinas)	Redundância (clone/cluster)
MPs	63	260	26,1	53,2	4,1
SPs	10	16	1,6	3,3	1,6
BPPs	12	47	4,7	9,6	3,9
PLA2	4	63	6,3	12,9	15,8
LAAO	1	3	0,3	0,6	3,0
CRISPs	1	13	1,3	2,7	13,0
Outras	7	8	0,8	1,6	1,1
svVEGF	5	26	2,6	5,3	5,2
Lectinas	27	53	5,3	10,8	2,0
TOTAL	130	489	49	100	

B

Categoria	N° de clusters	N° de clones	% no total*	% na categoria (toxinas)	Redundância (clone/cluster)
MPs	41	174	16,1	29,9	4,2
SPs	22	47	4,4	8,1	2,1
BPPs	23	135	12,5	23,2	5,9
PLA2	10	55	5,1	9,5	5,5
LAAO	4	14	1,3	2,4	3,5
CRISPs	1	6	0,6	1,0	6,0
Outras	6	6	0,6	1,0	1,0
svVEGF	5	9	0,8	1,5	1,8
Lectinas	43	130	12,0	22,3	3,0
svNGF	1	6	0,6	1,0	6,0
TOTAL	156	582	53,9	100	

C

Categoria	N° de clusters	N° de clones	% no total*	% na categoria (toxinas)	Redundância (clone/cluster)
MPs	16	62	11,09	25,4	3,9
SPs	15	21	3,76	8,6	1,4
BPPs	15	62	11,09	25,4	4,1
PLA2	9	43	7,69	17,6	4,8
LAAO	2	6	1,07	2,5	3,0
CRISPs	1	1	0,18	0,4	1,0
Outras	3	3	0,54	1,2	1,0
svVEGF	2	2	0,36	0,8	1,0
Lectinas	24	38	6,80	15,6	1,6
svNGF	1	6	1,07	2,5	6,0
TOTAL	88	244	43,6	100	

D

Categoria	N° de clusters	N° de clones	% no total*	% na categoria (toxinas)	Redundância (clone/cluster)
MPs	30	112	21,5	33,1	3,7
SPs	11	26	5,0	7,7	2,4
BPPs	19	73	14,0	21,6	3,8
PLA2	5	12	2,3	3,6	2,4
LAAO	4	8	1,5	2,4	2,0
CRISPs	1	5	1,0	1,5	5,0
Outras	3	3	0,6	0,9	1,0
svVEGF	4	7	1,3	2,1	1,8
Lectinas	31	92	17,7	27,2	3,0
TOTAL	108	338	64,9	100	

MPs: metaloproteinases; **SPs:** serino proteinases; **BPPs:** peptídeos potenciadores de bradicinina; **PLA2:** fosfolipases A₂; **LAAO:** L-aminoácido oxidases; **CRISPs:** proteínas secretadas ricas em cisteínas; **svVEGF:** fator de crescimento do endotélio vascular; **ssvNGF:** fator de crescimento de nervo.*A porcentagem no total se refere ao total de ESTs seqüenciadas da biblioteca em questão.

É possível perceber que metaloproteinases estão entre as toxinas mais expressas em todas as amostras analisadas. O grande número de clusters pertencentes a esta categoria é também um indício da alta diversidade desta família de toxinas. Uma descrição dos resultados referentes às diferentes bibliotecas está apresentada a seguir.

Há uma abundância de ESTs na composição de alguns clusters correspondentes à metaloproteinases; alguns exemplos são os clusters BJOTD0125C (13 clones oriundos da biblioteca de filhotes, num total de 17 clones), BJOTD0203C- o cluster mais expresso- (40 clones oriundos da biblioteca de filhotes, num total de 76 clones), BJOTD0226C (23 clones oriundos da biblioteca de filhotes, num total de 24 clones). Transcritos correspondentes a fatores de crescimento do endotélio vascular e proteínas secretadas ricas em cisteínas também têm expressão pronunciada na glândula de filhotes de *B. jararaca*. Esses resultados corroboram, em parte, aqueles verificados na análise do proteoma do veneno de filhotes por eletroforese bidimensional e também aqueles obtidos com a marcação isóbara de peptídeos deste veneno (apresentados na Figura 10 e Tabela A5, respectivamente). Um exemplo é o caso de um svVEGF que foi identificado e quantificado no experimento de iTRAQ (o peptídeo NPEEGEPR proveniente de um svVEGF apresentou uma abundância relativa quase 4 vezes maior no veneno de filhotes; já na análise da proporção geral

de transcritos correspondentes a toxinas, svVEGFs são 3,5 vezes mais abundantes na glândula de filhotes em relação a de adultos-Tabela A5 e Figura 34). Outro exemplo é o peptídeo YWFFPAK proveniente de uma fosfolipase A2 ácida (gi|129420|, Tabela A5) que foi identificado e quantificado no experimento de iTRAQ com uma abundância cerca de 6 vezes maior no veneno de filhotes. De fato, o cluster BJOTD0112C apresentou similaridade de 85% também com uma fosfolipase ácida (gi|25140377|) pela análise de BlastX (Tabela 18). Este cluster apresenta em sua composição 51 ESTs da biblioteca de filhotes e 14 ESTs da biblioteca de adultos, característica que sugere a maior expressão de fosfolipases ácidas no veneno de filhotes.

Por outro lado, a análise da biblioteca de adultos mostrou que lectinas tipo C, peptídeos potenciadores de bradicinina e serinoproteinases têm maior expressão na glândula de adultos de *B. jararaca* (uma diferença de cerca de 2 vezes em relação a glândulas de filhotes). Os clusters BJOTD0067C e BJOTD0079C são exemplos de clusters de lectinas tipo C que não apresentam em sua composição nenhuma EST da biblioteca de filhotes. Estes dois clusters estão entre os mais expressos na glândula de adultos. Com relação às serinoproteinases, diversos clusters são também exclusivos de adultos, como por exemplo o cluster BJOTD0014C. A similaridade deste cluster é com uma serinoproteinase de *B. jararaca*, resultado da tradução da sequência nucleotídica do clone HS114 de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *B. jararaca* reportado por Saguchi e colaboradores (2005). No caso dos BPPs, o cluster BJOTD0178C destaca-se por ser o mais expresso, representado com 55 ESTs, das quais 46 são provenientes da biblioteca de adultos.

Da mesma forma que para os filhotes, estes resultados também apresentaram correspondência com aqueles obtidos na análise proteômica (Figura 10-B e Tabela 8). Um exemplo desta correlação são os *spots* 7, 8 e 9, identificados como lectinas tipo C e pronunciados no gel bidimensional do veneno de adultos (Figura 10-B). Além disso, o peptídeo IFWFNR, também correspondente a uma lectina tipo C, apresentou uma abundância relativa cerca de 4 vezes maior no veneno de adultos (Tabela A5).

A comparação entre as bibliotecas de cDNA das glândulas de machos e fêmeas adultas também apresentou algumas diferenças importantes, embora mais

sutis. A expressão de fatores de crescimento do endotélio vascular, metaloproteinases e lectinas tipo C foi mais acentuada na glândula de fêmeas adultas de *B. jararaca*. Se compararmos estes resultados com aqueles verificados nos géis bidimensionais de adultos de *B. jararaca* é possível perceber que a região de baixa massa molecular, que compreende, entre outras classes de toxinas, as lectinas tipo-C, apresenta-se de fato mais povoada no gel de fêmeas (região III, Figura 11-B). Por outro lado, a expressão de fosfolipases A2 foi maior na glândula de machos. Um resultado que também chamou a atenção é a ocorrência de transcritos correspondentes a fatores de crescimento de nervo somente na biblioteca de machos adultos. Novamente aqui há também uma boa correlação entre os dados obtidos na análise proteômica, especificamente no perfil protéico visualizado no gel bidimensional de machos adultos (Figura 12) - identificamos um *spot* correspondente a um fator de crescimento de nervo apenas no veneno de machos adultos (*spot* 5, Figura 12) (a mesma região do gel de fêmeas adultas não apresentou um *spot* correspondente). Obviamente o seqüenciamento de mais clones da biblioteca de fêmeas pode eventualmente levar à descoberta de transcritos correspondentes a NGFs, contudo o fato de essa proteína estar praticamente ausente no veneno de fêmeas pode ser um indício de um dimorfismo sexual nos venenos de adultos de *B. jararaca*.

4.4.4 Análise de Grupos de Clusters Relacionados (GCRs)

Após a montagem dos clusters, foi realizado um segundo agrupamento, menos estridente, em que se objetivou observar Grupos de Clusters Relacionados (GCRs). Para isso, no programa CAP3 foi utilizado um valor de 66% de identidade entre as bases presentes nos clusters e uma extensão mínima de sobreposição de pelo menos 40 bases. Os GCRs montados foram utilizados apenas para orientar as relações de similaridade entre os clusters, mas não para se derivar seqüências-consenso dos agrupamentos obtidos. Optamos por realizar o agrupamento dos clusters referentes à algumas famílias de toxinas: metaloproteinases e serinoproteinases, lectinas tipo C, BPPs e fosfolipases. O agrupamento dos clusters em GCRs resultou em 38 GCRs, em que há pelo menos 2 clusters presentes.

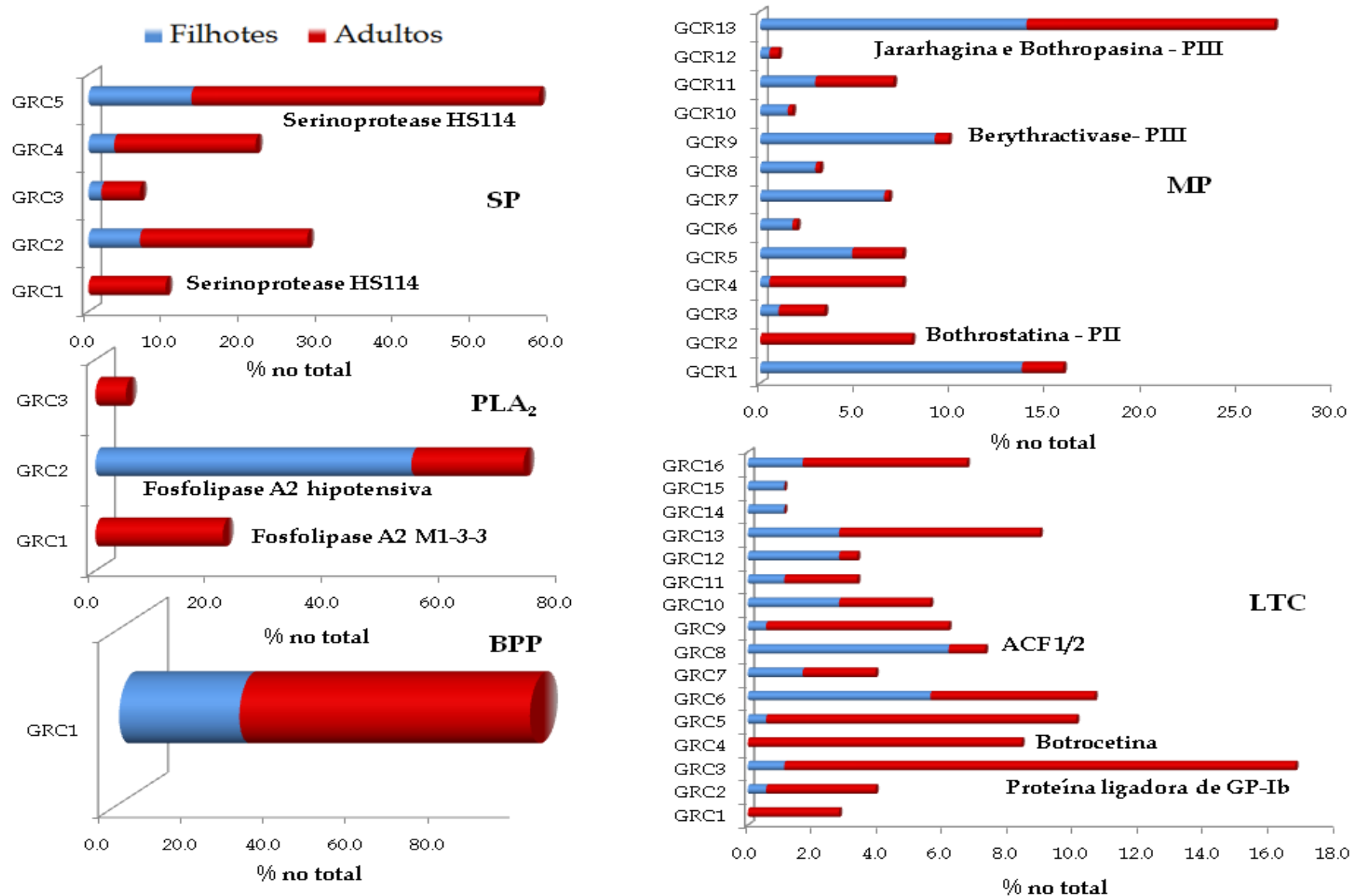


Figura 35: Representação de GCRs selecionados (montados a partir de clusters das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*). A contribuição dos clones das bibliotecas de cDNA de filhotes e adultos para um dado GCR está evidenciada pelas diferenças de cor. SP: serinoproteínas; MP: metaloproteínas; PLA₂: fosfolipases A₂; LTC: lectinas tipo-C; BPPs: peptídeos potenciadores de bradicinina.

A Figura 35 apresenta os GCRs obtidos, bem como os produtos gênicos preditos para alguns clusters agrupados nos GCRs.

No caso das fosfolipases A₂ é interessante notar que quase 74% do GCR 2 é composto por clones derivados da biblioteca de cDNA de filhotes. Neste caso, os clusters agrupados têm como produto gênico predito a fosfolipase A2 hipotensora (gi|25140377|) isolada do veneno da serpente *B. jararacussu* por Andrião-Escarso *et al.* (2002). Por outro lado, o GCR 1 compreende clusters que não apresentam nenhum clone oriundo da biblioteca de cDNA de filhotes. Para os BPPs, os parâmetros de agrupamento utilizados resultaram no agrupamento dos clusters de BPPs em um único GCR, que contou com grande participação de clones derivados da biblioteca de cDNA de adultos.

A análise dos GCRs correspondentes a serinoproteinases revelou uma grande participação de clones oriundos das bibliotecas de cDNA de adultos e cujo produto gênico predito foi a serinoproteinase HS114. Contudo, ainda não há atividade biológica descrita para esta serinoproteinase (Saguchi *et al.* 2005). Com relação às metaloproteinases, foi possível perceber que grande parte de transcritos correspondentes a metaloproteinases da classe P-II estão agrupados no GCR 2 (que não apresenta nenhum clone derivado da biblioteca de cDNA de filhotes). Por outro lado, o GCR 9 (que apresenta em sua composição um grande número de clones derivados da biblioteca de cDNA de filhotes) compreende clusters cujos produtos preditos são metaloproteinases da classe P-III (Berythracivase em sua maioria; gi|82216043|). Outro caso interessante é o GCR 13, cuja composição apresentou um número similar de clones vindos das bibliotecas de filhotes e adultos. Neste caso, os produtos gênicos destes clusters são em sua maioria metaloproteinases hemorrágicas da classe P-III como a Bothropasina (gi|209870468|) ou a Jararhagina (gi|231997|).

Verificamos também uma grande contribuição de clones oriundos das bibliotecas de cDNA de adultos nos GCRs correspondentes à lectinas tipo-C. Os GCRs 3 e 4, por exemplo, agrupam diversos clusters cujo produto gênico predito é a glicoproteína ligadora de GP-Ib e a botrocetina, respectivamente. Embora com conseqüências antagônicas, ambas as lectinas têm como alvo a glicoproteína de

superfície plaquetária GP-Ib, que está envolvida no processo de agregação plaquetária mediado pelo Fator de von Willebrand (vide Tabela 1). O GCR 8 compreende, em sua maioria, clones provenientes da biblioteca de cDNA de filhotes. Embora o produto gênico predito para os clusters que compõem este GCR seja a lectina ACF 1/2 (gi|20562943|), ainda não há função biológica descrita para esta lectina até o momento.

4.4.5 Análise de alguns clusters exclusivos: metaloproteinases

Uma descrição detalhada dos clusters de toxinas presentes nas bibliotecas analisadas está além do objetivo geral deste projeto. Contudo, dadas as diferenças verificadas na caracterização proteômica e funcional dos venenos, sobretudo no que diz respeito à grande diferença no sub-proteoma de metaloproteinases, achamos importante selecionar os clusters de metaloproteinases de filhotes e adultos para uma análise mais específica. Essa escolha torna-se necessária quando há a necessidade de se caracterizar as classes de metaloproteinases presentes nos diferentes venenos (filhotes e adultos). As metaloproteinases apresentam uma arquitetura molecular multidomínial, que tem um reflexo direto nas suas atividades biológicas (vide Figura 1). Assim, muito embora os *hits* encontrados durante as análises por BlastX ou BlastN sejam correspondentes a metaloproteinases, a classe a qual elas pertencem só pode ser confirmada por meio de uma análise das seqüências de aminoácidos preditas, para averiguação da presença dos domínios funcionais (catalítico, disintegrina ou tipo disintegrina e/ou rico em cisteínas). A Figura 36 é uma representação gráfica dos clusters de metaloproteinases presentes nas bibliotecas de filhotes e adultos.

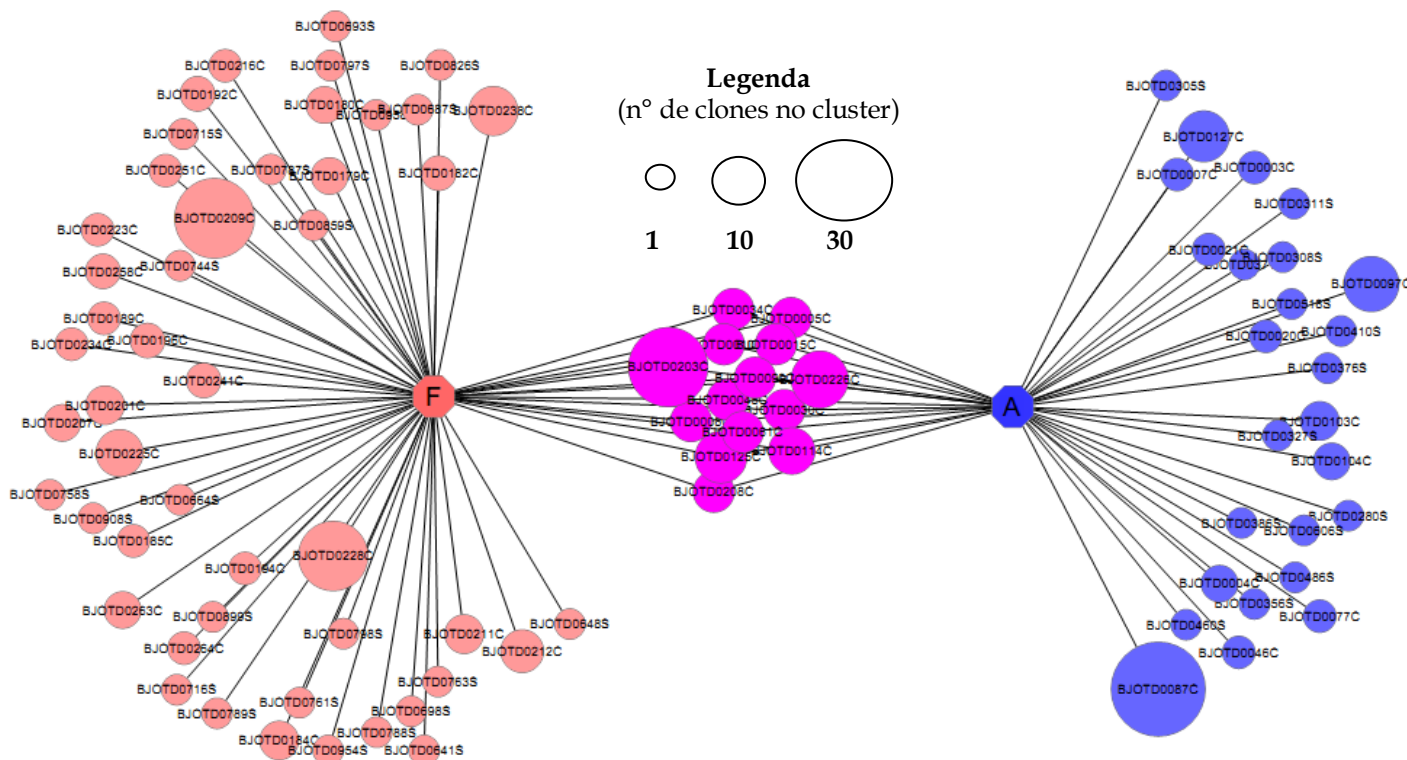


Figura 36: Representação gráfica dos clusters correspondentes a metaloproteínas das bibliotecas de cDNA de filhotes (**F**) e adultos (**A**) de *B. jararaca*. Os clusters exclusivos de filhotes estão apresentados à esquerda na figura; os clusters em comum entre as bibliotecas estão apresentados no centro da figura e aqueles exclusivos de adultos à direita. A área de cada círculo é proporcional ao número de clones agrupados no respectivo cluster (vide legenda). Gráfico gerado com o programa *Cytoscape* 2.8.1 (Cline *et al.* 2007).

De acordo com a análise da Figura 36 percebe-se que tanto a biblioteca de filhotes quanto a de adultos apresentaram clusters exclusivos. Uma ressalva deve ser feita com relação a estes achados. A sobreposição de ESTs num mesmo cluster sugere que, em teoria, elas seriam oriundas de um mesmo gene. Contudo, como dito anteriormente, há a probabilidade de transcritos correspondentes a um mesmo gene serem agrupados em clusters diferentes simplesmente por serem provenientes de regiões diferentes, sem sobreposição para a montagem dos clusters (por exemplo: transcritos correspondentes a região N e C terminal de uma mesma proteína). Assim, embora a análise da Figura 36 sugira a presença de diversos clusters exclusivos, há que se considerar essa possibilidade.

A análise dos 48 clusters exclusivos de metaloproteínas presentes na biblioteca de filhotes apresentou 16 clusters cuja análise por BlastX resulta em

similaridade de seqüência com metaloproteinases da classe P-III, ou seja que compreendem os domínios metaloproteinase, tipo disintegrina e rico em cisteínas (ou pelo menos os dois últimos). É importante ressaltar aqui que a análise dos clusters de metaloproteinases não permite inferir o processamento pós-traducional putativo da proteína (característica que permitiria a alocação das proteínas maduras entre as diferentes subclasses propostas por Fox e Serrano (2008a), apresentadas na Figura 1). Por este motivo, optamos por designar os clusters de metaloproteinases analisados como pertencentes à classe P-III (sem distinção de subclasses; ex: P-IIIa-d). Da mesma forma, como será mostrado a seguir, no caso do cluster BJOTD0087C (um dos exclusivos de adultos) a tradução da seqüência nucleotídica resultou na estrutura primária de uma metaloproteinase da classe P-II.

Dos 26 clusters exclusivos de adultos, apenas 7 apresentam similaridade de seqüência (quando analisados por BlastX) com metaloproteinases da classe P-III. Um cluster (BJOTD0087C, tamanho: 1,1 kb) foi o mais expresso (com 32 ESTs oriundas apenas da biblioteca de adultos) e apresentou similaridade de 95% com o precursor de uma metaloproteinase da classe P-II, Bothrostatina, (gi|82219563|) descrita por Fernandez e colaboradores (2005).

A tradução da seqüência nucleotídica presente no cluster BJOTD0087C está representada na Figura 37. Com exceção dos primeiros 65 aminoácidos, a proteína traduzida abrange a estrutura primária inteira da metaloproteinase da classe P-II, compreendendo inclusive o motivo tripeptídico R-G-D, típico das disintegrinas verdadeiras. Na realidade, Fernandez *et al.* (2005) clonaram a metaloproteinase Bothrostatina e expressaram em *E. coli* a disintegrina que parte desta metaloproteinase.

Cluster BJOTD0087C**(230 aa)**

```

1  KDMINVQPAA  PQTLDSEFGW  RKTDLLNRKS  HDNAQLLTST  DFNGPTIGLA  YVGSMDPKR
61  STAVIEDHSE  TDLLVAVTMA  HELGHNLGIR  HDTGSCSCGG  YSCIMAPVIS  HDIAKYFSDC
121 SYIQCWDFIM  KDNPQCILNK  QLRTDTVSTP  VSGNELLEAG  EECDCGTPGN  PCCDAATCKL
181 RPGAQCAEGL  CCDQCRFMKE  GTVCRRA  RGD  DMDDYCNGIS  AGCPRNPFHA

```

Figura 37: Seqüência de aminoácidos deduzida da tradução do cluster BJOTD0087C, que apresentou similaridade de 95% pela análise de BlastX com o precursor de uma metaloproteinase da classe P-II Bothrostatina (gi |82219563 |). Em vermelho está destacada a região do sítio ativo das metaloproteinases e em azul a tríade RGD, característica do domínio disintegrina das metaloproteinases da classe P-II.

Alguns dos clusters destacados dentre aqueles “exclusivos” de filhotes também apresentaram uma expressão pronunciada em relação aos demais. O cluster BJOTD0209C (tamanho: 2 kb) apresentou em sua composição 25 ESTs oriundas apenas da biblioteca de filhotes; os clusters BJOTD0228C (tamanho: 2,3 kb) e BJOTD0238C (tamanho:1,1 kb) apresentaram nas suas composições 20 e 10 ESTs, respectivamente, oriundas apenas da biblioteca de filhotes. A tradução da seqüência nucleotídica dos clusters BJOTD0209C, BJOTD0228C e BJOTD0238C está apresentada na Figura 38. Na seqüência de aminoácidos predita para o cluster BJOTD0209C é possível distinguir boa parte do pró-domínio (região que compreende a seqüência PKMCGVT, também chamada de *cysteine switch*, responsável pela inativação do sítio ativo no zimogênio da proteína), domínio catalítico (que apresenta a seqüência HELGHNLGMNH, em que as histidinas são responsáveis pela coordenação do átomo de zinco), o domínio tipo-disintegrina (compreendendo a tríade E-C-D) e todo o domínio rico em cisteínas.

Cluster BJOTD0209C**(523 aa)**

```

1 GREITTYPPV EDHCYHGR I ENDADSTASI SACSGKGF KLOGETYLIE PLELSDSEAH
61 AVYKYENVEK EDEA PKMCGV TQTNWKSDEP IKASQLAFTA EQRRYLNTRK YIELVIVADN
121 VMVKKYTGNS TAIRTRIYSC VNTLNLIYSA FNTHIALTGV EIWSNGNLIN VQSDSSVTL D
181 LFGTWRETVL LNRKRHDNAQ LLTAIDL DGP TVGLAYV GSM CNPKSSTGLI QDHNKLDVMV
241 ALTMA HELGH NLGMNH DGNQ CNCGGNPCIM SATLNFEPVY QFSDCSR DQH WRYLIDNRPP
301 CILNIPLRTD IVSPPVCGNY FVEVGEECD C GLPANCQNPC CDATTCKLRP RTQCEDEGCC
361 ERCQFKGAGT ECRAARS ECD IAESCTGQSP ECPTDDFQRN GVSCLNNHGY CYNGNCPILD
421 HQCHNLF GAS ATVAPDACFD FNRKGQNSY CRKQNGVTIP CARKDVKCGR LFCVQGPIGN
481 TISCQSTSSQ DDPDIGMVDL GTKCEDGRVC NSNRECVDVS TAY

```

Cluster BJOTD0228C**(610 aa)**

```

1 MIQVLLVTIC LAAF PYQ GSS I ILESGNVND YEVVYPRKVT ALPKGAVQPK YEDAMQYEFK
61 VNGEPVVLHL EKNKGLFSED YSEIHYS PDG REITHTTPVE DHCYHGR I Q NDADSSASIS
121 ACNGLKGFHK FQGETYLIEP LKLS DSEAHA VF KYENVEKE DE A PKMCGVT ETNWE SDEPI
181 KKASQSNLTP EQQAYLD A K YVEFVVLDH EMYK KYEDDL DEIKRRIYEI VNIMNEMFIP
241 LNIHVPLTGL EIWSDRD KIN VTSASSDTLR SFRKWRETDL LKRKSHDNAQ LLTAIEFDHQ
301 TLGHAYIATM CDPKLSVGVV MDHSTNDLTM AVTMA HELGH TLGMDH DVKY CTCHASSC IM
361 ATVLSNDTSK LFSNCSQEDQ RYLIKRRPR CLLNRPLR KD IISPPVCGNE LLEVGE ECD C
421 GPPANCQNC CDAATCKLTP GSQCADGVCC DQCRFRKNGT ECRAAKDDCD LPESCTDQSG
481 FCPMDDFQRN GQPCLNNSGY CYNGMCPIMT DQCI AVFGTG ATVAEDRCFQ HNQKGGYYGY
541 CRVENDRKIP CAPEDVKCGK LYCFLYSSKK CKRKYAPI DH DIGMVLPGTK CADGKVCNSN
601 GYCVDVNTAY

```

Cluster BJOTD0238C**(252 aa)**

```

1 IMATVLSNDT SKLFSNCSQE DQRKYLIKRR PRCLLNRPLR KDIISPPVCG NELLEVGEEC
61 DCGPPANCRD PCCDAATCKL TPGSQCADGL CCDQCRFREN GTECRAAKD D CD LPESCTGQ
121 SGFCPMDDFQ RNGQPCLNNS GYCYNGMCP I MTDQCI AVFG TGATVAEDSC FQNRQKGGYY
181 GYCRVENDRK IPCAPEDVKC GKLYCFLYSS KKCQRKYAPI DHDIGMVLPG TKCADGKVCN
241 SNGYCVDVNT AY

```

Figura 38: Sequências de aminoácidos deduzidas da tradução dos clusters de metaloproteínas da classe P-III BJOTD0209C, BJOTD0228C e BJOTD0238C de filhotes de *B. jararaca*. Em amarelo estão destacados os resíduos de aminoácido correspondentes ao peptídeo sinal; em cinza os resíduos do pró-domínio; em vermelho está destacada a região do sítio ativo das metaloproteínas e em azul a tríade XCD (em que X pode ser E ou D), presente no domínio tipo-disintegrina.

No caso do cluster BJOTD0228C, que é um pouco maior que o cluster BJOTD0209C, a proteína predita inicia-se com os resíduos hidrofóbicos correspondentes ao peptídeo sinal da proteína e se estende até o último resíduo C-terminal. Por fim, a tradução da sequência nucleotídica do cluster BJOTD0238C, que apresenta uma extensão de 1,1 kb (menor que os outros dois clusters anteriores),

inicia-se com resíduos que compõem parte do domínio catalítico e se estende até o último resíduo da região C-terminal da proteína (compreendendo os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas).

Quando analisados por BlastX, os clusters BJOTD0209C e BJOTD0228C apresentaram similaridade de 90 e 84%, respectivamente, com o precursor de uma metlaoproteinase da classe P-III de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (gi|258618056|) descrito recentemente por Jia e Perez (2010). A análise por BlastX para o cluster BJOTD0238C apontou uma similaridade de 81% com o precursor da metaloproteinase da classe P-III Berythactivase (gi|82216043|) cuja estrutura primária foi deduzida a partir de uma biblioteca de cDNA construída para este propósito por Silva *et al.* (2003).

4.4.6 Análise dos clusters celulares

Os clusters correspondentes a transcritos celulares estão apresentados na Tabela A8 (clusters correspondentes a DNA mitocondrial e aqueles pertencentes à categoria *No hit* não estão apresentados). A Figura 39 representa a proporção entre cada categoria funcional dos transcritos celulares verificados nas diferentes bibliotecas analisadas. De uma forma geral, não houve grandes diferenças quanto às proporções dos transcritos agrupados nas diferentes categorias funcionais (Figura 38).

É possível perceber que, dentre os transcritos celulares, aqueles agrupados na categoria “transcrição/tradução” compõem a maioria das mensagens em todas as amostras analisadas, com uma representação de aproximadamente 40% do total de transcritos. Além disso, esta é a categoria mais diversificada (com 135 clusters) dentre os clusters de proteínas celulares. Em seguida, estão os transcritos pertencentes à categoria “processamento e endereçamento” e “outras funções”, com uma representação média de 14% e 18,5%, respectivamente. É pertinente ressaltar que nesta última categoria foram agrupados clusters envolvidos em diferentes processos celulares como, por exemplo, as proteínas cujas descrições funcionais no Banco de Domínios Conservados do NCBI (*Conserved Domains Database*;

www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/) referiam-se a “diversas funções”, ou ainda, “envolvidas em diversas funções celulares”. Por este motivo optamos por mantê-las na categoria “outras funções” embora, em última análise, esta seja uma categoria subjetiva.

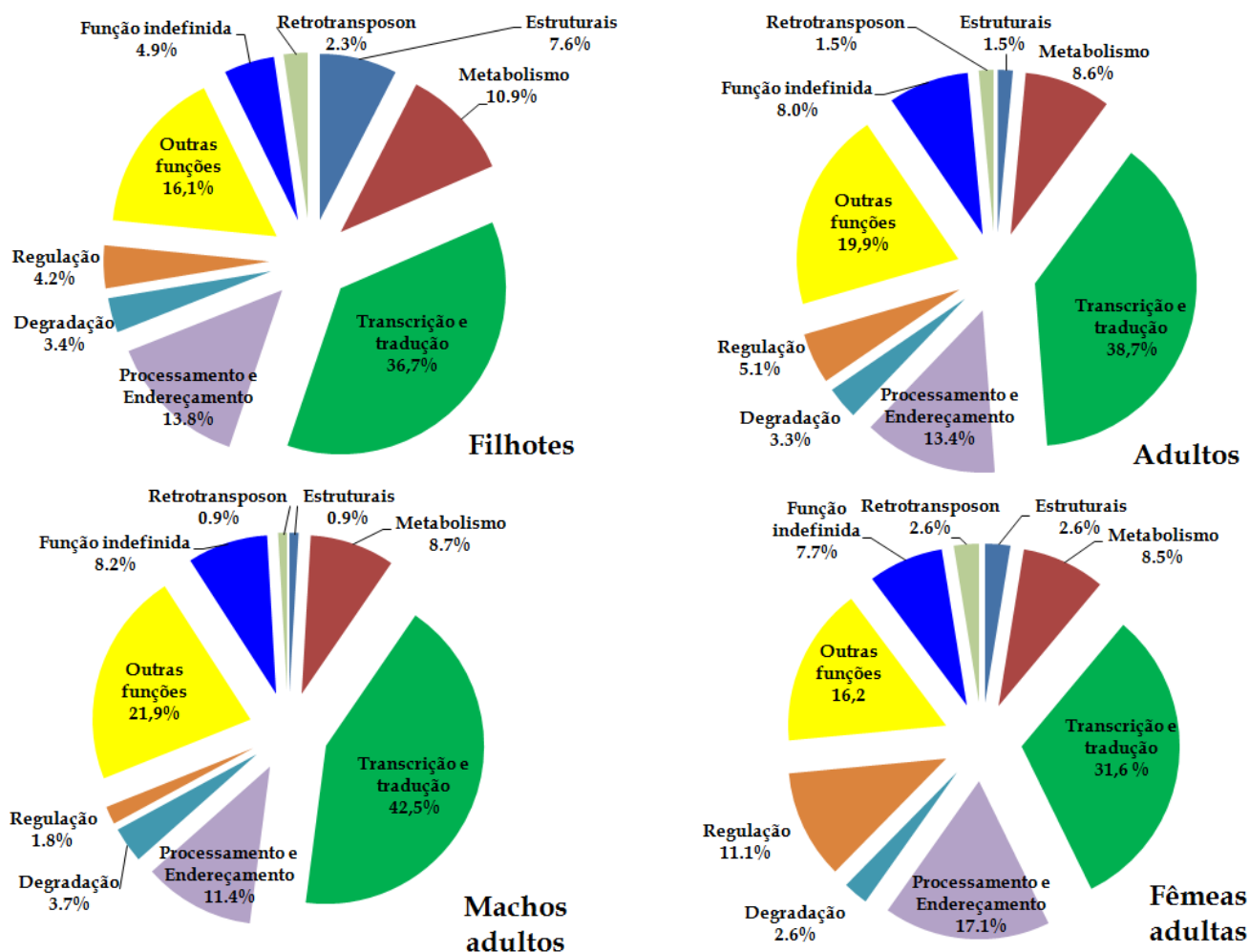


Figura 39: Representação dos transcritos celulares das bibliotecas de cDNA da glândula de veneno de *B. jararaca*.

Dentre os clusters pertencentes à categoria “processamento e endereçamento” foi interessante notar que proteínas-dissulfeto isomerase (PDIs) e calreticulina estão entre as de maior expressão em todas as bibliotecas analisadas. Este é o caso do cluster BJOTD0031C (com 23 ESTs) que apresentou similaridade de 98% pela análise por BlastX com a seqüência de uma PDI da serpente *Oxyuranus scutellatus scutellatus*

(gi | 63146076 |) e o cluster BJOTD0187C (com 15 ESTs) que apresentou similaridade de 97% com a seqüência de uma calreticulina de *Gallus gallus* (gi | 44969651 |).

A categoria “função indefinida” compreendeu, em sua maioria, proteínas hipotéticas, cuja função não pôde ser correlacionada com a de nenhuma outra descrita até o momento. Outra característica deste grupo é a grande quantidade de singletes (seqüências únicas, não agrupadas em clusters).

Observamos também 13 clusters correspondentes a seqüências de retrotransposons. A análise da distribuição de ESTs nestes clusters sugere uma presença ubíqua destes elementos independente das amostras analisadas (glândulas de filhotes ou adultos). Dentre os 20 clusters agrupados na categoria “estruturais” 15 são exclusivos da biblioteca de filhotes. Este resultado pode ser provavelmente um reflexo do procedimento conduzido durante a extração das glândulas de filhotes: é possível que a musculatura que envolve as glândulas não tenha sido totalmente removida das glândulas de filhotes, dado o menor tamanho destes em relação aos indivíduos adultos (vide Figura 4, seção 3.1).

4.5 Caracterização funcional dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*

4.5.1 Atividades biológicas

4.5.1.1 Dose Letal Média (DL_{50}) e Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

O ensaio de Dose Letal Média (DL_{50}) utilizando camundongos evidenciou uma maior letalidade para o veneno dos adultos de *B. jararaca* (Tabela 19). Alternativamente, quando foi avaliada a letalidade em um modelo animal diferente (aves), o veneno de filhotes de *B. jararaca* se mostrou aproximadamente 27 vezes mais letal em comparação ao dos adultos.

Por outro lado, a atividade hemorrágica não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre as amostras (Tabela 19).

Tabela 19: Atividades biológicas dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

	DL ₅₀ (mg/kg) § (Camundongos)	LD ₅₀ (mg/kg) § (Aves)	DMH (µg) §§	<i>p</i> -valor*
Veneno de filhotes	3,33 (3,04 - 3,71)	0,05 (0,02 - 0,09)	0,44 ± 0,09	0,4365
Veneno de adultos	2,26 (1,86 - 2,89)	1,36 (0,86 - 2,07)	0,34 ± 0,02	

§Os valores em parênteses representam os intervalos (inferior e superior) de 95% de confiança.

§§Dose Mínima Hemorrágica (DMH) determinada em camundongos (para maiores detalhes ver sub-item 3.8.1.2). Os valores representam a média ± desvio padrão (4 determinações).

**p*-valor calculado com base no teste *t-student* (comparação entre os valores de DMH verificados para o veneno de filhotes e adultos).

4.5.2 Atividades enzimáticas

4.5.2.1 Atividade coagulante sobre o plasma – Dose Mínima Coagulante

Observamos uma expressiva atividade coagulante sobre o plasma para o veneno de filhotes (Tabela 20). Essa atividade é cerca de 10 vezes mais intensa em relação àquela verificada para o veneno de adultos. A análise dos dados apresentados na Tabela 20 permite evidenciar a participação majoritária de metaloproteinases na atividade coagulante dos venenos de filhotes (a julgar pela inibição de aproximadamente 97% causada por EDTA 10 mM na atividade coagulante do veneno bruto). Por outro lado, para o veneno de adultos a atividade coagulante parece ser o resultado da atividade concomitante das duas classes de proteinases (serinoproteinases e metaloproteinases).

Tabela 20: Atividade coagulante dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* sobre o plasma.

	Veneno de filhotes			Veneno de adultos		
	+10 mM EDTA	+2mM PMSF		+10 mM EDTA	+2mM PMSF	
Atividade coagulante (μg) [†]	0,15 \pm 0,007	6,85 \pm 0,21	0,16 \pm 0,002	1,44 \pm 0,14	5,90 \pm 0,14	2,98 \pm 0,02
Atividade específica (U/mg)	6514 \pm 307,7	146 \pm 4,17	6018 \pm 111,5	696 \pm 67,9	169 \pm 3,81	335 \pm 3,11
Atividade específica residual (U/mg) [§]	100%	2,24%	92,4%	100%	24,3%	48,1%

[†]Dose Mínima Coagulante (para maiores detalhes ver sub-item 3.8.2.1).

[§] A atividade residual é representada em porcentagem de atividade específica (U/mg de veneno) remanescente após a incubação das amostras com os respectivos inibidores.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 3 determinações.

De acordo com a análise estatística, a atividade coagulante verificada para o veneno de filhotes foi significativamente diferente daquela encontrada para o veneno de adultos ($p = 0,006$).

4.5.2.2 Ativação dos fatores II e X

O veneno dos filhotes de *B. jararaca* foi capaz de ativar os Fatores II e X da cascata de coagulação sanguínea de forma mais intensa que o veneno dos adultos, característica observada no perfil das curvas apresentadas na Figura 40. Com as concentrações utilizadas nos ensaios não verificamos atividade amidolítica sobre os substratos testados.

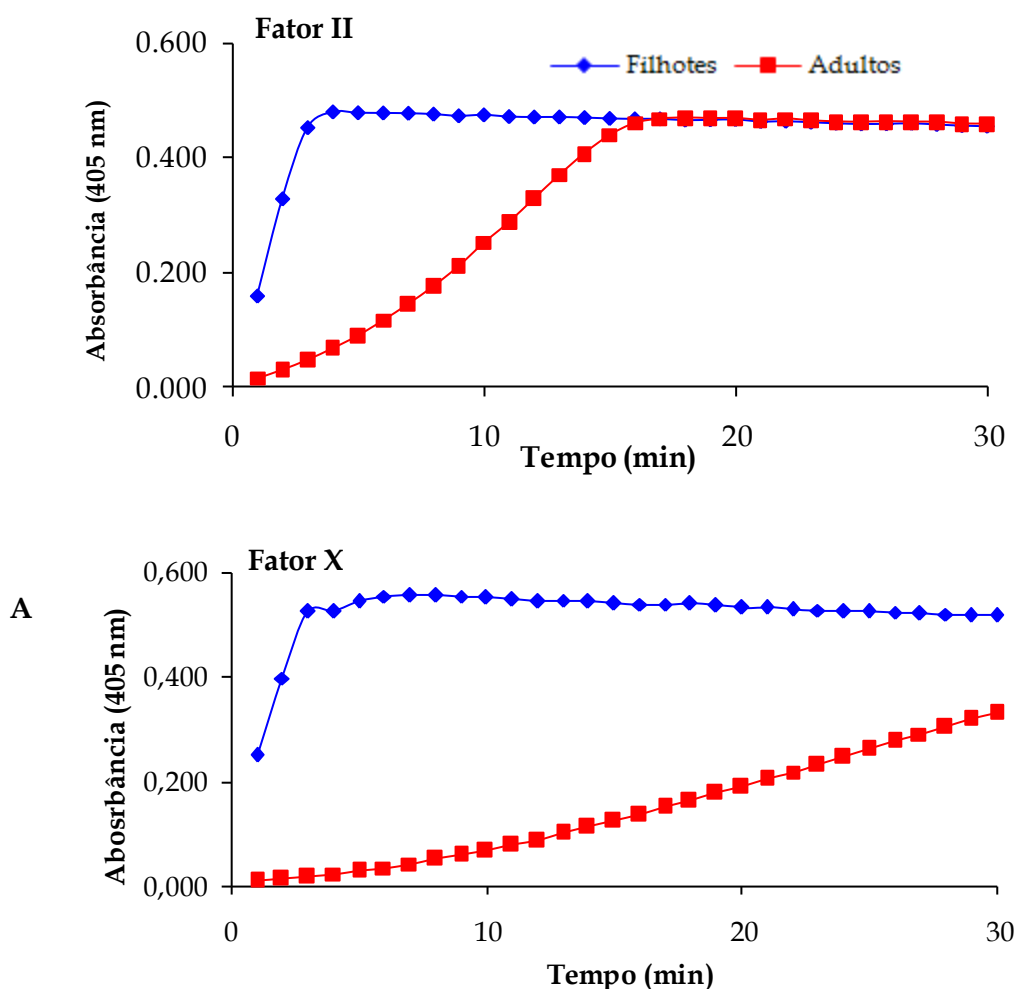


Figura 40: Ativação dos Fatores II e X pelas amostras de veneno (concentrações de 0,2 μg para o Fator II e 0,1 μg para o Fator X). Substrato S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl) (Chromogenix), específico para trombina ou S-2765 (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA \times 2HCl) (Chromogenix) específico para o fator Xa. As amostras de veneno foram previamente incubadas com a protrombina ou o fator X e a hidrólise dos substratos cromogênicos foi monitorada (λ 405 nm) por 30 min a 37°C.

4.5.2.3 Ativação proteolítica sobre a caseína e fibrinogênio

Foi verificada uma maior atividade proteolítica para o veneno dos adultos de *B. jararaca* tanto sobre a caseína quanto sobre o fibrinogênio (Tabela 21). Esta atividade foi aproximadamente duas vezes maior para o veneno dos adultos em relação aos filhotes, sendo significativamente diferente entre as amostras.

Tabela 21: Atividade proteolítica dos venenos de *B. jararaca* sobre caseína e fibrinogênio.

Atividade proteolítica específica				
(U/mg) *				
	<i>Caseína</i>	<i>p-valor**</i>	<i>Fibrinogênio</i>	<i>p-valor**</i>
Veneno de filhotes	0,73 ± 0,05	0,0301	5,6 ± 0,72	0,0140
Veneno de adultos	1,25 ± 0,16		10,5 ± 1,62	

*Os valores representam a média ± desvio padrão de 3 determinações.

***p-valor* calculado com base no teste *t-student*.

5. Discussão

O veneno de serpente é um produto biológico cuja existência depende de informações contidas no DNA (genoma) do animal (desconhecido, no caso da *B. jararaca*), que é transcrito para um transcriptoma (podendo ser catalogado na forma de cDNA) e que é traduzido para a geração das toxinas. Ao sistema genoma-transcriptoma-proteoma acrescenta-se a maquinaria da regulação da expressão gênica/protéica, que é completamente desconhecida no caso de serpentes. Neste contexto, o racional metodológico aplicado nesse trabalho se baseou na análise transcriptômica (das glândulas de veneno), proteômica/peptidômica (do veneno), funcional (das atividades biológicas observadas nos envenenamento) para um melhor entendimento da variabilidade do veneno da serpente *B. jararaca*. Com o advento recente de metodologias para a análise de genomas, transcriptomas e proteomas em larga escala, a abundância de dados biológicos aumentou significativamente, propiciando uma abordagem holística em toxinologia como alternativa à abordagem reducionista baseada no isolamento e identificação de toxinas e de suas funções. Como consequência, duas abordagens gerais evoluíram para o entendimento de sistemas biológicos em toxinologia. Uma delas se refere a estudos correlatos, nos quais se infere relacionamentos entre genes ou proteínas e seus módulos de função. Estes estudos podem também incluir a anotação de genes e seus produtos por uma abordagem “*guilt-by-association*” na qual a informação detalhada sobre a função de um gene, ou proteína, ou sistema, está disponível e é transferida para outros com características semelhantes. A outra abordagem se refere a estudos causais em que funções de biomoléculas ou interações entre moléculas são diretamente detectadas e documentadas permitindo a formulação de mecanismos de atividade ou de ação. Apesar dessas duas abordagens parecerem contrastantes, com o avanço das tecnologias ômicas em genética e bioquímica, elas tem se mesclado nos estudos biológicos sistêmicos mais recentes. Este trabalho foi gerado dentro deste contexto, compreendendo análises *high-throughput* de misturas complexas e

inferências correlatas e causais sobre a identificação e função de toxinas para a compreensão da variabilidade do veneno da *B. jararaca* e a possível correlação com seu crescimento corporal e mudança de hábitos alimentares.

5.1 A variabilidade no proteoma e transcriptoma do veneno de *B. jararaca*: aspectos gerais

Neste projeto nosso enfoque majoritário foi voltado para a análise das diferenças entre os venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*, visto que, embora significativamente diferentes quanto aos efeitos patológicos (Rosenfeld *et al.* 1959; Ribeiro e Jorge, 1997; Santoro *et al.* 2008), os venenos de filhotes são pouco conhecidos na literatura toxicológica, seja devido às dificuldades de se obter as amostras (recém-nascidos) ou pela quantidade de material requerido para análises mais refinadas (isolamento de toxinas e análise funcional, por exemplo). Outro objetivo deste projeto foi o de complementar as análises da variabilidade do proteoma dos venenos de filhotes e adultos com dados acerca do transcriptoma da glândula de veneno desta espécie. Além disso, a caracterização funcional dos venenos teve um importante papel neste trabalho, pois propiciou um melhor entendimento de algumas atividades-chave dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*, bem como permitiu a correlação com a presença de toxinas nos proteomas/transcriptomas estudados.

O proteoma do veneno de *B. jararaca*, independente da idade ou sexo do animal, apresenta características comuns ao veneno de outras espécies pertencentes à família Viperidae como, por exemplo, a quantidade expressiva de proteínas ácidas (presentes num amplo espectro de massas moleculares), característica já reportada por Serrano *et al.* (2005) e, mais recentemente, por Paes-Leme *et al.* (2009), em análise do proteoma dos venenos de 8 espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*. De uma forma geral, o proteoma dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* avaliado por eletroforese bidimensional (Figuras 9 e 10) se mostra tão diferente

quanto a comparação dos proteomas de venenos de outras espécies simpátricas de *Bothrops*.

O veneno de filhotes de *B. jararaca* apresentou uma diversidade de isoformas de proteínas ácidas e de alta massa molecular (pI variando de 4,3 a 5,5 e massa moleculares na faixa de 50 a 70 kDa) identificadas por espectrometria de massas como metaloproteinases da classe P-III. Outro aspecto singular do proteoma do veneno de filhotes é a pequena quantidade de proteínas na faixa de 25-30 kDa e pI 6,0-7,0 em relação ao veneno de adultos. Resultados similares foram verificados por Alape-Gíron et al. (2008) em análise da variabilidade do proteoma do veneno da serpente *B. asper*. Conforme os autores, em *B. asper* parece haver uma relação quantitativa entre metaloproteinases das classes P-I e P-III no que diz respeito à presença destas proteínas no veneno em diferentes fases de vida dos animais, de forma que, durante a ontogênese, metaloproteinases da classe P-I tornam-se significativamente mais expressas em detrimento àquelas da classe P-III (mais abundantes no veneno nas fases iniciais de vida dos animais). Nossos resultados sugerem um padrão similar de relação P-I/P-III entre os venenos de filhotes e adultos e esta relação quantitativa tem importantes implicações biológicas para esta espécie, como será discutido adiante. Guércio et al. (2006) relataram resultados semelhantes verificados para o veneno de indivíduos juvenis, sub-adultos e adultos de *B. atrox* da Amazônia. Em análise ontogenética da expressão de proteinases do veneno de *B. insularis* verificamos um aumento da atividade de metaloproteinases da classe P-III nos venenos de adultos (Zelanis et al. 2007), bem como um aumento da expressão de metaloproteinases da classe P-I no veneno de adultos (Zelanis et al. 2008). Outra característica marcante no gel bidimensional do veneno de filhotes em relação ao veneno de adultos é a abundância de proteínas ácidas e de alta massa molecular. A análise do sub-proteoma de metaloproteinases e as identificações de proteínas presentes nos *spots* desta região do gel bidimensional do veneno de filhotes sugerem a presença de diversas isoformas de metaloproteinases da classe P-III no veneno de filhotes. O soro anti-botrópico produzido pelo Instituto Butantan foi capaz de reconhecer grande parte das proteínas presentes nas amostras de venenos de

filhotes e adultos, contudo, verificamos diferenças significativas entre as amostras, que devem refletir proteínas diferencialmente expressas de forma ontogenética (Figura 13).

Avaliamos também o proteoma dos venenos de machos e fêmeas adultas de *B. jararaca* por eletroforese bidimensional. Em comparação com as amostras de filhotes e adultos, a análise dos perfis proteômicos apresentados na Figura 11 sugere um padrão mais semelhante entre as amostras de machos e fêmeas adultas. A identificação de alguns *spots* nos géis de machos e fêmeas adultas por espectrometria de massas mostrou padrões diferenciados entre os venenos. Um fato intrigante, entretanto, foi a presença de um fator de crescimento de nervo (svNGF) presente no veneno dos machos e praticamente ausente no veneno das fêmeas. Este achado corrobora os dados reportados por Thoenen e Barde (1980) sobre a expressão de NGF em camundongos. Conforme estes autores, o hormônio testosterona está envolvido na modulação da síntese de NGF e esta seria a explicação para os níveis cerca de 10 vezes maiores de NGF em glândulas salivares de camundongos machos adultos.

Earl *et al.* (2006) detectaram a presença de svNGFs em diversas espécies de serpentes australianas da família Elapidae. Entretanto, ainda não se sabe ao certo a função desta classe de moléculas em venenos de serpentes, a despeito do fato de fatores de crescimento de nervo serem freqüentemente expressos em glândulas salivares de diversas espécies de vertebrados, sobretudo de mamíferos (Cohen, 2004). Pode-se especular, contudo, que os NGFs presentes em venenos de serpentes sejam componentes das glândulas salivares, adjacentes à glândula de veneno, e não propriamente da glândula de veneno.

A análise transcriptômica das bibliotecas de cDNA revelou importantes resultados entre as amostras analisadas (filhotes e adultos). Os clusters de transcritos celulares apresentaram uma grande diversidade porém não verificamos diferenças expressivas entre as diferentes bibliotecas - provavelmente um reflexo do baixo número de transcritos analisados. Por outro lado, a análise da expressão de toxinas nas bibliotecas de cDNA de filhotes e adultos (bem como de machos e fêmeas

adultas) mostrou diferenças importantes entre as amostras. Corroborando os dados da análise do sub-proteoma de proteinases e de proteômica quantitativa, metaloproteinases são a classe de toxinas mais expressa em todos os venenos. Por este motivo decidimos investigar de forma mais específica alguns clusters correspondentes a metaloproteinases.

5.2 Análise quantitativa da expressão de toxinas - Proteômica quantitativa e transcriptômica

5.2.1 Algumas considerações sobre as metodologias utilizadas

Um objetivo recorrente em projetos que empregam metodologias *high throughput* é a quantificação (seja ela relativa ou absoluta) de transcritos/proteínas/peptídeos presentes em misturas complexas. Neste contexto, além das análises descritivas e funcionais dos venenos, optamos também por construir bibliotecas de cDNA das glândulas de veneno de filhotes e adultos de forma separada, no intuito de avaliar as diferentes populações de transcritos destas amostras. Utilizamos também uma técnica recente de proteômica quantitativa, com o intuito de complementar nossas outras análises qualitativas. Para tanto, empregamos a técnica descrita por Ross *et al.* (2004) (exemplificada em maiores detalhes na Figura 5).

A capacidade de ionização de peptídeos em fase gasosa é uma condição imprescindível para a análise por espectrometria de massas e pode diferir de acordo com diversos fatores inerentes à amostra de estudo, bem como de acordo com as condições de operação dos sistemas de LC-MS/MS, solventes utilizados, entre outros fatores (Kinter e Sherman, 2000). Por este motivo, um espectro de massas *per se* não é considerado uma medida quantitativa. Contudo, diversas técnicas de quantificação aplicadas à espectrometria de massas têm sido desenvolvidas (para uma revisão

detalhada ver Ong e Mann, 2005 e Schulze e Usadel, 2010). Desta forma, o método descrito por Ross *et al.* (2004), que envolve a derivatização de peptídeos com *tags* isóbaros (reagentes iTRAQ™), tem sido cada vez mais utilizado, sobretudo nos estudos quantitativos que envolvem a digestão tripsínica em solução de amostras complexas (experimentos do tipo *shotgun proteomics*) (Aggarwal *et al.* 2006; Choe *et al.* 2005). Nestes casos uma cromatografia líquida de troca catiônica é geralmente uma etapa importante do processo (pré- MS) por “diminuir” a complexidade da amostra a ser analisada. Até o presente momento não temos conhecimento de trabalhos em proteômica de venenos que tenham utilizado este tipo de abordagem.

Contudo, como em toda metodologia, verificamos algumas desvantagens da técnica de derivatização de peptídeos com *tags* isóbaros, principalmente no que diz respeito à atribuição de função para as moléculas encontradas/quantificadas. Idealmente, a marcação de peptídeos com *tags* isóbaros para fins de quantificação relativa envolve a comparação de amostras semelhantes em *condições experimentais diferentes* (uma cultura celular controle e a mesma cultura submetida à ação de um determinado fármaco, por exemplo). Os perfis proteômicos dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* indicaram uma grande diferença entre as amostras, que conforme observamos, está relacionada principalmente com modificações pós-traducionais e com a expressão de proteínas diferentes durante a ontogênese dos animais, conforme descrito anteriormente. Outro fator (talvez o mais importante) que também deve ser levado em consideração é a presença de proteínas cujas estruturas primárias são desconhecidas nos venenos de filhotes e que, portanto, não figuram em nenhum banco de dados. Nestes casos, embora fragmentados pelo espectrômetro (durante o processo de MS/MS), os peptídeos não puderam ser correlacionados com nenhuma proteína já descrita.

A falta de um banco de dados mais “completo” é uma das principais dificuldades encontradas pelos pesquisadores que trabalham com proteômica em toxicologia (Calvete *et al.* 2007; Fox e Serrano, 2008b). Nestas condições, o seqüenciamento *De novo* é um método frequentemente utilizado, embora de

pouquíssima automação e, não raramente, de pouca eficácia em um experimento de proteômica quantitativa do tipo *shotgun* como o descrito neste trabalho. Pelas análises dos dados brutos (espectros de MS/MS) do nosso experimento de proteômica quantitativa percebemos outra potencial desvantagem do experimento de iTRAQ™ no que diz respeito a quantificação em um caso particular. Embora os peptídeos tripsínicos sempre apresentem um resíduo de lisina ou arginina na extremidade C-terminal, qualquer peptídeo tripsínico que apresente um resíduo de prolina na extremidade C-terminal (a massa média da prolina é igual a 97.12) apresentará, no espectro de MS/MS um íon **y1** com razão *m/z* igual a 116 (massa do resíduo de prolina + 2H⁺ + OH → 97+2+17 =116). Desta forma, a utilização do reagente iTRAQ™ 116 (íon repórter 116) para derivatizar peptídeos que apresentem resíduo de prolina C-terminal irá gerar um íon repórter de relação *m/z* igual a do íon **y1** deste peptídeo (ou seja, de relação *m/z* igual a 116), o que inviabilizaria a quantificação* (embora não altere o seqüenciamento do peptídeo). Em venenos de serpentes, particularmente no veneno de *B. jararaca*, uma classe importante de toxinas apresenta resíduos de prolina na região C-terminal: os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), cuja “seqüência-assinatura” apresenta freqüentemente dois resíduos de prolina C-terminais (Ianzer *et al.* 2004). Esta “desvantagem” da técnica de iTRAQ™ ainda não havia sido reportada, mas merece especial atenção no estudo de toxinas, principalmente para aquelas provenientes do veneno de serpentes. Por este motivo, embora identificados, os BPPs não foram apresentados na Tabela 16, que apresenta os resultados de proteômica quantitativa.

Por fim, outra desvantagem deste tipo de análise diz respeito à obtenção de informações mais detalhadas (acerca da função, por exemplo) das proteínas identificadas num experimento de digestão tripsínica *em solução*. A principal desvantagem inerente a esta abordagem é a perda de algumas informações importantes referentes às proteínas identificadas, como por exemplo, suas massas moleculares e/ou pontos isoelétricos. Esta informação é de extrema importância na atribuição de atividade às toxinas identificadas. Este é o caso, por exemplo, das

*Salvo em espectrômetros em que é possível se obter alta resolução (*e.g.* FT-ICR ou Orbitrap, Thermo Scientific).

metaloproteinases de veneno de serpentes. As metaloproteinases são enzimas proteolíticas cuja arquitetura em multidomínios é a principal característica que permite a distinção entre as diferentes classes (P-I a P-III). Além disso, a organização dos diferentes domínios nas proteínas maduras tem um reflexo direto na atividade biológica desempenhada pela proteinase (Fox e Serrano, 2008a).

Da mesma forma, ressalvas acerca das funções dos transcritos encontrados nas bibliotecas de cDNA também devem ser feitas. A montagem dos clusters a partir da sobreposição de ESTs seguiu parâmetros estridentes (98% de identidade entre ESTs) para se tentar evitar o agrupamento de seqüências parálogas, dada a quantidade de isoformas protéicas presentes em venenos de serpentes. Assim, a predição dos produtos gênicos a partir dos clusters montados nos forneceu uma idéia da diversidade/expressão de toxinas putativas na glândula de filhotes e adultos (machos e fêmeas), mas a função das proteínas putativas presentes nas diferentes amostras analisadas é algo que necessita de uma investigação mais detalhada. Este é o caso das metaloproteinases por exemplo. Analogamente ao que verificamos nas análises proteômicas por digestão tripsínica em solução, a menos que tenhamos obtido seqüências (clusters) que contemplem porções dos domínios metaloproteinase, tipo-disintegrina e rico em cisteínas, a inferência da presença de metaloproteinases da classe P-III não pode ser feita. Além disso, a alocação dos clusters em subclasses (P-IIa-e e P-IIIa-d, por exemplo) de metaloproteinases não pôde ser feita, pois o processamento pós-traducional pelo qual estas subclasses são submetidas não pode ser predito apenas pelas seqüências de nucleotídeos/aminoácidos.

5.2.2 Toxinas diferencialmente expressas - proteinases

Embora figure no título deste trabalho, é pertinente ressaltar que, no que concerne à análise transcriptômica, nosso objetivo principal não foi o de descrever o transcriptoma da glândula de veneno de *B. jararaca*. Como dito anteriormente, uma

análise deste tipo já foi feita por Cidade *et al.* (2006), com alguns resultados semelhantes aos que nós verificamos neste trabalho. As bibliotecas de cDNA construídas neste projeto tinham os seguintes propósitos: (1) obter bancos das ESTs mais abundantes nas glândulas de veneno de filhotes e adultos de *B. jararaca*, sobretudo para usá-los como ferramentas de apoio (se necessário) para as análises feitas por espectrometria de massas neste e em futuros projetos de nosso laboratório e (2) evidenciar diferenças no padrão de expressão de toxinas e composição dos venenos a partir da análise destes bancos criados.

Salvo algumas exceções, grande parte dos transcriptomas de glândulas de veneno de serpentes reportados até o momento são trabalhos descritivos, objetivando um detalhamento do panorama de toxinas putativas das mais diversas espécies de serpentes. Este tipo de abordagem é de extrema importância, visto que ainda não existe nenhum genoma de serpente descrito até o momento. Entretanto, em nossas análises objetivamos usar as bibliotecas de cDNA como forma de complementar as análises proteômicas/funcionais dos venenos estudados.

De forma geral, verificamos uma boa correlação entre os resultados obtidos nas análises proteômicas, sejam eles por meio dos géis bidimensionais (e subsequente identificação de proteínas por digestão tripsínica *in gel* seguida por LC-MS/MS), subproteomas de proteinases e proteômica quantitativa. Além disso, essa correlação é também observada quando se somam a estes resultados os dados obtidos na análise transcriptômica das glândulas de veneno de *B. jararaca*. Recentemente diversos autores têm reportado correlações entre os níveis de mRNA e proteínas em sistemas biológicos, utilizando metodologias complementares em proteômica e transcriptômica (Sanz *et al.* 2008; Tarun *et al.* 2008; Valente *et al.* 2009; Wagstaff *et al.* 2009; Seliger *et al.* 2009; Klevebring *et al.* 2010). Dentre as classes de toxinas cuja expressão mostrou-se expressivamente diferente entre as amostras analisadas (filhotes e adultos) estão as metaloproteinases. Por este motivo, optamos por analisar alguns clusters que foram montados com seqüências exclusivas de uma determinada biblioteca (filhotes ou adultos) e cujas seqüências nucleotídicas traduzidas

abrangessem os diferentes domínios funcionais das metaloproteínas (critério para classificação das metaloproteínas nas classes P-I a P-III). Na realidade, esta abordagem foi adotada em virtude dos resultados obtidos nas análises proteômicas dos venenos de filhotes e adultos, que apontaram para uma predominância de metaloproteínas da classe P-III no veneno de filhotes e de um aumento da classe P-I no veneno de adultos.

A análise dos Grupos de Clusters Relacionados (GCRs) permitiu avaliar a similaridade entre os clusters montados. A partir dessa análise observamos a mesma tendência verificada nas análises proteômicas e funcionais dos venenos de filhotes e adultos. Um exemplo foram os GCRs de metaloproteínas. Diversos clusters cujos produtos gênicos corresponderam a metaloproteínas da classe P-III foram de fato agrupados em GCRs (como o GCR 9, por exemplo). Neste e em outros casos, os clones das bibliotecas de cDNA de filhotes apresentaram uma contribuição relativa maior comparado aos clones da biblioteca de adultos. Além disso, o produto gênico predito a partir da análise da maioria dos clusters que compõem o GCR 9 é a Berythactivase, uma metaloproteína não-hemorrágica da classe P-III que apresenta atividade ativadora da protrombina (Silva *et al.* 2003). Desta forma, pode-se sugerir que a elevada atividade ativadora de protrombina verificada no veneno de filhotes seja decorrente da presença de metaloproteínas da classe P-III similares à Berythactivase. Ainda entre os GCRs correspondentes à metaloproteínas, o GCR 13 apresentou uma composição similar de clones oriundos das bibliotecas de cDNA de filhotes e adultos. A análise dos produtos gênicos preditos para os clusters que compõem este GCR resultou, em sua maioria, nas metaloproteínas hemorrágicas Bothropasina e Jararhagina. Neste caso, é interessante notar que a atividade hemorrágica dos venenos, característica frequentemente atribuída às estas metaloproteínas da classe P-III, não variou significativamente entre os venenos de filhotes e adultos.

Após a montagem dos clusters, observamos que na categoria “metaloproteínas” 48 clusters apresentaram seqüências nucleotídicas exclusivas da

biblioteca de filhotes. Destes, 16 clusters (após traduzidos) apresentaram similaridade com precursores de metaloproteínas da classe P-III e três destes clusters mostraram-se mais expressos (BJOTD0209C, BJOTD0228C e BJOTD0238C); os demais apresentaram similaridade apenas com regiões do pró-domínio e domínio catalítico das metaloproteínas. A interpretação destes achados, contudo, deve ser cautelosa. Como dito anteriormente, há a possibilidade de algumas ESTs vindas da biblioteca de filhotes corresponderem a porções diferentes de um mesmo transcrito, que poderia também estar presente na biblioteca de adultos. Assim, durante a montagem dos clusters estas ESTs, não-sobreponíveis com ESTs da biblioteca de adultos, seriam consideradas como exclusivas de filhotes, por exemplo. Ainda assim, dos 16 clusters “exclusivos” de metaloproteínas da classe P-III da biblioteca de filhotes, optamos por analisar apenas aqueles cuja expressão mostrou-se pronunciada em relação aos demais. Outra evidência da maior expressão de metaloproteínas da classe P-III no veneno de filhotes foi verificada na análise do subproteoma de metaloproteínas, que apresentou uma intensa imunocoloração na região característica de metaloproteínas pertencentes a esta classe. Este resultado reforça a hipótese que de fato a classe P-III é mais expressa no veneno de filhotes em relação ao de adultos. Entretanto, no experimento de proteômica quantitativa a maioria dos peptídeos identificados de metaloproteínas foram provenientes do domínio metaloproteína, característica que não permitiu a distinção entre as diferentes classes funcionais destas proteínas.

Dentre os 26 clusters exclusivos de metaloproteínas analisados na biblioteca de adultos, um se mostrou altamente expresso, o cluster BJOTD0087C (com 32 ESTs em sua composição). Quando analisado por BlastX este cluster apresentou 95% de similaridade com o precursor da metaloproteína da classe P-II Bothrostatina (gi|82219563|) e a tradução de sua seqüência nucleotídica resultou na estrutura primária quase completa desta metaloproteína. É interessante notar que no experimento de proteômica quantitativa também observamos uma maior abundância relativa de peptídeos correspondentes a esta metaloproteína no veneno de adultos,

como evidenciado pelos peptídeos DMINVQPAAPQTLDSFGWEWR e TDLLNR, ambos pertencentes ao domínio catalítico desta proteinase e aproximadamente duas vezes mais abundante no veneno de adultos (Tabela A5). Estes dados são ainda corroborados pela análise de LC-MS/MS dos peptídeos tripsínicos extraídos das proteínas contidas nos *spots* 10 e 11 do gel bidimensional do veneno de adultos de *B. jararaca* (Figura 10 e Tabela 8), que também resultaram na identificação da Bothrostatina. É importante lembrar que estes são também os principais *spots* diferenciais entre as amostras de veneno de filhotes e adultos e todos os peptídeos identificados corresponderam à região do domínio metaloproteinase das proteínas. Outro aspecto que deve ser levado em consideração é que, como dito anteriormente, apesar de termos indícios da abundância de metaloproteinases pertencentes à classe P-I no veneno de adultos, não é possível precisar se este resultado é decorrente de uma maior presença desta classe ou de precursores com estrutura do tipo P-IIa, em que os domínios metaloproteinase e disintegrina são processados pós-traducionalmente na proteína madura. No caso da Bothrostatina, o domínio disintegrina foi expresso por Fernandez e colaboradores (2005), contudo à exceção dos dados do presente trabalho, ainda não existem indícios da presença desta metaloproteinase da classe P-II no veneno de *B. jararaca*. Em conjunto, esses resultados, contudo, sugerem uma expressão diferenciada de metaloproteinases da classe P-I(PIIa) no veneno de adultos de *B. jararaca*.

Outra classe de toxina que apresentou diferenças quanto à abundância relativa foi a das serinoproteinases, mais abundantes no veneno de adultos de *B. jararaca*. Diferente das metaloproteinases, em que quase a totalidade das identificações se deu por BlastX, a maioria das identificações dos clusters de serinoproteinases se deu por BlastN. Este fato se deve ao tamanho relativamente grande das regiões 3'-não traduzidas (UTRs) dos transcritos correspondentes a serinoproteinases, característica já observada por Junqueira-de Azevedo e Ho (2002) e Cidade *et al.* (2006) nos transcritos correspondentes a serinoproteinases das bibliotecas de *B. insularis* e *B. jararaca*, respectivamente. Novamente aqui verificamos correlações com os dados de

proteômica quantitativa, em que a abundância relativa dos peptídeos identificados e quantificados foi maior no veneno dos adultos, variando de aproximadamente 2 até 4 vezes em relação ao veneno de filhotes (Tabela 11). Alguns *spots* diferenciais do gel bidimensional do veneno de adultos são também serinoproteinases, como é o caso dos *spots* 3 e 13, por exemplo, identificados como as serinoproteinases KN-BJ2 (gi|13959622|) e Ancrod (gi|461511|), respectivamente. Resultados semelhantes foram verificados por Alape-Gíron *et al.* (2008) na análise do proteoma do veneno de filhotes e adultos de *B. asper* da Costa Rica. Conforme estes autores há um aumento de quase 3 vezes na expressão de serinoproteinases no veneno dos animais adultos.

5.3 A variabilidade no veneno de *B. jararaca* e suas implicações biológicas

Variação ontogenética na dieta é uma característica presente na espécie *B. jararaca*, em que os indivíduos recém-nascidos apresentam a extremidade da cauda com coloração (branca) diferenciada do restante do corpo, uma estratégia bastante eficaz para atrair presas que “confundem” a morfologia e coloração da cauda com suas presas e acabam por tornarem-se presas de filhotes de *B. jararaca* (estratégia conhecida como “engodo caudal”; Martins *et al.* 2002). Andrade e Abe (1999) mostraram a relação da dieta e ontogenia com a atividade letal do veneno de duas espécies do gênero *Bothrops* de diferentes hábitos alimentares: *B. alternatus*, de dieta especialista, que se alimenta de presas endotérmicas (mamíferos) durante toda a vida e *B. jararaca*, de dieta generalista quando filhote (alimentando-se de artrópodes, lagartos e anfíbios) e especialista (alimentando-se preferencialmente de mamíferos) quando adulta. Esses autores verificaram uma maior letalidade do veneno de filhotes de *B. jararaca* para anfíbios, enquanto o veneno dos adultos mostrou-se mais letal para camundongos. Por outro lado, a letalidade do veneno de filhotes e adultos da espécie *B. alternatus* não diferiu significativamente independente do modelo experimental utilizado. Em nossos resultados verificamos um padrão semelhante, com o veneno dos adultos apresentando valores de DL₅₀ menores que os de filhotes em camundongos. Contudo, quando utilizamos aves como modelo experimental o

veneno de filhotes de *B.jararaca* se mostrou aproximadamente 27 vezes mais letal em comparação ao dos adultos.

Uma maior atividade letal sobre aves do veneno de filhotes de *B. jararaca* pode ter implicações ecológicas: pássaros estão entre os maiores predadores de serpentes, principalmente de filhotes (Robinson, 1994). Desta forma, o fato de filhotes de *B. jararaca* possuírem um veneno com uma maior atividade letal sobre aves poderia conferir “proteção” contra potenciais predadores, tendo em vista o tamanho e a pequena quantidade de veneno produzida nestas etapas iniciais de vida. Neste sentido, a elevada atividade coagulante que verificamos no veneno de filhotes poderia ser um dos principais fatores responsáveis por esta ação letal, atuando de forma a promover uma coagulação intravascular disseminada e massiva, levando as aves a um quadro de choque.

É interessante notar que, se correlacionarmos a quantidade de veneno obtida por animal (valores apresentados no sub-item 3.1.1) com os valores de DL_{50} para camundongos encontrados neste trabalho, verificamos que há, na glândula filhotes, cerca de 0,44 DL_{50} enquanto que, para os adultos, esse valor chega a 57,6 DL_{50} . Para aves os valores ficam em 29 DL_{50} e ~96 DL_{50} , para filhotes e adultos, respectivamente. Mesmo se levarmos em consideração itens alimentares consumidos por filhotes e adultos, como no estudo reportado por Andrade e Abe (1999) essa relação é mantida, isto é, a glândula de adultos contém um número de DL_{50} muito superior à de filhotes. Serpentes injetam seus venenos em grandes quantidades em suas presas e não é raro que a quantidade injetada exceda facilmente os valores de DL_{50} (Mebs, 1999). Claramente pode-se sugerir que a função principal dos venenos seria subjugar a presa e, neste contexto, um dos efeitos decorrentes do envenenamento seria iniciar o processo de digestão de presas. Os venenos de filhotes e adultos possuem características distintas, que estão associadas à captura de presas também distintas, contudo deve-se ressaltar que essa relação não é do tipo causa-conseqüência, mesmo porque essa seria uma visão muito simplista de um complexo processo ecológico. A

modulação da expressão de determinados genes de toxinas deve ser um dos fatores preponderantes na capacidade dos animais de subjugar presas distintas.

Uma das classes de toxinas que apresentou expressão pronunciada na análise transcriptômica da biblioteca de filhotes foi a dos svVEGF (quase 4 vezes mais expressos na glândula de filhotes). A participação destes fatores no envenenamento ainda não é muito clara, porém Junqueira-de-Azevedo *et al.* (2001) reportaram a clonagem e expressão funcional de um svVEGF da glândula de veneno de *B. insularis*, que, no envenenamento, atuaria como um agente que propicia a disseminação do veneno por entre os tecidos da presa. Neste contexto, é possível sugerir uma hipótese para a presença acentuada de transcritos codificantes para fatores de dispersão na glândula de veneno de filhotes: sendo menores e, conseqüentemente, tendo uma glândula de veneno de menor tamanho, a quantidade de veneno disponível (passível de ser injetada numa presa/predador) é muitas vezes menor em relação àquela equivalente (e potencialmente) utilizada pelos animais adultos. Assim, a maior expressão de fatores de dispersão (como os svVEGFs) poderia compensar o menor volume de veneno produzido pelos filhotes. Embora conjectural, esta parece ser uma hipótese plausível do ponto de vista ecológico.

Corroborando diversos trabalhos acerca da atividade coagulante dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Rosenfeld *et al.* 1959; Nahas *et al.* 1979; Kamiguti, 1988; Furtado *et al.* 1991; Zelanis *et al.* 2007; Antunes *et al.* 2010), os venenos de filhotes mostraram-se cerca de 10 vezes mais ativos na atividade coagulante sobre o plasma, bem como ativaram de forma mais rápida e intensa os fatores II e X da cascata de coagulação sanguínea. Estes dados, associado ao fato de que a atividade coagulante do veneno de filhotes foi inibida pela pré-incubação do veneno com EDTA, sugerem a participação de metaloproteinases nesta atividade. Neste cenário, é provável que haja diferença de especificidade de substrato entre as metaloproteinases do veneno de filhotes e as de adultos. Até o momento nenhuma proteinase com a habilidade de ativar o Fator X foi isolada do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Por outro lado, a Bothrojaractivase, é uma metaloproteinase da

classe P-I que foi isolada do veneno de adultos de *B. jararaca* por Berger e colaboradores (2008) e apresentou capacidade de ativação do fator II (pró-protrombina).

Outra classe importante de toxinas cuja expressão mostrou-se diferencial entre os venenos de filhotes e adultos foram as metaloproteinases. Estas enzimas representam uma porcentagem expressiva na composição do *pool* de mRNAs das glândulas de veneno de diversas espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (Junqueira de Azevedo e Ho, 2002; Kashima *et al.* 2004; Cidade *et al.* 2006; Neiva *et al.* 2009), bem como têm importante papel no envenenamento, atuando em diversos processos fisiológicos, como a coagulação sanguínea, ou levando ao desenvolvimento e agravamento de processos hemorrágicos (Gutiérrez e Rucavado 2000; Gutiérrez *et al.* 2005; Fox e Serrano, 2008a). Assim, em espécies de serpentes que apresentam uma variação ontogenética na dieta, é plausível considerar a regulação da expressão de toxinas cuja atividade possa facilitar a subjugação de presas de diferentes tamanhos. De fato esta hipótese parece ser bastante plausível, pois de acordo com nossos resultados há um aumento da atividade proteolítica sobre diferentes substratos (gelatina, fibrinogênio e caseína) no veneno dos animais adultos de *B. jararaca*.

Na análise da variabilidade ontogenética do veneno de *B. insularis*, foi verificado um aumento na atividade proteolítica inespecífica de metaloproteinases da classe P-III no veneno dos animais adultos (Zelanis *et al.* 2007), característica também verificada na análise da variabilidade do veneno de *B. jararaca*, conforme os resultados apresentados neste trabalho. Esta característica pode refletir a necessidade da ação desta classe de enzimas para a subjugação de presas maiores. Visto que o veneno de filhotes parece ser abundante em metaloproteinases da classe P-III, qual seriam as bases moleculares que poderiam explicar as diferenças entre as atividades verificadas por estas proteinases no veneno de filhotes e de adultos ?

A resposta pode residir em aspectos que envolvem a modificação da estrutura e, certamente, da função destas enzimas nos venenos de filhotes e adultos. Pela

análise dos resultados de *N*-deglicosilação dos venenos de filhotes e adultos (Figura 19) percebemos que os perfis proteômicos das amostras tornam-se mais semelhantes entre si após a completa *N*-deglicosilação. A coloração fluorescente para carboidratos corroborou estes dados e a identificação de *spots* de proteínas destas regiões dos géis bidimensionais dos venenos de filhotes e adultos mostrou que as principais classes de toxinas presentes são proteinases (metaloproteinases e serinoproteinases). De fato, a análise do sub-proteoma de proteínas com afinidade pela lectina concanavalina A mostrou que metaloproteinases e serinoproteinases estão entre as principais toxinas glicosiladas em ambos os venenos. Deve ser ressaltado, contudo, que estas glicoproteínas correspondem a uma subpopulação de *N*-glicoproteínas, visto que a lectina concanavalina-A tem afinidade por trimanosídeos terminais (Brewer e Bhattacharyya, 1986; Naismith e Field, 1996).

Glicosilações, sobretudo *N*-glicosilações, são importantes modificações pós-traducionais que conferem estabilidade estrutural a proteínas, um resultado da formação de várias interações intramoleculares envolvendo porções de carboidratos ligados e diversos resíduos da cadeia peptídica (Wang *et al.* 1996; Mitra *et al.* 2006). Após a *N*-deglicosilação total dos venenos é possível notar diferenças no padrão de migração eletroforética das proteínas nos géis. Essas diferenças podem ser devidas à micro-heterogeneidades de carga, que levam a alterações discretas na migração das proteínas durante a primeira dimensão (focalização isoelétrica). Resultados semelhantes foram reportados em estudos de modificações pós-traducionais no proteoma dos venenos de serpentes australianas por Earl *et al.* (2006) e Birrel *et al.* (2007). Há que se considerar também a desestabilização estrutural que proteínas glicosiladas sofrem após deglicosilação, o que as torna mais suscetíveis à autólise, como observado por Oliveira *et al.* 2010 em análise de metaloproteinases das classes P-I e P-IIIb isoladas do veneno de *B. jararaca*. García *et al.* (2004) mostraram o efeito de modificações pós-traducionais na atividade hemorrágica de metaloproteinases de venenos de serpentes, reportando uma diminuição na atividade hemorrágica da Jararhagina (uma metaloproteinase da classe P-IIIb isolada do veneno de *B. jararaca*) após *N*-deglicosilação. Nossos resultados também sugerem uma diferenciação

quantitativa na extensão de modificações pós-traducionais em proteínas dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*. Estas micro-heterogeneidades estruturais podem responder pelas diferentes atividades relacionadas à metaloproteinases da classe P-III nos venenos de filhotes e adultos. Assim, é possível que as metaloproteinases da classe P-III presentes no veneno de filhotes tenham maior seletividade sobre substratos moleculares presentes na cascata de coagulação sanguínea (Fatores II e X, por exemplo). Dentre as metaloproteinases que apresentam intensa atividade sobre o Fator X estão aquelas pertencentes à subclasse P-IIIId. Um exemplo é a metaloproteinase RVV-X, isolada da serpente *Daboia russeli* por Takeya e colaboradores (1992). Até o momento, nenhuma metaloproteinase da classe P-IIIId foi descrita em venenos de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*, contudo é possível que enzimas pertencentes à esta subclasse sejam mais expressas no veneno de filhotes de *B. jararaca*.

Em análise de características químicas da *Bothrops* protease A (BPA), uma serinoproteinase isolada do veneno de *B. jararaca*, Murayama *et al.* (2003) verificaram que esta proteína apresenta um alto teor de glicosilações (8 sítios de *N*-glicosilação e 2 sítios de *O*-glicosilação), que contribuem em cerca de 60% da massa molecular total da proteína, além de responder pela estabilidade desta enzima. Glicosilações são características recorrentes em serinoproteinases de venenos de serpentes (Serrano e Maroun, 2005). Silva-Junior *et al.* (2007) isolaram e caracterizaram uma serinoproteinase, BJ-48, do veneno de *Bothrops jararacussu* em que carboidratos *N*-ligados respondem por cerca de 40% da massa molecular da proteína, sendo responsáveis pela termoestabilidade desta enzima e por bloquear estericamente o acesso a inibidores canônicos de serinoproteinases (como SBTI, por exemplo) ao sítio ativo da proteinase. Características semelhantes foram também verificadas nas proteínas AaV-SP-I e AaV-SP-II, duas serinoproteinases glicosiladas isoladas do veneno de *Agkistrodon acutus* por (Zhu *et al.* 2005). Conforme os autores, os volumosos resíduos de polissacarídeos presentes no *loop* 37 da estrutura tridimensional destas proteínas bloqueiam estericamente a ligação do inibidor SBTI.

Em nossas tentativas iniciais de identificação de proteínas por *peptide mass fingerprint* não obtivemos êxito quando foram recortados *spots* dos géis de filhotes na região de 50 a 70 kDa (e *pI* variando entre 4,3 a 5,5). A causa provável pode ter sido o incremento de massa causado pela porção de carboidratos nos peptídeos, impossibilitando a identificação correta em banco de dados.

Outro aspecto interessante da variabilidade dos venenos de *B. jararaca* está relacionado aos nossos resultados da análise de *N*-glicanos dos venenos de filhotes e adultos por espectrometria de massas. Nossos resultados apontaram para um perfil praticamente idêntico na composição de *N*-glicanos dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*. Há, contudo, a possibilidade de termos identificado apenas os glicanos que apresentaram maior abundância/eficiência de ionização (que parecem não diferir entre as amostras).

Entretanto, considerando que o nível de *N*-glicosilação parece ser distinto entre as amostras é possível especular que a ocupação dos sítios de *N*-glicosilação nas glicoproteínas dos venenos de filhotes e adultos é diferente. Assumindo que a composição de *N*-glicanos nas glicoproteínas não varia nos venenos de filhotes e adultos, a diferença na utilização do motivo-consenso de *N*-glicosilação (N-X-S/T, em que X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina) poderia explicar as diferenças verificadas nas mobilidades eletroforéticas após completa *N*-deglicosilação das proteínas dos venenos de filhotes e adultos. Este também parece ser um cenário parcimonioso, uma vez que não haveria a necessidade de se produzir composições glicídicas distintas conforme a idade dos animais. Ao invés disso, as inúmeras combinações geradas pelas diferenças de utilização dos sítios de glicosilação e a presença de diferentes isômeros estruturais para uma mesma composição glicídica elevam exponencialmente a probabilidade da geração de glicofomas distintas em ambos os venenos (uma representação gráfica desta hipótese foi mostrada na Figura 26). O papel biológico dos diferentes isômeros estruturais, bem como o de glicofomas de proteínas em venenos não é bem conhecido, contudo o resultado deste processo biológico (geração de glicofomas),

em última instância, é a variabilidade verificada no produto biológico final: o veneno. Apesar da expressiva N-glicosilação presente nas toxinas dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*, na análise dos transcritos celulares das bibliotecas de cDNA de filhotes e adultos verificamos poucos clones cujos produtos são proteínas envolvidas na via de glicosilação (singletes BJOTD0540S e BJOTD0738S).

Verificamos também indícios de dimorfismo sexual na composição dos venenos de machos e fêmeas adultas de *B. jararaca*. Diferenças nos proteomas dos venenos de machos e fêmeas adultas de *B. jararaca* já haviam sido estudadas por nosso grupo com resultados semelhantes no que diz respeito aos perfis eletroforéticos, atividades biológicas e presença de peptídeos biologicamente ativos (Menezes *et al.* 2006; Furtado *et al.* 2006; Pimenta *et al.* 2007, respectivamente).

Embora não tenhamos objetivado uma análise funcional dos venenos de machos e fêmeas adultas, se correlacionarmos os resultados obtidos nas análises proteômica e transcriptômica com aqueles apresentados por Furtado *et al.* (2006), (em análise dos venenos de machos e fêmeas adultas da espécie *B. jararaca*) podemos observar uma forte relação entre a presença/abundância de algumas classes de toxinas e atividades biológicas. Conforme estes autores (Furtado *et al.* 2006) o veneno dos machos adultos apresentou uma atividade miotóxica e fosfolipásica significativamente maior que o das fêmeas. Estas atividades estão relacionadas, uma vez que a miotoxicidade é freqüentemente atribuída a isoformas K-49 de fosfolipases A2 (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Kini, 1997). De fato, em nossos resultados verificamos uma expressão pronunciada de fosfolipases A2 na análise dos transcritos da biblioteca de machos adultos de *B. jararaca* (quase cinco vezes maior). Segundo Furtado *et al.* (2006) a atividade hemorrágica do veneno de *B. jararaca*, atribuída à atividade de metaloproteinases, foi significativamente maior no veneno das fêmeas. Em concordância com este resultado, também verificamos uma maior expressão de metaloproteinases na análise dos transcritos da biblioteca de fêmeas.

Embora as implicações biológicas destes resultados não sejam facilmente evidentes a partir apenas do perfil proteômico/transcriptômico dos venenos,

algumas hipóteses podem ser formuladas. Conforme Furtado *et al.* (2006), a diferença de tamanho das fêmeas em relação aos machos de *B. jararaca* e, possivelmente, a diferença de dieta que machos e fêmeas adotariam na natureza poderia refletir uma partição de nicho ecológico, na qual, uma diferença sexual na dieta evitaria interações intra-específicas desarmônicas entre machos e fêmeas (competição por um mesmo tipo de alimento, por exemplo), tendo importantes conseqüências também na composição dos respectivos venenos. Hipótese semelhante foi também formulada por Travaglia-Cardoso *et al.* (2010) em análise do dimorfismo sexual no desenvolvimento e produção de veneno da serpente *B. insularis*. Conforme esses autores, a potencial interação intra-específica desarmônica na população desta espécie insular pode ser minimizada na medida em que machos e fêmeas se alimentam de itens alimentares diferentes.

Entretanto, essas são apenas hipóteses que poderiam estar relacionadas com as diferenças nos perfis de toxinas verificados nos venenos de machos e fêmeas de *B. jararaca*. Uma análise de conteúdo estomacal de machos e fêmeas seria de grande importância no intuito de se verificar uma diferença na preferência de presas pelos animais.

5.4 Considerações acerca do peptidoma do veneno de *B. jararaca*

Neste trabalho exploramos alguns aspectos do peptidoma dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*. Embora esta abordagem tenha dado ênfase na identificação dos BPPs, identificamos também alguns peptídeos oriundos de processos proteolíticos, como fragmentos de metaloproteinases e L-aminoácido oxidases (dados não mostrados). Ao analisarmos nossas amostras de peptídeos dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF observamos, além de massas correspondentes a BPPs conhecidos, diversas massas cuja identidade não pôde ser correlacionada com a estrutura primária de nenhum peptídeo descrito em venenos até o momento. Por este motivo optamos por proceder uma incubação prévia das amostras com inibidores de metaloproteinases e serinoproteinases. Nossos resultados sugerem que a diferença

nas massas observadas quando as amostras não foram incubadas com os inibidores pode refletir diferenças de especificidade de clivagem por diferentes proteinases presentes nas amostras de veneno. A incubação prévia com EDTA resultou em um espectro de massas “menos complexo”, se comparado àquele gerado após a incubação das amostras com PMSF. Esse resultado sugere a participação intensa de metaloproteinases na proteólise de componentes do próprio veneno, fato já observado por outros grupos (Sousa *et al.* 2001; Moura da Silva *et al.* 2003; Marques-Porto *et al.* 2008).

A elevada concentração de proteínas na glândula de veneno (cerca de 100 mg/mL, resultados não publicados) poderia tornar inviável a manutenção deste epitélio e, conseqüentemente, a existência do próprio veneno, não fossem algumas “estratégias” existentes para suplantar o efeito da alta concentração de hidrolases, tais como o baixo pH do veneno e a alta concentração do íon citrato na glândula de veneno (Marques-Porto *et al.* 2008; Francis *et al.* 1992; Freitas *et al.* 1992). Marques-Porto *et al.* (2008) mostraram que um tripeptídeo de seqüência piroglutamil-lisil-triptofano (<E-K-W) presente no veneno de *B. jararaca* é capaz de inibir a atividade de metaloproteinases do veneno sobre um substrato fluorogênico. Recentemente Favreau *et al.* (2007) demonstraram a existência de peptídeos ricos em histidina e glicina no veneno de *Atheris squamigera* e *A. nitschei*. Os autores propuseram a participação deste peptídeo, denominado pHpG (poli-histidina-poli-glicina), na atividade inibitória de metaloproteinases, por meio de interação da seqüência de histidinas com o átomo de zinco, presente no sítio ativo das metaloproteinases. É interessante observar que tanto o tripeptídeo <E-K-W quanto o pHpG estão presentes na seqüência do precursor dos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) (o peptídeo <E-K-W é na verdade encontrado na forma Q-K-W; a glutamina sofre um processamento pós-traducional, em que ocorre a ciclização deste resíduo em ácido piroglutâmico, aqui representado pelo símbolo <E). A diluição dos venenos em concentrações muitas vezes menores que aquelas encontradas na glândula de veneno, por si só já é um fator que poderia iniciar a atividade de proteinases. Uma

vez injetado, os inibidores presentes na glândula de veneno tornam-se diluídos na circulação da presa. Além disso a elevação do pH para valores próximos da neutralidade (pH ~7,2) torna ativa a maioria das proteinases presentes nos venenos.

Dentre os resultados verificados na análise peptidômica, especial atenção deve ser dada às novas estruturas primárias de BPPs que encontramos. Peptídeos potenciadores de bradicinina são moléculas bioativas ricas em prolina, expressas na glândula de veneno de *B. jararaca* (Hayashi e Camargo, 2005). Eles são considerados marcos no estudo da fração peptídica do veneno de diversas espécies de viperídeos, tendo sido purificados ou identificados por técnicas bioquímicas clássicas e espectrometria de massas (Ferreira, 1965; Ferreira *et al.* 1998; Menin *et al.* 2008). Neste estudo verificamos estruturas primárias que indicam um processamento dos BPPs de forma diferente da canonicamente descrita na literatura toxicológica (Murayama *et al.* 1997). Observamos a presença de um N-terminal diferenciado, composto da seqüência <E-Q-W-A (<E representa a ciclização de um resíduo de glutamina em ácido piroglutâmico, uma modificação pós-traducional comum neste tipo de molécula, catalizada por aciltransferases específicas denominadas glutaminil ciclases (Pawlak e Kini, 2006)). A análise do precursor típico dos BPPs descrita pioneiramente por Murayama e colaboradores (1997) sugere que a seqüência Q-Q-W-A seria um *linker* entre os BPPs que estão organizados em *tandem* na estrutura do precursor (vide Figura 29). Até o momento a enzima responsável pelo processamento dos BPPs maduros a partir do seu precursor não foi descrita. Sabe-se, contudo, que esse mecanismo não parece apresentar similaridade com a via de processamento de peptídeos bioativos que envolve a ação de serinoproteinases *Kex2-like*, que atua sobre resíduos básicos (Lipkind *et al.* 1995; Murayama *et al.* 1997). Além disso, verificamos também formas do BPP 11e, cujo C-terminal apresentou os resíduos A-P ou A-P-L (Tabela 16). A forma do BPP 11e + A-P já avia sido descrita por Rioli e colaboradores (2008), que nomearam este BPP como BPP-AP. Conforme relatado pelos autores em experimentos na microcirculação de camundongos, o BPP-AP apresenta uma capacidade vasodilatadora de arteríolas superior à do BPP 11e.

Desta forma, nossos dados sugerem, além da presença de novas estruturas de BPPs, uma forma de processamento pós-traducional diferenciada daquela anteriormente descrita para os BPPs. É importante ressaltar que, além dos BPPs listados na Tabela 16, verificamos espectros de MS/MS correspondentes a outros BPPs, com os sinais típicos dos íons y_1 e y_2 , correspondentes aos dois resíduos de prolina C-terminais ($m/z = 116$ e 213 , respectivamente). Contudo, a despeito destas *seqüências-assinatura* de BPPs, estes espectros apresentaram-se bastante ruidosos para identificação manual e também não foram incluídos na lista de identificações geradas pelo programa Mascot.

Assim, observamos a extensão da variabilidade do veneno de *B. jararaca* além do proteoma. Novamente, estes resultados indicam uma maior complexidade dos venenos de viperídeos, particularmente desta espécie. Projetos em andamento em nosso laboratório têm como objetivo verificar a atividade biológica dos novos BPPs encontrados neste trabalho.

5.5 Considerações finais

O envenenamento ofídico foi recentemente incluído na lista de doenças tropicais negligenciadas (Williams *et al.* 2010). É considerado uma doença ocupacional, acometendo diversos trabalhadores rurais, principalmente em países subdesenvolvidos, em que o acesso ao soro anti-ofídico é precário ou até mesmo inexistente (Warrell, 2010). Considerando a mortalidade dos casos (que varia de 20.000 a 125.000 por ano no mundo), o envenenamento ofídico chega a figurar entre as doenças tropicais negligenciadas de maior mortalidade (Williams *et al.* 2010), o que denota a sua grande importância no âmbito da saúde pública. Neste cenário, o estudo dos venenos ofídicos é de extrema importância, pois fornece os subsídios para o entendimento dos alvos-moleculares das toxinas, aspectos fisiopatológicos do envenenamento, além de auxiliar no desenvolvimento dos correspondentes antivenenos. Desta forma, acreditamos que uma das grandes contribuições deste

trabalho foi a de acrescentar informações importantes sobre a composição do veneno da espécie *B. jararaca*, cujo veneno compõe 50% do *pool* de imunização dos cavalos na produção do soro anti-botrópico nacional (Instituto Butantan). Kamiguti (1988) já havia reportado a baixa capacidade de neutralização da atividade coagulante do veneno de filhotes de *B. jararaca* pelo soro anti-botrópico comercial. Em um trabalho recente, Antunes *et al.* (2010) mostraram o baixo título de anticorpos do soro anti-botrópico produzido pelo Instituto Butantan contra proteínas do veneno de filhotes de *B. jararaca* em comparação ao veneno de adultos.

A variabilidade verificada nos venenos ofídicos tem, portanto, uma grande importância sobretudo para a seleção do *pool* de imunização de cavalos para produção de soros. Assim, esperamos que os dados reportados neste trabalho possam servir de alicerce para projetos futuros que versem sobre a variabilidade em venenos ofídicos, bem como possam nortear o aprimoramento dos soros-antiofídicos produzidos atualmente.

6. Conclusões

1. A análise proteômica do veneno de *B. jararaca* revelou perfis distintos para o veneno de filhotes e adultos desta espécie, bem como um dimorfismo sexual entre os venenos de machos e fêmeas adultas;
2. A atividade proteolítica sobre fibrinogênio, gelatina e caseína do veneno de adultos mostrou-se mais intensa em relação ao veneno de filhotes. Esta característica pode estar associada a capacidade de subjugar presas de maior porte, além de sugerir uma diferença de especificidade de substratos por proteinases dos venenos dos animais em diferentes fases de vida;
3. O proteoma do veneno de filhotes apresentou uma diversidade de isoformas ácidas (*pIs* variando de 4,3 a 5,5), de alta massa molecular (50 a 70 kDa) de metaloproteinases da classe P-III enquanto o veneno de adultos mostrou uma abundância de metaloproteinases da classe P-I(P-IIa) com massas moleculares variando de 23 a 30 kDa e *pI* entre 6,0 e 7,0;
4. Metaloproteinases estão entre as principais toxinas diferencialmente expressas nos venenos de filhotes e adultos. Neste sentido, a principal diferença verificada pela análise proteômica e transcriptômica diz respeito ao quociente de metaloproteinases da classe P-III/P-I, maior no veneno de filhotes;
5. A atividade coagulante sobre o plasma verificada no veneno de filhotes de *B. jararaca* é o resultado da atividade majoritária de metaloproteinases, enquanto para o veneno dos adultos, esta atividade é desempenhada concomitantemente por serinoproteinases e metaloproteinases. Neste contexto, a elevada atividade coagulante sobre o plasma verificada nos venenos de filhotes é decorrente, em parte, da maior velocidade e intensidade

com que este veneno ativa os Fatores II e X da cascata de coagulação sanguínea;

6. A maior letalidade do veneno de filhotes sobre aves pode estar relacionada com a intensa atividade coagulante deste veneno sobre o plasma. Esta característica do veneno de filhotes poderia configurar uma defesa contra potenciais predadores na natureza;
7. Os perfis peptídicos dos venenos de *B. jararaca* filhotes e adultos apresentaram diferenças expressivas quando as amostras de veneno foram incubadas previamente com inibidores de metaloproteinases e serinoproteinases (EDTA e PMSF, respectivamente), característica que sugere a participação destas toxinas em processos proteolíticos, bem como na geração da diversidade da complexidade do peptidoma dos venenos;
8. A análise do sub-peptidoma de peptídeos potenciadores de bradicinina revelou novos peptídeos, diferentes das formas canônicas já conhecidas e cujas estruturas primárias sugerem uma diferenciação no processamento pós-traducional destas moléculas no veneno;
9. Analisamos 2166 clones das bibliotecas de filhotes e adultos (machos e fêmeas) de cDNA de *B. jararaca*, que compuseram 965 clusters. Deste universo, os transcritos correspondentes a toxinas compõem cerca de metade das mensagens presentes nas glândulas e mostraram ainda expressiva diferença quanto à expressão nos venenos de espécimes filhotes e adultos;
10. Os resultados de proteômica e transcriptômica revelaram que metaloproteinases são as classes de toxinas mais abundantes no veneno de filhotes; no veneno de adultos a expressão de serinoproteinases, precursores de peptídeos potenciadores de bradicinina, e lectinas tipo-C duplica em relação ao veneno de filhotes;

11. Verificamos um dimorfismo sexual entre os venenos de machos e fêmeas adultas de *B. jararaca*. Fatores de crescimento de nervo estão entre as toxinas aparentemente exclusivas do veneno de machos adultos;
12. Diferenças no nível e extensão de *N*-glicosilações, são responsáveis pela grande variabilidade verificada nos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca* e constituem uma importante forma de diversificação dos proteomas dos venenos;
13. Este é o estudo mais abrangente sobre a variabilidade do veneno de uma serpente já realizado. Seus resultados demonstram que ocorre um amplo rearranjo na composição do veneno desta espécie, o qual deve acontecer na fase de transição entre as idades infantil e adulta da serpente. Os fatores da regulação gênica que determinam este rearranjo não são conhecidos, nem se este é influenciado por mudanças hormonais na serpente, mas certamente este acompanha as mudanças corporais e de dieta que caracterizam a espécie, implicando que toxinas altamente expressas em uma determinada fase da vida permitiriam à serpente atingir a máxima eficiência de seu veneno para um determinado tipo de presa.

7. Referências

Adams, M.D, Kelley, J.M, Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merry, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F *et al.* Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252 1651-1656, 1991.

Aggarwal, K., Choe, L.H., Lee, K.H. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* 5(2): 112-20, 2006.

Alape-Giron, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-dias, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J. Snake venomomics of the lancehead *Bothrops asper* Geographical, individual and ontogenetic variations. *J. Proteome. Res.* 7(8): 3556-71, 2008.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997.

Andrade, D.V.; Abe, A. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. *Herpetologica*, 55(2), 200-204, 1999.

Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Fontes, M.R., Fuly, A.L., Corrêa, F.M., Rosa, J.C., Greene, J.L., Giglio, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem. Pharmacol.* 64(4): 723-732, 2002.

Antunes, T.C., Yamashita, K.M., Barbaro, K.C., Saiki, M., Santoro, M.L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* venoms. *Toxicon* 56(8):1443-1458, 2010.

Arni, R.K., Ward, R.J. Phospholipase A2- structural review. *Toxicon* 34: 827-841, 1996.

Ashline, D., Singh, S., Hanneman, A., Reinhold, V. Congruent strategies for carbohydrate sequencing.1. Mining structural details by MSⁿ. *Anal. Chem.* 77: 6250-6262, 2005.

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* 24(9): 943-946, 1986.

Ausbell, F.M., Brent, R., Kingston, R.E, Moore, D.D, Seidman, J.G, Smith, J.A, Struhl, K. Current protocols in molecular biology. New York, Wiley, Interscience, 1994.

Aubret, F, Shine, R, Bonnet, X. Adaptive developmental plasticity in snakes. *Nature* 431: 261-262, 2004.

Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and *in situ* hydrolysis. *PLoS.Negl. Trop. Dis.* 4(6):1-10, 2010.

Barret, A.J, Rawlings, N.D. Families and clans of serine peptidases. *Arch.Biochem.Biophys.*318: 247-250,1995.

Berger, M., Pinto, A.F.M., Guimarães, J.A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 51: 488-501, 2008.

Biasi, P., Belluomini, H.E., Hoge, A.R., Puerto, G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. *Mem.Inst. Butantan* 40/41:167-172, 1976/77.

Birrel, G.W., Earl, S.T.H., Wallis, T.P., Masci, P.P., Jersey J, Gorman, J.J., Lavin, M.F. The diversity of bioactive proteins in australian snake venoms. *Moll. Cell. Proteomics* 6 (6): 973-986, 2007.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7; 72:248-54, 1976.

Brewer, C.F., Bhattacharyya, L. Specificity of Concanavalin A binding to asparagine-linked glycopeptides. *J. Biol. Chem.* 261(16):7306-7310, 1986.

Brinkhaus, K.M., Barnes, D.S., Potter, J.Y., Read, M.S. von Willebrand syndrome induced by a *Bothrops* venom factor: Bioassay for venom coagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(5): 3234-3234, 1981.

Calvete, J.J., Juárez, P., Sanz, L. Snake venomomics. Strategy and applications. *J. Mass Spectrom.* 42: 1405-1414, 2007.

Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 583:1736-1743, 2009.

Calvete, J.J., Marcinkiewickz, C., Monléon, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., Sanz, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45:1063-1074, 2005.

Campbell, J.A., Lamar, W.W. The venomous reptiles of latin america. 6° ed. Ithaca and London, Comstok,. 425p., 1989.

Cardoso, K.C, Da Silva, M.J., Costa, G.G., Torres, T.T., Del Bem, L.E., Vidal, R.O., Menossi, M., Hyslop, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (uru). *BMC Genomics*. 11:605, 2010.

Casewell, N.R., Harrison, R.A., Wüster, W., Wagstaff, S.C. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics*.10:564, 2009.

Chatrath, S.T., Chapeaurouge, A., Lin, Q., Lim, T.K., Dunstan, N., Mirtschin, P., Kumar, P.P., Kini, R.M. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides* by a combined transcriptomics and proteomics approach. *J Proteome Res*. 2011. No prelo.

Chaves, F., Gutiérrez, J.M., Brenes, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* 30 (9): 1099-1109,1992.

Ching, A.T.C., Rocha, M.M.T., Leme, A.F.P., Pimenta, D.C., Furtado, M.F.D., Serrano, S.M.T, Ho,P.L, Junqueira-de-Azevedo,I.L.M. Some aspects of the venom proteome of the colubridae snake *Phylodrias olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. *FEBS Lett*. 580: 4417-4422, 2006.

Chippaux, J.P., Williams, V., White, J. Snake venoms variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29(11): 1279-1303,1991.

Choe, L.H., Aggarwal, K., Franck, Z., Lee, K.H. A comparison of the consistency of proteome quantitation using two-dimensional electrophoresis and shotgun isobaric tagging in *Escherichia coli* cells. *Electrophoresis* 26: 2437-2449, 2005.

Chomkzynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem*. 162:156-159,1987.

Cidade, D.A., Simão, T.A., Dávila, A.M., Wagner, G., Junqueira-de-Azevedo I.L., Ho P.L, Bon, C., Zingali, R.B., Albano, R.M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon* 48(4):437-461, 2006.

Ciucanu, I., F. Kerek, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate. Res*. 131(2): 209-217, 1984.

Clemetson, K.J, Navdev, A., Dörman, D., Du, X.Y., Clemetson, J.M. Multifunctional snake C-type lectins affecting platelets. *Haemostasis* 31:148-154, 2001.

Cline, M., Smooth, M., Cerami, E., Kushinski, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., *et al.* Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat. Protoc.* 2: 2366-2382, 2007.

Cloonan, N., Grimmond, S.M. Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution. *Genome Biol.* 9:234, 2008.

Cohen, S. Origins of growth factors: NGF and EGF. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 1038:98-102, 2004.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676, 2005.

Cooper, C.A., Gasteiger, E., Packer, N.H. GlycoMod- A software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics* 1:340-349, 2001.

Daltry, J.C., Wüster, W., Thorpe, R.S. Diet and snake venom evolution. *Nature* 379 (8), 537-540, 1996.

Drickamer, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263(20): 9557-9560, 1988.

Earl, S.T.H., Birrel, G.W., Wallis, T.P., St. Pierre, L.D., Masci, P.P., Jersey J., Gorman, J.J., Lavin, M.F. Post-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms. *Proteomics* 6: 6554-6565, 2006.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P. Base calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8:175-185, 1998.

Favreau, P., Cheneval, O., Menin, L., Michalet, S., Gaertner, S., Principaud, F., Thai, R., Menéz, A., Bulet, P., Söcklin, R. The venoms of the snake *Atheris* contains a new class of peptides with clusters of histidine and glycine residues. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 406-412, 2007.

Fernandez, J.H., Silva, C.A., Assakura, M.T., Camargo, A.C.M, Serrano, S.M. Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329(2):457-464, 2005.

Ferreira, L.A.; Galle, A.; Raida, M.; Schrader, M.; Lebrun, I.; Habermehl, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *J. Protein Chem.* 17(3), 285-289, 1998.

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

Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., Greene L. J. Isolation of bradykinin- potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9, 2583-2593, 1970.

Finney, P.J. Probit analysis. 3 ed. Cambridge, Cambridge University Press. 333p., 1971.

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 J.* 275:3016-3030, 2008a.

Fox, J.W., Serrano, S.M.T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* 8: 909-920, 2008b.

Francischetti, I. M., My-Pham, V., Harrison, J., Garfield, M.K., Ribeiro, J. M., *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene* 2004, 337, 55-69.

Francis, B., Seebart, C. Kaiser, I.I. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. *Toxicon* 30(10): 1239-1246, 1992.

Freitas, M.A., Geno, P.W., Sumner, L.W., Cooke, S.M., Hudiburg, S.A., Ownby, C.L., Kaiser, I.I., Odell, G.V. Citrate is a major component of snake venoms. *Toxicon* 30(4):461-464, 1992.

Fry, B.G, Vidal, N., Norman, J.A., Vonk, F.J., Scheib, H., Ramjan, S.F., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, S.B., Richardson, M.K., Hodgson, W.C., Igjatovick, V., Summerhayes, R., Kochva, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439: 584-588, 2005.

Fujimura, Y., Ikeda, Y., Miura, S., Yoshida, E., Shima, H., Nishida, S., Suzuki, M., Titani, K., Taniuchi, Y., Kawasaki, T. Isolation and characterization of jararaca GPIIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. *Thromb. Haemostas.* 74: 743-750, 1995.

Furtado, M.F.D., Maruyama, M., Kamiguti, A.S., Antonio, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon* 29(2), 219-226, 1991.

Furtado, M.F.D., Travaglia-Cardoso, S.R., Rocha, M.M.T. Sexual dimorphism in the venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 48: 401-410, 2006.

Gans, C, Elliot ,W.B. Snake venoms: production, injection, action. *Adv.Oral.Biol.*3: 45-81,1968.

Garcia, L.T., Parreiras e Silva, L.T., Ramos, O.H., Carmona, A.K., Barsanetti, P.A., Selistre-de-Araujo, H.S. The effect of post-translational modification on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Comp. Biochem. Physiol. C* 138(1): 23-32, 2004.

Gawlica, A.K., Horn, M.H. Trypsin gene expression by quantitative *in situ* hybridization in carnivorous and herbivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary and phylogenetic effects. *Physiol. Biochem. Zool.* 79(1): 120-132, 2006.

Gowda, D.C, Glushka, J., Halbeek, H.V., Thotakura, R.N., Bredehorst, R., Vogel, C.W. N-linked oligosaccharides of cobra venom factor contain novel alpha(1-3)galactosylated Le(x) structures. *Glycobiology* 11(3): 195-208, 2001.

Guércio, R.A.P, Shevchenko, A., Shevchenko, A., López-Lozano, J.L., Sousa, M.V., Ricart, C.A.O.Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Prot. Sci.* 4:11, 2006.

Gutiérrez, J.M., Ávila, C., Camacho, Z., Lomonte, B. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (Bushmaster) from Costa Rica. *Toxicon* 28(4): 419-426, 1990.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33(11): 1405-1424, 1995.

Gutiérrez, J.M., Santos, M.C., Furtado, M.F.D., Rojas, G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. *Toxicon* 20 (10):1273-1277,1991.

Gutiérrez, J.M.; Gené, J.A.; Rojas, G.; Cerdas, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23: 887-893, 1985.

Gutiérrez, JM, Rucavado, A, Escalante, T, Díaz, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45 (8): 997-1011, 2005.

Gutiérrez, JM, Rucavado, A. Snake venom metalloproteases: Their role in pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850, 2000.

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* 146:2495-2508, 2000.

Hayashi, M.A.F., Murbach, A.F., Ianzer, D., Portaro, F.C.V., Prezoto, B.C., Fernandes, B.L., Silveira, P.F., Silva, C.A., Pires, R.S., Britto, L.R.G., Dive, V., Camargo, A.C.M. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J. Neurochem.* 85: 967-977, 2003.

Hayashi, M.A.F.; Camargo, A.C.M. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* 45(8), 1163-1170, 2005.

Heussen, C., Dowdle, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102: 196-202, 1980.

Huang, X., Madan, A. CAP3: A DNA sequence assemble program. *Genome Res.* 9: 868-877, 1999.

Ianzer, D., Konno, K., Marques-Porto, R., Portaro, F.C.V., Stoclin, R., Camargo, A.C.M., Pimenta, D.C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides* 25: 1085-1092, 2004.

Jia, Y., Perez, J.C. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding metalloproteinases from snake venom glands *Toxicon* 55 (2-3): 462-469, 2010.

Jiang, Y., Li, Y., Lee, W., Xu, X., Zhang, Y., Zhao, R., Zhang, Y., Wang, W. Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. *BMC Genomics* 12:1.

Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Farsky, S.H.P., Oliveira, M.L.S., Ho, P.L. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. *J. Biol. Chem* 276 (43): 39836-39842, 2001.

Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ho, P.L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene* 299, 279-291, 2002.

Kamiguti, A.S. Atividades coagulante, inflamatória e proteolítica dos venenos de *Bothrops jararaca* recém-nascida e adulta. [Dissertação] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1988.

Kamiguti, AS, Silva, MV, Cardoso, JLC. Desfibrinação do sangue no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop. São Paulo* 31: 84-90,1986.

Karlsson, E. In: *Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. v. 52, Berlin, Springer-Verlag: 159-212.,1979.

Kasahara, M., Gutknecht, J., Brew, K., Spurr, N., Goodfellow, P.N. Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* 5(3), 527-534, 1989.

Kashima, S., Roberto, P.G., Soares, A.M., Astolfi-Filho, S., Pereira, J.O., Giuliati, S., Faria, M. Jr., Xavier, M.A., Fontes, M.R., Giglio, J.R., França, S.C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. *Biochimie* 86(3):211-219, 2004.

Keller, A., Eng, J., Zhang, N., Li, X.J, Aebersold, R. A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Mol.Syst. Biol.*2:1-8, 2005.

Kini, RM . Chapter 1:Phospholipase A₂ - A complex multifunctional protein puzzle In: Kini, RM (Editor). *Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism*. England: Wiley, pp.1-28, 1997.

Kinter, M, Sherman, N.E. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. New York, Wiley, Interscience, 2000.

Klevebring, D., Fagerberg, L., Lundberg, E., Emanuelson, O., Uhlén, M., Lundberg, J. Analysis of transcript and protein overlap in a human osteosarcoma cell line. *BMC Genomics* 11:684.

Kochva, E. Evolution and secretion of venom and its antidotes in snakes. *Period. Biol.* 80(1):11-23, 1978.

Kochva, E., Nakar, O., Ovadia, M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. *Amer. Zool.* 23:427-430,1983.

Komori, Y., Nikai, T., Taniguchi, K., Masuda, K., Sugihara, H., Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper), *Biochemistry*, 38 11796-11803, 1999.

Komori, Y., Sugihara, H. Purification and physiological study of a hypotensive factor from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). *Toxicon* 28:359-369, 1990.

Kondo, H.; Kondo, S.; Kezawa, H.; Murata, R.; Ohsaka, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of the habu venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 13: 43-51, 1960.

Kotiza, T., Meier, J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. *Toxicon* 34(7): 787-806, 1996.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.

Leão, L.I., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo I.L.M. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics*.10:112

Lee, C.Y.W., Burnett-Jr., J.C. Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Fail. Rev.* 12:131-142, 2007.

Li, M., Fry, B.G., Kini, R.M. Putting the brakes on snake venom evolution: the unique molecular evolutionary patterns of *Aipysurus eydouxii* (marbled sea snake) phospholipase A₂ toxins. *Mol. Biol. Evol.* 22(4): 934-941, 2005a.

Li, M., Fry, B.G., Kini, R.M. Eggs-only diet: its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). *J. Mol. Evol.* 60: 81-89, 2005b.

Lipkind, G., Gong, Q., Steiner, D.F. Molecular modeling of the substrate specificity of prohormone convertases SPC2 and SPC3. *J. Biol. Chem.* 270(22): 13277-13284, 1995.

López-Lozano, J.L., Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., Chávez-Olortegui, C., Sanchez, E.F., Muniz, E.G., Bührnheim, P.F., Morhy, L. Ontogenetic variation of metalloproteases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonia rain forest. *Toxicon* 40: 997-1006, 2002.

Mackessy, S.P. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106 B (1): 181-189, 1993.

- Mackessy, S.P., Sixberry, N.M., Heyborne, W.H., Fritts, T. Venom of the brown treesnake, *Boiga irregularis*: ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. *Toxicon* 47: 537-548, 2006.
- Mackessy, S.P., Williams, K., Ashton, K.G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganos concolor*. A case of venom paedomorphosis? *Copeia* 4, 769-782, 2003.
- Mandelbaum, F.R., Reichl, A.P., Assakura, M.T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 29: 955-972, 1982.
- Mandelbaum, F.R., Henriques, O.B. Purification and properties of *Bothrops* protease A. *Arch. Biochem. Biophys.* 104: 369-374, 1964.
- Mann, M., Kelleher, N.L. Precision proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(47): 18132-18138, 2008.
- Margulies, M.; Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-380, 2005.
- Marques, O.A.V., Eterovic, A., Sazima, I. Serpentes da Mata Atlântica-Guia ilustrado para a Serra do Mar. Ribeirão Preto: Holos, 184p., 2001.
- Marques-Porto, R., Lebrun, I., Pimenta, D.C. Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: The metallopeptidases and their intrinsic peptide inhibitor. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 147: 424-433, 2008.
- Martins, M., Marques, O.A.V., Sazima, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: Biology of the vipers. Schuett, GW, Höggren, M, Douglas, ME, Greene, HW (Eds). Eagle Mountain Publishing, L.C, pp. 307-328, 2002.
- Maruyama, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Mihara, H., Nakajima, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. *Toxicon* 30, 853-864, 1992.
- Maruyama, M., Tanigawa, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Mihara, H. Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. *Enz. Prot.* 47: 124-135, 1993.
- Menezes, M.C., Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47: 304-312, 2006.

Mebs, D. Snake venom composition and evolution of Viperidae. *Kaupia* 8: 145-148, 1999.

Menin, L.; Perchuć, A.; Favreau, P.; Perret, F.; Michalet, S.; Schöni, R., Wilmer, M.; Stöcklin, R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon* 51(7): 1288-1302, 2008.

Mitchell, P. Proteomics retrenches. *Nat. Biotechnol.* 28(7): 665-670, 2010.

Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T.N.C., Surolia, A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem. Sci.* 31(3): 156-163, 2006.

Mortz, E., Krogh, T. N., Vorum, H., Gorg, A., Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* 1: 1359-1363, 2001.

Moura-da-Silva, A.M., Theakston, R.D.G., Crampton, J.M. Molecular evolution of phospholipase A₂ and metalloproteinase/disintegrins from venoms of vipers. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 70: 173-187, 1997.

Moura-da-Silva, A.M., Della-Casa, M.S., David, A.S., Assakura, M.T., Butera, D., Lebrun, I., Shannon, J.D., Serrano, S.M.T., Fox, J.W. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jarahragin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch. Biochem. Biophys.* 409: 395-401, 2003.

Murayama, N., Hayashi, M.A.F., Ohi, H., Ferreira, L.A.F. *et al.* Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1189-1193, 1997.

Murayama, N., Saguchi, K., Mentele, R., Assakura, M.T., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A.C., Higuchi, S., Serrano, S.M. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1652: 1-6.

Nahas, L., Kamiguti, A.S., Barros, M.A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemost.* 41 (2), 314-328, 1979.

Naismith, J.H., Field, R.A. Structural basis of trimannoside recognition by Concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 271(2):972-976.

Neiva, M., Arraes, F.B., de Souza, J.V., Rádis-Baptista, G., Prieto da Silva, A.R., Walter, M.E., Brígido, M.M., Yamane, T., López-Lozano, J.L., Astolfi-Filho, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon* 53(4):427-436,2009.

Nishida, S., Fujimura, Y., Miura, S., Ozaki, Y., Usami, Y., Suzuki, M., Titani, K., Yoshida, E., Sujimoto, M., Fukui, H. Purification and characterization of Bothrobrin, a fibrinogen-clotting serine-protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 33:1843-1849, 1994.

Ohno, M., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa, T., Hattori, S. Molecular evolution of myotoxic Phospholipases A2 from snake venom. *Toxicon* 42: 841-854, 2003.

Okuda, D., Koike, H., Morita, T. A new gene structure of disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. *Biochemistry* 41:14248-14254, 2002.

Oliveira, A.K., Paes-Leme, A.F., Asega, A.F., Camargo, A.C.M., Fox, J.W., Serrano, S.M.T. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venoms metalloproteinases. *Thromb. Haemost.* 104.3:485-497, 2010

Oliveira, A.K.; Paes-Leme, A.F.; Assakura, M.T.; Menezes, M.C.; Zelanis, A.; Tashima, A.K.; Lopes-Ferreira, M.L.; Lima, C., Camargo, A.C.M.; Fox, J.W.; Serrano, S.M.T. Simplified procedures for the isolation of HF3, Bothropasin, Disintegrin-like/Cysteine rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 53: 797-801, 2009.

OmPraba, G., Chapeaurouge, A., Doley, R., Devi, K.R., Padmanaban, P., Venkatraman, C., Velmurugan, D., Lin, Q., Kini, R.M. Identification of a novel family of snake venom proteins Veficolins from *Cerberus rynchops* using a venom gland transcriptomics and proteomics approach. *J Proteome Res.* 9(4):1882-1893, 2010.

Ong, S.E., Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* 1(5):2005.

Ookuma, S., Fukuda, M., Nishida, E. Identification of a DAF-16 transcriptional target gene, *scl-1*, that regulates longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 13(5), 427-431, 2003.

Paes-Leme, A.F., Kitano, E.S., Furtado, M.F., Ho, P.L., Valente, R.H., Camargo, A.C.M, Fox, J.W., Serrano, S.M.T. The sub-proteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. *Proteomics* 9(3): 733-745, 2009.

Paes-Leme, A.F., Prezoto, B.C., Yamashiro, E.T., Bertholim, L., Tashima, A.K., Klitzke, C.F., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T. *Bothrops* protease A, a unique highly

glycosylated serine proteinase, is a potent specific fibrinogenolytic agent. *J. Thromb. Haemost.* 6:1363-1372, 2008.

Pahari, S., Mackessy, S.P., Kini, R.M. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Mol. Biol.* 8:115., 2007.

Paine, M.J., Desmond, H.P., Theakston, R.D.G., Crampton, J.M. Purification and molecular characterization of a high molecular weight haemorrhagic metalloprotease, Jararhagina, from *Bothrops jararaca* venom. *J. Biol. Chem.* 267:22869-22876, 1992.

Pawlak, J., Kini, R.M. Snake venom glutaminyl cyclase. *Toxicon* 48: 278-286, 2006.

Pimenta, D.C., Prezoto, B.C., Konno, K., Melo, R.L., Furtado, M.F., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. *Rapid Commun. Mass Spec.*, 21: 1034-1042, 2007.

Qinghua, L., Xiaowei, Z., Wei, Y., Chenji, L. *et al.* A catalog for transcripts in the venom gland of the *Agkistrodon acutus*: identification of the toxins potentially involved in coagulopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 341,522-531.

Ribeiro, L.A, Jorge, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30: 475-480, 1997.

Ribeiro, LA, Jorge, MT. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adulto e filhote. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med S. Paulo* 44,143-145,1989.

Rioli, V.; Prezoto, B.C.; Konno, K.; Melo, R.L.; Klitzke, C.F.; Ferro, E.S.; Ferreira-Lopes, M.; Camargo, A.C.; Portaro, F.C. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. *FEBS J.* 275(10), 2442-2454, 2008.

Rokyta, D.R., Wray, K.P., Lemmon, A.R., Lemmon, E.M., Caudle, S.B. A high-throughput venom-gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. *Toxicon* 2011. No prelo.

Robinson, S.K. Habitat selection and foraging ecology of raptors in Amazonian Peru. *Biotropica* 26:443-458, 1994.

Rosenfeld, G.; Hampe, O. G.; Kelen, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan* 29: 143-163, 1959.

Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S, Khainovski, N., Pillai, S., *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3(12): 1154-1169, 2004.

Saguchi, K.I., Hagiwara-Saguchi, Y., Murayama, N., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T., Higuchi, S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. *Toxicon* 46(1): 72-83, 2005.

Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F, Díaz, A., Gutiérrez, J.M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42: 405-411, 2003.

Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T. Molecular cloning - A laboratory manual. 3 vols., USA, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Sanger, F., Niclekn, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12): 5463-5467, 1977.

Santoro, M.L., Sano-martins, I.S., Fan, H.W., Cardoso, J.L.C., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., BIASG. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon* 51(8): 1440-1448, 2008.

Santoro, M.L., Vaquero, T.S., Paes-Leme, A.F., Serrano, S.M.T. NPP-BJ, a nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from *Bothrops jararaca*, inhibits platelet aggregation. *Toxicon* 54: 499-512, 2009.

Santos, B.F., Serrano, S.M.T., Kuliopulus, A., Niewirarowski, S.. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS Lett.* 477:199-202, 2000.

Sanz, L., Escolano, J., Ferreti, M., Biscoglio, M.J., Rivera, E., Crescenti, E.J., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J. Proteomics* 71:46-60, 2008.

Saravia, P., Rojas, E., Arce, V., Guevara, C., López, J.C., Chaves, E., Velásquez, R., Rojas, G., Gutiérrez, J.M. Geographic and ontogenetic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev. Biol. Trop* 50 (1): 337-346, 2002.

Sazima, I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: Campbell, J.A., Brodie, E.D. (Eds). *Biology of Pitvipers*. Selva, Tyler, Texas. pp. 199-216, 1992.

Schreiber, M.C., Karlo, J.C., Kovalick, G.E. A novel cDNA from *Drosophila* encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen 5, and plant group 1 pathogenesis-related proteins. *Gene* 191(2), 135-141, 1997.

Schulze, W.Z., Usadel, B. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 61:491-516, 2010.

Searle, B.C. Scaffold: A bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomics studies. *Proteomics* 10(6): 1265-1269, 2010.

Seliger, B., Dressler, S.P., Wang, E., Kellner, R., Recktenwald, C.V., Lottspeich, F., Marincola, F.M., Baumgärtner, M., Atkins, D., Lichtenfels, R. Combined analysis of transcriptome and proteome data as a tool for the identification of candidate biomarkers in renal carcinoma. *Proteomics* 9: 1567-1581, 2009.

Serrano, S.M.T., Hagiwara, Y., Maruyama, N., Higuchi, S., Mentele, R., Sampaio, C.A.M., Camargo, A.C.M., Fink, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur. J. Biochem.* 251:845-853, 1998.

Serrano, S.M.T., Mentele, R., Sampaio, C.A., Fink, E. Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 34(21): 7186-7193, 1995.

Serrano, S.M.T., Reichl, A.P., Mentele, R., Auerswald, E.A., Santoro, M.L., Sampaio, C.A., Camargo, A.C., Assakura, M.T. A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 367(1): 26-32, 1999.

Serrano, S.M.T., Sampaio, C.A.M., Mentele, R., Fink, E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ from the venom of *Bothrops jararaca*: purification and characterization. *Thromb. Haemostas.* 83:438-444, 2000.

Serrano, S.M.T., Shannon, J.D., Wang, D., Camargo, A.C.M., Fox, J.W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. *Proteomics* 5: 501-510, 2005.

Serrano,S.M.T., Maroun, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45(8): 1115-1132,2005.

Siang, A.S., Doley, R., Vonk, F.J., Kini, R.M. Transcriptomic analysis of the venom gland of the red-headed krait (*Bungarus flaviceps*) using expressed sequence tags. *BMC Mol Biol.* 11:24, 2010.

Silles Villarroel, M., Zelante, F., Rolim Rosa, R., Furlanetto, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan* 42/43:311-323, 1978/79.

Silva, C.A., Zuliani, J.P., Assakura, M.T., Mentele, R., Camargo, A.C.M., Teixeira, C.F., Serrano, S.M.T. Activation of alpha(M) beta(2)-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinases isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 322(3):950-956, 2004.

Silva,M.B.,Schattner,M., Ramos,C.R.R.,Junqueira-de-Azevedo,I.L.M., Guarneri,M.C., Lazzari,M.A.,Sampaio,C.A.M., Pozner,R.G., Ventura,J.S., Ho,P.L.,Chudzinski-Tavassi,A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* 369(1): 129-139 2003.

Silva-Junior,F.P., Guedes, H.L.M., Garvey, L.C., Aguiar, A.S., Bourignon, S.C., Di Cera, E., Giovani-De-Simone S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1:Role of N-glycosylation in thermostability and activesite accessibility. *Toxicon* 50: 18-31, 2007.

Sousa, J.R.F., Monteiro, R.Q., Castro, H.C., Zingali, R.B. Proteolytic activity of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. *Toxicon* 39(6):787-792.

St Pierre, L., Woods, R., Earl, S., Masci, P.P., Lavin, M.F. Identification and analysis of venom gland-specific genes from the coastal taipan (*Oxyuranus scutellatus*) and related species. *Cell Mol Life Sci.* 62(22):2679-93, 2005.

Takeya,H., Nishida, S., Miyata, T., Kawada, S., Saisaka, Y., Morita, T., Iwanaga, S. Coagulation factor X activating enzyme from Russel's viper venom (RVV-X). *J. Biol. Chem.* 267(20):14109-14117, 1992.

Tanizaki, M.M., Zingali, R.B., Kawasaki, H., Imajoh, S., Yamazaki, S., Suzuki, K. Purification and some characteristics of a zinc-metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon* 27(7):747-755,1989.

Tarun, A.S., Peng, X., Dumpit, R.F., Ogata, Y., Silva-Rivera,H., Camargo, N., Daly, T.M., Bergman, L.W., Kappe, S.H.I. A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(1): 305-310,2008.

- Theakston, RDG, Reid, HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms . *Bull. World Hlth. Org.*, 61:949-956, 1983.
- Thoenen, H., Barde, Y. A. Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 60: 1284-1335.
- Thomas, R.G, Pough, F.H. The effects of rattlesnake venom on the digestion of prey. *Toxicon* 17, 221-228,1979.
- Travaglia-Cardoso, S.R., Zelanis, A., Furtado, M.F.D. Sexual dimorphism in development and venom production of the insular threatened pit viper *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) of Queimada Grande Island, Brazil. *JoTT* 2(10): 1177-1184, 2010.
- Travaglia-Cardoso, SR. Estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). [Dissertação].São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2000.
- Valente, R.H., Guimarães, P.R., Junqueira, M., Neves-Ferreira, A.G, Soares, M.R., Chapeaurouge, A., et al. *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *J Proteomics* 72(2):241-55, 2009.
- Wagstaff, S.C., Harrison, R.A. Venom gland EST analysis of the saw-scaled viper, *Echis ocellatus*, reveals novel alpha9beta1 integrin-binding motifs in venom metalloproteinases and a new group of putative toxins, renin-like aspartic proteases. *Gene* 377:21-32, 2006.
- Wagstaff, S.C., Sanz, L., Juárez, P., Harrison, R.A., Calvete, J.J. Combined snake venomomics and transcriptomic análisis of the ocellated carpet viper, *Echis ocellatus*. *J. Proteomics* 71:609-623, 2009.
- Wang, C., Eufemi, M., Turrano, C., Giartosio, A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry* 35(23): 7299-7307, 1996.
- Warrell, D.A. Snake bite. *Lancet* 375 (9708):77-88, 2010.
- Williams, D., Gutiérrez, J.M., Harrison, R., Warrel, D.A., White, J., Winkel, K.D., Gopalakrishnakone, P. The global snake bite initiative: an antidote for snake bite. *Lancet* 375: 89-91, 2010.
- Yamanoue, N., Britto, L.R, Carneiro, S.M., Markus, R.P. Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake *Bothrops jararaca*. *J.Exp.Biol.* 200: 2547-2556, 1997.

Yamazaki, Y., Koike, H., Sugiyama, Y., Motoyoshi, K., Wada, T., Hishinuma, S., Mita, M., Morita, T. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *Eur. J. Biochem.* 269(11), 2708–2715, 2002.

Yamazaki, Y., Morita, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelium growth factors. *Mol. Div.* 10:515-527, 2006.

Yamazaki, Y., Morita, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 44:227-231, 2004.

Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11:49-79, 2009.

Zelanis, A, Travaglia-Cardoso, S.R., Furtado, M.F.D. Ontogenetic changes on *Bothrops insularis* (Serpentes:Viperidae) snake venom and its biological implications. *South Am. J. Herpetol.* 3(1): 45-50, 2008.

Zelanis, A.; Ventura, J.S.; Chudzinski-Tavassi, A.M.; Furtado, M.F.D. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: An ontogenetic approach. *Comp. Biochem. Physiol. C* 145: 601-609, 2007.

Zeng, R., Xu, Q., Shao, X.X., Wang, K.Y., Xia, Q.C. Characterization and analysis of a novel glycoprotein from snake venom using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and Edman degradation. *Eur. J. Biochem.* 266:352-358, 1999.

Zhang, B., Liu, Q., Yin, W., Zhang, X., Huang, Y., Luo, Y., Qiu, P., Su, X., Yu, J., Hu, S., Yan, G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. *BMC Genomics.* 7:152, 2006.

Zhong, W., Gerstein, M., Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genetics* 10: 57-63, 2009.

Zhu, Z., Liang, Z., Zhang, T., Zhu, Z., Xu, W., Teng, M., Niu, L. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. *J. Biol. Chem.* 280(11): 10524-10529, 2005.

Zingali, R.B., Bianconi, M.L., Monteiro, R.Q. Interaction of Bothrojaracin with prothrombin. *Haemostasis* 31:273-278, 2001.

Zingali, R.B., Jandrot-Perrus, M., Guilin, M., Bon, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 32, 10794-10802, 1993.

LISTA DE ANEXOS

Tabela A1-A4: Peptídeos identificados nos spots dos géis bidimensionais de filhotes e adultos (machos e fêmeas) de *B. jararaca*.

Tabela A5: Peptídeos e proteínas identificadas no experimento de proteômica quantitativa (iTRAQ™).

Tabela A6: Identificações realizadas no experimento de LC-MS/MS dos peptídeos tripsínicos oriundos das proteínas adsorvidas à coluna de Concanavalina A-sepharose.

Tabela A7: Identificação dos clusters correspondentes a toxinas das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*.

Tabela A8: Identificação dos clusters correspondentes a transcritos celulares das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*.

Tabela A1: Peptídeos identificados no gel bidimensional do veneno de filhotes de *B. jararaca*.

Nº do spot	Número de acesso#	Proteína	Peptídeos identificados
1	gi 123908731	Zinc- mtalloyproteinase- disintegrin bothrojarin	KQNGVTIPCAR LTPGSQCADGLCCDQCR
2	gi 48427991	Zinc- metalloproteinase jerdonitin precursor	DXXBR ERDXXBRD XTPGSBCADGXCCDBCR
3	gi 82219706	Zinc metalloproteinase- disintegrin HF3 precursor	YLYIR LFCHTK LHSWVECESGECCDQCR TDIVSPPVCGNELLEMGEEDCGSPR
4	gi 76365442	Metalloproteinases P-III	TDXXRTR NNDDXDK BTDXXTR KNNDDXDBXKT SGSBCGHGDCCEBCK

5	gi 82214993	Zinc metalloproteinase- disintegrin BITM06A precursor	YNPFR TDXXTR GMVXPGTK KTDXXTR NNGDXDBIK XPCAPEDVK GNYYGYCR BXPCAPEDVK MFYSNDDEHK XPCAPEDVBCGR DNBBGNYYGYCR VCSNGHCVDVATAY- MYEXANXVNEXXR YCBDNSPGBNNPCK YVEXFXVVD BEMVTK MFYSNDDEH BGMVXPGTK SGSBCGHGDCCEBCBFSK XTVBPDVDYTXNSFAEWR YXYMHAAXVGEXWSNGDK ASMSECDPAEHCTGBSSECPADV FHK HDNABXXTAXDFNGPTXGYAYXGSMCHPK KHDNABXXTAXDFNGPTXGYAYXGSMCHPK
6	gi 82189787	Zinc metalloproteinase- disintegrin ACLD precursor	ATDXXK XFEXVNTMNEMFXPLNXR
7	gi 32306927	Metalloprotease BOJUMET II	BBNGVTXPCARK RYXXDNRPPCXXNXPXRT

8	gi 82233395	Venom serine proteinase HS114 precursor	DLMLVR AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK NDDALDKDLMLVR TNPDVPHCANINLLDDAVCR VIDYNTWIESVIAGNTAATCPP- LDSPVSDSEHIAPLSLPSSPPSVGVCVCR
9	gi 82197476	Zinc metalloproteinase insularinase-A	DXXPR KDXXK ERDXXPR YNSNXNXTXR YXEXAVVADHGMFTK
10	gi 166012653	Phospholipase A2	BXCECDR CCFVHDCCYGK
11	gi 158518414	Phospholipase A2 (BinTx-II)	-NXWBFGR BXCECDR XDXYTYSK VAAXCFBDNK CCYVHDCCYGK ETGDXXVCGGDDPCBK
12	gi 172044592	Zinc metalloproteinase BnP2	ERDXXPR- YNSNXDXTXR VHEMVNTVDGFFR
13	gi 123911605	Zinc metalloproteinase precursor	CTGBSGDCPR MAHEXGHNXGXDNDR XTTGSBCAEGXCCDBCK

14	gi 195927838	L- amino acid oxidase precursor	AHAXR EYXXK SGXTAAR XBBDVK STDXPSR YDTYSTK XFLTCTK FEPPXPPK NGXSATSNPK XFTCTBK FEPPXPPBK FDEXVGGMDK HDDXFAYEK XBFEPXPPK EVTVTYBTSK FWEDDGXHGGK EGWYANXGPMR HDDXFAYEBR SAGBXEESXBK BFWEDDGXHGGK XPTSMYBAXBK ETDYEEFXEXAK NDBEGWYANXGPMR DPGVXEYPVBPSEVG EGWYANXGPMRXPEK ETXSVTADYVXVCTTSR SAGBXEESXBKAVEEXR XYFAGEYTABAHWXDSTXK VGEVNBPGVXEYPVBPSEVGK FGXBXNEFSBENENAWYFXK FDEXVGGMDBXPTSMYBAXBK BFGXBXNEFSBENENAWYFXK HVXVVGAGMSGXSAAYVXANAGHBVTVXEASBR
----	----------------	------------------------------------	---

15	gi 48428846	Ablomin precursor	SVNPTASNMXX MEWYPEAAANAER CGENXYMSPXXMK BPEXBNEXVDXHNSXR
----	-------------	-------------------	---

#Número de acesso da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). X e B significam ambigüidades de massas (entre resíduos de L ou I e entre resíduos de K ou Q, respectivamente). Peptídeos C-terminais estão apresentados em *ítilico*.

Tabela A2: Peptídeos identificados no gel bidimensional do veneno de adultos de *B. jararaca*.

Nº do spot	Número de acesso#	Proteína	Peptídeos identificados
1	gi 82214993	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A precursor	YNPFR TDXXTR GMVXPGTK BTDXXTR NNGDXDKXX XPCAPEDVK GNYYGYCR KXPCAPEDVK DNSPGBNNPCK MFYSNDDEHK VCSNGHCVDVATAY- MYEXANXVNEXXR XYCBDNSPGBNNPCK YVEXFXVVBEMVTK MFYSNDDEHBMVXPGTK SGSBCGHGDCCEBCBFSK XTVKPDVDYTXNSFAEWR YXYMHAAXVGXEXWSNGDK ASMSECDPAEHCTGBSSECPADV FHK

2	gi 231997	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin precursor	TDLLTR GMVLPGTK KTDLLTR NNGDLDKIK IPCAPEDVK GNYYGYCR MFYSNDDEHK VCSNGHCVDVATAY- MYELANIVNEIFR YIEFFVVVDQGTGTK LYCKDNSPGQNNPCK MFYSNDDEHKGMVLPGTK ITVKPDVDYTLNSFAEWR YLYMHVALVGLIWSNGDK ASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHK
3	gi 13959622	KN-BJ 2	LDSPVK DIMLIR FFCLSSK TLCAGILQGGK AAYPELPATSR NSAHIAPI LSLPSSPPIVGSVCR
4	gi 82190823	Zinc metalloproteinase bothropasin	YNPFR TDLLTR GMVLPGTK KTDLLTR IPCAPEDVK GNYYGYCR DNSPGQNNPCK SGSQCGHGDCCCEQCK ITVKPDVDYTLNSFAEWR

5	gi 82127389	L-amino-acid oxidase precursor	WSXDK YDTYSTK XFXTCTK NGXSTTSNPK NPXEECFR HDDXFAYEK EGWYANXGPMR SAGBXYEESXBK XPTSMYBAXBK ETDYEEFXEXAK
6	gi 82127389	L-amino-acid oxidase precursor	STTDXP XFXTCTK NGXSTTSNPK NPXEECFR HDDXFAYEK SAGBXYEESXBK ETDYEEFXEXAK
7	gi 41353970	C-type lectin	XFDEXK NAFXCBCK DFSWEWTD SCTDYXSWDK XWNDBVCEK GBSEVWXGXWDK EFCVEXVSDTGYR
8	gi 41353970	C-type lectin	XFDEXK DAEMFCR NAFXCBCK DFSWEWTD SCTDYXSWDK XWNDBVCEK EFCVEXVSDTGYR

9	gi 41353970	C-type lectin	XFDEXK DAEMFCR NAFXCBCCK DAEMFCRK NAFXCBCCK DFSWEWTDR SCTDYXSWDK XWNDBVCEK AWKDAEMFCR BDFSWEWTDR GBSEVWXGXWDK GBSEVWXGXWDBK EFCVEXVSDTGYR XWNDBVCEKNAFXCBCCK SCTDYXSWDKNBPDPHYBNK
10	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin precursor	DLLNR KTDLLNR TDLLNRK DNPQCILNK IHQMVNIMK RIHQMVNIMK YIELFLVVDHGMFMK YFSDCSYIQCWDFIMK DMINVQPAAPQTLDSFGEWR HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK

11	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin precursor	TDLLNR KTDLLNR YNGNSDKIR DNPQCILNK IHQMVNIMK RIHQMVNIMK YIELFLVVDHGMFMK YFSDCSYIQWDFIMK DMINVQPAAPQTLDSFGWR HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK YFSDCSYIQWDFIMKDNPQCILNK
12	gi 461511	Ancrod (Venombin-A)	VVGGDECXNEHR VVGGDECXNEHRSXAXMYA-
13	gi 172044592	Zinc metalloproteinase BnP2	DXXP ERDXXP YNSNXDTR VHEMVNTVDGFFR
14	gi 48428846	Ablomin precursor	SVNPTASNMXX BPEXBNEXVDXHNSXR

Número de acesso da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). X e B significam ambigüidades de massas (entre resíduos de L ou I e entre resíduos de K ou Q, respectivamente). Peptídeos C-terminais estão apresentados em *italico*.

Tabela A3: Peptídeos identificados no gel bidimensional do veneno de machos adultos de *B. jararaca*.

Nº do spot	Número de acesso#	Proteína	Peptídeos identificados
1	gi 82214993	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A precursor	YNPFYR TDXXTRK GMVXPGTK BTDXTRK NNGDXDKKK XPCAPEDVK GNYYGYCRK KXPCAPEDVK DNSPGBNPNCK MFYSNDDEHK XPCAPEDVBCGR MYEXANXVNEXR YVEXFXVVD BEMVTK XKSGSBCGHGDCCEBCK CADGBVCSNGHCVDVATAY- MFYSNDDEHKGMVXPGTK XTVBPDVDYTXNSFAEWR YXYMHAAXVGEXWSNGDK YVEXFXVVD BEMVTBNNGDXDK ASMSECDPAEHCTGBSSECPADV FHK HDNABXXTAXDFNGPTXGYAYXGSMCHPK

		AHAXRS
		EYXXK
		SGXTAAR
		VRXNVR
		RVGEVNK
		STTDXPSR
		YDTYSTK
		XFTCTK
		NGXSATSNPK
2		VKXBBDVK
		HDDXFAYEK
		TNCSYMXNK
	gi 195927838	L- amino acid oxidase
		precursor
		EVTVTYBTSK
		HDDXFAYEBR
		SAGBXYEESXBK
		XPTSMYBAXBK
		ETDYEEFXEXAK
		DPGVXEYPVBPSEVGK
		EGWYANXGPMRXPEK
		ETXSVTADYVXVCTTSR
		SAGBXYEESXBBAVEELR
		XYFAGEYTABAHWDXSTXK
		VGEVNBPGVXEYPVBPSEVGK

3	gi 195927838	L- amino acid oxidase precursor	EYXXK AVEEXRR STTDXPSR XFXTCTK NGXSATSNPK XFXTCTBK FEPPXPPBK VXKXBBDVK FDEXVGGMDK HDDXFAYEK XKFEPPXPPK EVTVTYBTSK FWEDDGXHGGK RFDEXVGGMDK EGWYANXXGPMR HDDXFAYEBR SAGBXEESXBK KFWEDDGXHGGK XPTSMYBAXBK ETDYEEFXEXAK NDKEGWYANXGPMR DPGVXEYPVBPSEVGK EEXBAFCRPSMXXR ETXSVTADYVXVCTTSR SAGBXEESXBBAVEEXR XYFAGEYTABAHWXDSTXK VGEVNKDPGVXEYPVBPSEVGK AMGGXTTFTPYBFBHFSEAXTAPVDR
---	----------------	---------------------------------	---

4	gi 195927838	L- amino acid oxidase precursor	<p>EYXXK TYRNDK STTDXPSR XFXTCTK FEPPXPPK FEPPXPPK FDEXVGGMDK TNCSYMXNK HDDXFAYEK XBFEPXPPK EVTVTYBTSK FWEDDGXHGGK RFDEXVGGMDK HDDXFAYEBR EGWYANXGPMR SAGBXYEESXBK KFWEDDGXHGGK XPTSMYBBAXBK ETDYEEFXEXAK NDKEGWYANXGPMR DPGVXEYPVKPSEVGK EGWYANXGPMRXPEK ETXSVTADYVXVCTTSR SAGBXYEESXBBAVEEXR XYFAGEYTABAHGWXDSTXK VGEVNBPGVXEYPVBPSEVGK FDEXVGGMDBXPTSMYBAXBK EGNXSPGAVDMXGDXXNEDSGYYVSFXESXK</p>
5	gi 82217029	Venom nerve growth factor precursor (vNGF)	<p>NENFG- IDTACVCVISR ALTMENQASWR IDTACVCVISRK</p>

6	gi 82214994	Zinc metalloproteinase BITM02A precursor	TDXXNR BTDXXNR XHBBMVNXMK ENPBCXXNK ENPBCXXNBR RXHBMVNXMK YXEXFXVVDHGMFMK YFSDCSYXBCWDFXMK DMXNVBPAAPBTXDSFGGEWR BSHDNABXXTNTDFDGPTXGXAYVGTMCDPK
<hr/>			
7	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin precursor	TDLLNR KTDLLNR DNPQCILNK IHQMVNIMK RIHQMVNIMK KASQSNLTPEHQR YIELFLVVDHGMFMK YFSDCSYIQCWDFIMK DMINVQPAAPQTLDSFGGEWR DMINVQPAAPQTLDSFGGEWRK HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK YFSDCSYIQCWDFIMKDNPQCILNK

8	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin precursor	TDLLNRK KTDLLNRK DNPQCILNKQ IHQMVNIMKE RIHQMVNIMKE KASQSNLTPEHQRY YIELFLVVDHGMFMKY YFSDCSYIQCWDFIMKD DMINVQPAAPQTLDSFGEWK STAVIEDHSETDLLVAVTMAHELGHNLGIRH
9	gi 82219563	Zinc metalloproteinase/disintegrin precursor	TDLLNRK TDLLNRKS BTDLLNRK YNGNSDKIRR DNPQCILNKQ IHQMVNIMKE RIHQMVNIMKE YIELFLVVDHGMFMKY YFSDCSYIQCWDFIMKD DMINVQPAAPQTLDSFGEWK HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIKY STAVIEDHSETDLLVAVTMAHELGHNLGIRH
10	gi 109254946	Serine proteinase isoform 5	-MVXXR DXMXXR FXCPNR DBDXMXXR EBFXCPNR SSCDGDSGGPXXCNGEXBGXVSWGGDXCABPR

Número de acesso da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). X e B significam ambigüidades de massas (entre resíduos de L ou I e entre resíduos de K ou Q, respectivamente). Peptídeos C-terminais estão apresentados em *italico*.

Tabela A4: Peptídeos identificados no gel bidimensional do veneno de fêmeas adultas de *B. jararaca*.

Nº do spot	Número de acesso#	Proteína	Peptídeos identificados
1	gi 82214993	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A precursor	YNPFR TDXXTR GMVXPGTK KTDXXTR NNGDXDBXK XPCAPEDVK GNYYGYCR KXPCAPEDVK DNSPGBNNPCK MFYSNDDEHK YVEXFXVVDBEMVTK MFYSNDDEHKGMVXPGTK CADGBVCSNGHCVDVATAY- XTVBPDVDYTXNSFAEWR YXYMHAAXVGXEXWSNGDK YVEXFXVVDBEMVTBNNGDXDK ASMSECDPAEHCTGBSSECPADV FHK HDNABXXTAXDFNGPTXGYAYXGSMCHPK BHDNABXXTAXDFNGPTXGYAYXGSMCHPK MYEXANXVNEXXRYXYMHAAXVGXEXWSNGDK

			EYXXK
			TYRNDK
			STTDXPSR
			XFXTCTK
			NGXSATSNPK
			XFXTCTBK
			VXKXBBDVK
			HDDXFAYEK
			EVTVTYBTSK
			HDDXFAYEBR
			EGWYANXGPMR
			SAGBXYEESXBK
2	gi 195927838	L- amino acid	XPTSMYBAXBK
		oxidase precursor	ETDYEEFXEXAK
			NDBEGWYANXGPMR
			ETXSVTADYVXVCTISR
			SAGBXYEESXBKAVEEXR
			XYFAGEYTABAHGWXDSTXK

3	gi 195927838	L- amino acid oxidase precursor	EYXXK STTDXPSR XFXTCTK FEPPXPPK NGXSATSNPK XFXTCTBK FEPPXPPBK VXXBBDVK FDEXVGGMDK HDDXFAYEK SGXTAARDVNR XBFEPXPPK EVTVTYBTSK FWEDDGXHGGK RFDEXVGGMDK HDDXFAYEBR EGWYANXGPMR SAGBXYEESXBK XPTSMYBAXBK ETDYEEFXEXAK NDBEGWYANXGPMR DPGVXEYPVBPSEVGK EGWYANXGPMRXPEK ETXSVTADYVXVCTTSR SAGBXYEESXBBAVEEXR XYFAGEYTABAHGWDSTXK VGEVNBPGVXEYPVKPSEVGK FGXBXNEFSBENENAWYFXK FDEXVGGMDBXPTSMYBAXBK BFGXBXNEFSBENENAWYFXK YAMGGXTTFTPYBFBHFSEAXTAPVDR HVXVGAGMSGXSAAYVXANAGHBVTVXEASBR
---	--------------	------------------------------------	---

4	gi 195927838	L- amino acid oxidase precursor	EYXXK TYRNDK STTDXPSR YDTYSTK XFXTCTK FEPPXPPK NGXSATSNPK XFXTCTBK FEPPXPPBK VVBXBBQVK FDEXVGGMDK HDDXFAYEK XBFEPXPPK EVTVTYBTSK FWEDDGXHGGK RFDEXVGGMDK DDXFAYEBR EGWYANXGPMR AGBYEESXBK XPTSMYBAXXEK ETDYEEFXEXAK NDBEGWYANXGPMR DPGVXEYPVBPSEVGK EGWYANXGPMRXPEK ETXSVTADYVXVCTTSR SAGBYEESXBBAVEEXR XYFAGEYTABAHGWXDSTXK VGEVNBQDPGVXEYPVBPSEVGK FGVBNEFSBENENAWYFXK
---	--------------	---------------------------------	--

5	gi 172044592	Zinc metalloproteinase BnP2	DXXPR- ERDXXPR- YNSNXDTXR TXTSFGWR VHEMVNTVDGFFR SMNVDASXANXEVWSK
<hr/>			
6	gi 62131098	bothojaracin chain A precursor	FFQQK MNWADAER WSDGSSVSYENVVGR MNWADAERFCSEQAK QCSSKWSHGSSVSYENVVGR GGHLVSFQSDGETDFVNLVTEK
<hr/>			
7	gi 1839441	platelet glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit, GPIb-BP alpha subunit	<i>FIRP</i> - FFQQK CFALEK FCSEQAK CFALEKK KCFALEK YYVWIGLR YYVWIGLRIENK ESWDDRSEYDAER WSDYSSVSYENLVR -DTPFECPSDWSTHR WVNIDCVEGNPFVCK KWVNIDCVEGNPFVCK
<hr/>			

8	gi 399125	Botrocetin alpha chain (Platelet coagglutinin)	FFQQK NPFVCK CFALEK GGHLVSIK FCSEQAK KCFALEK MNWADAER NPFVCKSPPP- NIQSSDLYAWIGLR -DCPSGWSSYEGNCYK MNWADAERFCSEQAK
9	gi 41353970	C-type lectin	XFDEXK NAFXCBCK DFSWEWTDTR SCTDYXSWDK XWNDBVCEK AWBDAEMFCR BDFSWEWTDTR GBSEVWXGXWDK GBSEVWXGXWDKK EFCVEXVSDTGYR SCTDYXSWDBNBPDHYBNK

			DAEMFCR	
			<i>NAFXCBCKF-</i>	
			DFSEWTDR	
			SCTDYXSWDK	
			<i>XWNDBVCE</i> SK	
10	gi 41353970	C-type lectin	AWBDAEMFCR	793
			<i>BDFSEWTDR</i>	
			<i>GBSEVWXGXW</i> DK	
			<i>GBSEVWXGXW</i> DKK	
			EFCVEXVSDTGYR	
			<i>SCTDYXSWDBNBPDHYBNK</i>	

#Número de acesso da proteína no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). X e B significam ambigüidades de massas (entre resíduos de L ou I e entre resíduos de K ou Q, respectivamente). Peptídeos C-terminais estão apresentados em *italico*.

Tabela A5: Peptídeos e proteínas identificadas no experimento de proteômica quantitativa (iTRAQ™).

Proteínas identificadas	gi number*	Peptídeos identificados
<i>Metaloproteinases</i>		
Zinc metalloproteinase-disintegrin ACLD	gi 82189787	ATDLLK
Metalloproteinase atrolysin-E	gi 462320	ETDLLK
Zinc metalloproteinase/disintegrin	gi 82088458	ILNEPLR
Zinc metalloproteinase/disintegrin	gi 31077169	ETVLLK
Zinc metalloproteinase/disintegrin	gi 50400454	ETVLLNR
Metalloproteinase jararafibrase-2	gi 82219563	DMINVQPAAPQTLDSFGWEW TDLLNR
Metalloproteinase insularinase-A	gi 82197476	GDNPDDR TLTSFGWEW YIELAVVADHGMFTK YNSNLNTIR
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin	gi 82190823	GMVLPGTK ITVKPDVDYTLNSFAEWR KTDLLTR MFYSNDDEHK
<i>Serino proteinases</i>		
Venom serine proteinase 3	gi 13959638	VLNEDEQTR
Venom serine proteinase HS114	gi 82233395	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK NDDALDKDLMLVR TLNQDEQTR
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ	gi 6093643	DDVLDKDIMLIR KPALYTK LGVHSIK
Venom serine protease BthaTL	gi 82173559	FLAFLYPGR
Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase 2	gi 13959622	AAYPELPATSR

Venom serine protease homolog	gi 82240434	DIMLIR LDSPVK SLALVK LKPGVYTK VSDYTEWIR
Serine proteinase BITS01A	gi 82244284	SVANDDEVIR
<i>Lectinas tipo C</i>		
Bothroinsularin subunit beta	gi 229621685	DSFVWTGLSDVWK
Bothroinsularin subunit alpha	gi 229621684	IQSSDLYAWIGLR
Glycoprotein IB-binding protein subunit alpha	gi 82116886	ESWDDRSEYDAER WSDYSSVSYENLVR
C-type lectin clone 2100755	gi 82134956	IFWFNR
<i>Fosfolipases A2</i>		
Phospholipase A2, acidic	gi 129420	YWFFPAK
Phospholipase A2 2	gi 158518414	LDLYTYSK NLWQFGR
Phospholipase A2 homolog 1	gi 17368325	SLVELGK
Phospholipase A2 homolog 2	gi 17865560	ENLDTYNK MILQETGK SLFELGK
<i>L-aminoácido oxidases</i>		
L-amino acid oxidase precursor	gi 195927838	ETDYEEFLEIAK EYLLK FEPPLPPK FGLQLNEFSQENENAWYFIK HDDIFAYEK IQQDVK LPTSMYQAIQEK

		SAGQLYEESLQK
		STTDLPSR
		YAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPVDR
		YDTYSTK
L-amino-acid oxidase	gi 123903691	AVEELK
L-amino-acid oxidase	gi 124106294	YILDK

Proteínas secretadas ricas em cisteínas

Catrin-1/2	gi 48428839	SVNPTASNMLK
		TATPYK
		VLGGIK
Ablomin	gi 48428846	KPEIQNEIVDLHNSLR

Fator de crescimento do endotélio vascular

Vascular endothelial growth factor toxin	gi 48428663	NPEEGEPR
--	---------------	----------

**gi number* da proteína conforme o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI); Para detalhes sobre as identificações de peptídeos por LC-MS/MS verificar o item 3.5 (seção de Material e Métodos).

Tabela A6: Identificações realizadas no experimento de LC-MS/MS dos peptídeos tripsínicos oriundos das proteínas adsorvidas à coluna de Concanavalina A sepharose (indicados na Tabela 13). X= Ile ou Leu. B= Lys ou Gln; peptídeos da C-terminais estão mostrados em itálico.

Amostra analisada	Nome da proteína	gi number*	Peptídeos identificados **
Veneno de filhotes	Venom serine proteinase-like	gi 123883733	AAYPWBPVSSTTXCAGXXBGGB XMGWGTXSPTB XDSRVSNSEHXAPXSXPSSPPSVGSVCR NFBMBXGVHSB SXXAGNTAAACPP VSDYTEWXB VSNSEHXAPXSXPSSPPSVGSVCR
	Putative serine protease	gi 126035656	GDSGGPXXCDGBXBGXVSWGR VXASXXXXBXSYSB
	Batroxstatin-3	gi 205278807	YXBVVXVADNVMVR YXXSHTPBCXXNEPXR
	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	TDIVSPPVCGNELLEMGEEDCGSPR YINYKPKQCILNEPLR
	Zinc metalloproteinase/disintegrin	gi 52000724	ENCTCHANSXMSAVXSDDBPSB XHSWVECESGECCEBCR XBGEMYXXEPXR SECDXAESCTGHSADCPDRFHR
	Venom serine proteinase HS114	gi 82233395	AAYPELPAEYR DLMLVR IMGWGSITPIQK LDSPVSDSEHIAPLSLPPSSPPSVGSVCR NDDALDKDLMLVR TNPDVPHCANINLLDDAVCR VIDYNTWIESVIAGNTAATCPP
Venom serine protease homolog	gi 82240434	DXMXXR DSCBGDSGGPXXCNGBFBGXXSWG VHPGGBR FXVAXYTSR SXXAGNTDVTCP TXCAGXXEGGB VSDYTEWXR	

		VSYPDVPHCANXNXXDYEVCR
Batroxstatin-1	gi 205278803	BYEXVXVADNVMVB XFCVBGPXGNTXSCBSTSSBDDPDXGMVDXGTB SECDXAESCTGBSPECTDDFBR YXXDNRPPCXXNXPXR
Zinc metalloproteinase-disintegrin atrolysin-A	gi 75570463	ENGVNXPABEDVB SECDXAESCTGBSADCPTDDFHR
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-3	gi 123905786	IFPCKEDVK SECDIAESCTGQSADCPTDDIQR
L-amino acid oxidase precursor	gi 195927838	DPGVXEYPVBPSEVGB EGWYANXGPMR ETDYEEFXEXAB FDEXVGGMDBXPTSMYBAXBEB FGXBNEFSBENENAWYFXB FWEDDGXHGG HDDXFAYEB XBFEPXPPB XYFAGEYTABAHGWXDSTXB XPTSMYBAXBEB NDBEGWYANXGPMR RFDEXVGGMDB SAGBXEESXBB VGEVNBPGVXEYPVBPSEVGB YAMGGXTTFTPYBFBHFSEAXTAPVDR
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-2	gi 123905787	ENVIITPCAQEDVK KSECDFDYSEDPDYGMVDHGK LHSWVECESGECCDQCR QCVDVTTAY SECDFDYSEDPDYGMVDHGK SECDIAESCTGQSAQCPTDDFHK
Thrombin-like enzyme batroxobin	gi 114837	NSEHXAPXSXPSNPPSVGVCVCR NVXTDBDXMXXR
Glycoprotein IB-binding protein subunit beta	gi 82116883	MNWADAENLCAQQR

VNYNAWASESECVASK

	Coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit B	gi 82116580	DCPSDWSPYEGHCYR VFTEPQNXADA EK
	Zinc metalloproteinase-disintegrin berythactivase	gi 82216043	CPTMENBCXD XVGPBATVAEDSCFB HDCDXPESCTGBSADCPMDDFBR XYCNDNSPGBNNPCB
	Platelet-aggregating proteinase PA-BJ	gi 6093643	DDVLDKDIMLIR DTCEGDSGGPLICNGLQGIVSGGGNPCGQPR INILDHAVCR LNRPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVCYVMGWGK
	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	ASMSECDPAEHCTGBSSECPADVFHB HDNABXXTAXDFNGPTXGYAYXGSMCHPB XTVBPDVDYTXNSFAEWR VCSNGHCVDVATAY
Veneno de adultos	Venom serine proteinase-like	gi 123883733	AAYPWBPVSSTTXCAGXXBGGB ETYPDVPHCANXNXDHAVCR XMGWGTXSPTB XDSRVSNSEHXAPXSXPSSPPSVGVCVCR NFBMBXGVHSB VSDYTEWXB VSNSEHXAPXSXPSSPPSVGVCVCR
	Putative serine protease	gi 126035656	FPCABXXEPEGVYTB GDSGGPXXCDGBXBGXVSWGR
	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	TDIVSPPVCGNELLEMGEEDCGSPR YINYKPKQCILNEPLR
	Venom serine proteinase HS114	gi 82233395	IMGWGSITPIQK LDSPVSDSEHIAPLSLPSSPPSVGVCVCR NDDALDKDLMLVR TNPDVPHCANINLLDDAVCR VIDYNTWIESVIAGNTAATCPP

Venom serine protease homolog	gi 82240434	AAHGGXPATSRTXCAGXXEGGB VSDYTEWXR VSYPDVPHCANXNXXDYEVCR
Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase 2	gi 13959622	IMGWGTISTSK NSAHIAPISLPSSPPIVGSVCR
L-amino acid oxidase precursor	gi 195927838	EGNXSPGAVDMXGDXXNEDSGYYVSFXESXB EGWYANXGPMR ETDYEEFXEXAB FGXBXNEFSBENENAWYFXB XYFAGEYTABAHGWXDSTXB YAMGGXTTFTPYBFBHFSEAXTAPVDR
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ	gi 6093643	DDVLDKDIMLIR LNRPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVCYVMGWGK
Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	HDNAQXXTAXDFNGPTXGYAYXGSMCHPB XTVBPDVDYTXNSFAEWR BHDNABXXTAXDFNGPTXGYAYXGSMCHPB BVTAXPBGAVBPBYEDAMQYEFB YXYMHAAXVGXEXWSNGDB YVEXFXVVDDEMVTB

**gi numbers* conforme o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI); **Para detalhes acerca das identificações consultar o item 3.5 (Material e métodos).

Tabela A7: Identificação dos clusters correspondentes a toxinas das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*.

Cluster	N° de clones ²				TOTAL	Produto putativo	gi number ³	e-value	% ⁴	BLAST ⁵
	AF	AM	AT	F						
<i>Classe de toxina¹</i>										
MP										
BJOTD0001C	7	0	7	2	9	Zinc metalloproteinase/disintegrin,jararafibrase-2	gi 82219563	0	97	X
BJOTD0003C	2	0	2	0	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	9,0E-95	100	X
BJOTD0004C	4	0	4	0	4	Zinc metalloproteinase/disintegrin	gi 123883732	3,0E-154	92	X
BJOTD0005C	1	0	1	9	10	Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin	gi 48427991	0	88	X
BJOTD0007C	2	0	2	0	2	Metalloproteinase insularinase-A	gi 82197476	5,56E-79	100	X
BJOTD0008C	1	0	1	2	3	Batroxstatin-3	gi 205278807	7,9E-148	93	X
BJOTD0010C	4	0	4	1	5	Zinc metalloproteinase/disintegrin; jararafibrase-2	gi 82219563	1,85E-92	98	X
BJOTD0015C	1	1	2	1	3	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	1,01E-88	95	X
BJOTD0020C	2	0	2	0	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin	gi 231997	7,5E-132	100	X
BJOTD0021C	2	0	2	0	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin	gi 231997	4,45E-90	98	X
BJOTD0030C	1	0	1	1	2	Zinc metalloprotease-disintegrin halysase	gi 82211845	1,26E-75	90	X
BJOTD0034C	1	0	1	2	3	Metalloproteinase isoform 7	gi 109254972	1,35E-93	92	X
BJOTD0045C	1	0	1	2	3	Batroxstatin-1	gi 205278803	3,8E-145	88	X
BJOTD0046C	2	0	2	0	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin berythraactivase	gi 82216043	1,78E-69	83	X
BJOTD0061C	4	1	5	2	7	Zinc metalloprotease-disintegrin halysase	gi 82211845	1,50E-27	85	X
BJOTD0077C	2	0	2	0	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	3,03E-33	94	X
BJOTD0087C	28	4	32	0	32	Zinc metalloproteinase/disintegrin	gi 82219563	7,5E-131	95	X
BJOTD0090C	3	0	3	2	5	Zinc metalloproteinase BITM02A	gi 82214994	4,5E-122	99	X
BJOTD0097C	0	13	13	0	13	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	0	88	X
BJOTD0103C	0	5	5	0	5	Batroxstatin-1	gi 205278803	4,4E-130	89	X
BJOTD0104C	0	4	4	0	4	Zinc metalloproteinase Bap1	gi 187608847	8,67E-97	96	X
BJOTD0114C	0	11	11	1	12	Batroxstatin-1	gi 205278803	4,24E-55	89	X
BJOTD0125C	0	4	4	13	17	Zinc metalloproteinase/disintegrin Insularinase-A	gi 82197476	0	90	X
BJOTD0127C	2	9	11	0	11	Batroxstatin-1	gi 205278803	6,0E-179	88	X
BJOTD0179C	0	0	0	4	4	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	8,87E-88	89	X
BJOTD0180C	0	0	0	4	4	Metalloproteinase jararafibrase-2	gi 82219563	9,47E-92	98	X

BJOTD0182C	0	0	0	3	3	Zinc metalloproteinase-disintegrin atrolysin-A	gi 75570463	5,7E-127	85	X
BJOTD0184C	0	0	0	5	5	Zinc metalloproteinase-disintegrin atrolysin-A	gi 75570463	7,0E-120	88	X
BJOTD0185C	0	0	0	2	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	1,24E-93	91	X
BJOTD0189C	0	0	0	2	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin	gi 231997	2,31E-92	83	X
BJOTD0192C	0	0	0	3	3	Vascular apoptosis-inducing protein 2A	gi 144905068	1,57E-91	98	X
BJOTD0194C	0	0	0	2	2	Zinc metalloproteinase BITM02A	gi 82214994	1,34E-86	98	X
BJOTD0196C	0	0	0	3	3	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	5,52E-85	96	X
BJOTD0201C	0	0	0	5	5	Metalloproteinase VMP-II precursor	gi 258618062	4,1E-179	91	X
BJOTD0203C	32	4	36	40	76	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	0	100	X
BJOTD0207C	0	0	0	4	4	Metalloproteinase VMP-III precursor	gi 258618056	0	93	X
BJOTD0208C	0	1	1	3	4	Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-2	gi 123905787	6,28E-29	96	X
BJOTD0209C	0	0	0	25	25	Metalloproteinase VMP-III precursor	gi 258618068	0	90	X
BJOTD0211C	0	0	0	5	5	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	1,2E-100	95	X
BJOTD0212C	0	0	0	7	7	Metalloproteinase VMP-III precursor	gi 258618068	1,2E-101	94	X
BJOTD0216C	0	0	0	2	2	Metalloproteinase jararafibrase-2	gi 82219563	4,06E-92	99	X
BJOTD0223C	0	0	0	2	2	Metalloproteinase isoform 3	gi 109254964	2,1E-112	84	X
BJOTD0225C	0	0	0	9	9	Metalloproteinase VMP-III precursor	gi 258618056	2,0E-139	83	X
BJOTD0226C	0	1	1	23	24	Zinc metalloproteinase-disintegrin agkistin	gi 82211851	3,6E-146	88	X
BJOTD0228C	0	0	0	20	20	Metalloproteinase VMP-III precursor	gi 258618056	0	84	X
BJOTD0234C	0	0	0	2	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	6,42E-62	88	X
BJOTD0238C	0	0	0	10	10	Zinc metalloproteinase-disintegrin berythraactivase	gi 82216043	2,9E-106	81	X
BJOTD0241C	0	0	0	3	3	Metalloproteinase isoform 3	gi 109254964	6,2E-133	85	X
BJOTD0251C	0	0	0	2	2	Zinc metalloproteinase-disintegrin BjussuMP-1	gi 123889624	2,80E-33	88	X
BJOTD0258C	0	0	0	3	3	Zinc metalloproteinase leucurolysin-B	gi 223635807	4,75E-53	91	X
BJOTD0263C	0	0	0	4	4	Zinc metalloproteinase-disintegrin VAP1	gi 82220669	1,45E-86	95	X
BJOTD0264C	0	0	0	2	2	Zinc metalloproteinase BITM02A	gi 82214994	5,64E-80	99	X
BJOTD0280S	1	0	1	0	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	2,49E-63	87	X
BJOTD0305S	1	0	1	0	1	Metalloproteinase insularinase-A	gi 82197476	6,24E-24	96	X
BJOTD0308S	1	0	1	0	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-1	gi 123908731	6,07E-97	100	X
BJOTD0311S	1	0	1	0	1	Metalloproteinase isoform 7	gi 109254972	1,73E-56	92	X
BJOTD0327S	1	0	1	0	1	Gloydius halys gene for prepro-halystatin 2 and 3	gi 469191	0	91	N
BJOTD0356S	1	0	1	0	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	9,38E-31	81	X
BJOTD0371S	1	0	1	0	1	Metalloproteinase-disintegrin-like protein	gi 2231612	1,8E-145	89	N

BJOTD0376S	1	0	1	0	1	BChain B, The Three-Dimensional Structure Of Bothropasin	gi 209870468	8,78E-29	96	X
BJOTD0386S	1	0	1	0	1	Trimeresurus elegans mRNA for elegantin-2a precursor	gi 15991221	1,1E-147	91	N
BJOTD0410S	1	0	1	0	1	Batroxstatin-1	gi 205278803	1,75E-16	93	X
BJOTD0460S	0	1	1	0	1	Metalloproteinase jararafibrase-2	gi 82219563	2,13E-76	97	X
BJOTD0486S	0	1	1	0	1	Batroxstatin-1	gi 205278803	1,01E-64	90	X
BJOTD0518S	0	1	1	0	1	Bothrops jararacussu metalloprotease BOJUMET III mRNA	gi 32306930	2,6E-135	99	N
BJOTD0606S	0	1	1	0	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	7,34E-51	94	X
BJOTD0641S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin berythraactivase	gi 82216043	1,29E-86	89	X
BJOTD0648S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	4,56E-91	88	X
BJOTD0664S	0	0	0	1	1	Metalloproteinase VMP-II precursor	gi 258618066	3,51E-49	100	X
BJOTD0687S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin atrolysin-A	gi 75570463	5,83E-49	87	X
BJOTD0693S	0	0	0	1	1	Metalloproteinase VMP-III precursor	gi 258618068	1,37E-37	87	X
BJOTD0698S	0	0	0	1	1	ml-G2 gene for MLD-containing dimeric disintegrin	gi 95007582	2,9E-169	85	N
BJOTD0715S	0	0	0	1	1	Gloydus halys gene for prepro-halystatin 2 and 3	gi 469191	2,2E-114	83	N
BJOTD0716S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase Bap1	gi 187608847	1,81E-86	98	X
BJOTD0744S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin berythraactivase	gi 82216043	2,53E-82	80	X
BJOTD0758S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	3,70E-92	98	X
BJOTD0761S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	2,17E-84	96	X
BJOTD0763S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin berythraactivase	gi 82216043	1,49E-94	85	X
BJOTD0787S	0	0	0	1	1	Bothrops jararaca bothropasin precursor	gi 4895109	1,74E-65	94	N
BJOTD0788S	0	0	0	1	1	Bothrops jararacussu metalloprotease BOJUMET II	gi 32306926	1,59E-73	88	N
BJOTD0789S	0	0	0	1	1	Disintegrin jarastatin	gi 123905785	5,05E-21	95	X
BJOTD0797S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	gi 82214993	4,08E-81	96	X
BJOTD0798S	0	0	0	1	1	Atrolysin e	gi 995748	1,14E-31	94	X
BJOTD0826S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase leucurolysin-B	gi 223635807	2,79E-59	92	X
BJOTD0859S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-3	gi 123905786	4,26E-71	92	X
BJOTD0899S	0	0	0	1	1	Trimeresurus flavoviridis mRNA for flavoridin precursor	gi 21326757	1,19E-66	93	N
BJOTD0908S	0	0	0	1	1	Atrolysin e	gi 995748	5,15E-51	95	X
BJOTD0954S	0	0	0	1	1	Batroxstatin-1	gi 205278803	5,36E-47	98	X
BJOTD0958S	0	0	0	1	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	gi 82219706	1,58E-89	89	X

SP

BJOTD0014C	4	3	7	0	7	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	0	91	N
BJOTD0016C	4	0	4	1	5	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	0	98	N
BJOTD0025C	4	1	5	0	5	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	0	92	N
BJOTD0028C	4	0	4	2	6	Serine proteinase BITS01A	gi 82244284	7,4E-152	100	X
BJOTD0075C	3	0	3	0	3	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650273	0	98	N
BJOTD0082C	2	1	3	0	3	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	7,2E-171	87	N
BJOTD0100C	0	3	3	0	3	Venom serine protease homolog	gi 82240434	1,95E-14	100	X
BJOTD0130C	1	1	2	1	3	Venom serine protease homolog	gi 82240434	1,2E-101	97	X
BJOTD0132C	0	1	1	1	2	Venom serine proteinase HS114	gi 82233395	4,30E-70	99	X
BJOTD0190C	0	0	0	3	3	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	0	90	N
BJOTD0191C	0	3	3	2	5	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	0	92	N
BJOTD0222C	0	0	0	2	2	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	1,14E-87	96	N
BJOTD0252C	0	0	0	2	2	Trimeresurus mucrosquamatus preprotrimubin mRNA	gi 951151	0	96	N
BJOTD0267S	1	0	1	0	1	serine proteinase isoform 8	gi 109254952	1,26E-67	94	X
BJOTD0273S	1	0	1	0	1	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	2,95E-44	92	N
BJOTD0274S	1	0	1	0	1	Venom thrombin-like enzyme	gi 118500913	6,50E-32	91	X
BJOTD0288S	1	0	1	0	1	Bothrops insularis cluster BITS01A serine proteinase precursor	gi 20069138	4,88E-65	96	N
BJOTD0434S	0	1	1	0	1	Venom serine proteinase-like	gi 123883733	6,50E-72	91	X
BJOTD0469S	0	1	1	0	1	Venom serine proteinase HS114	gi 82233395	3,70E-19	95	X
BJOTD0500S	0	1	1	0	1	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650273	0	98	N
BJOTD0508S	0	1	1	0	1	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	1,3E-142	90	N
BJOTD0563S	0	1	1	0	1	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	2,6E-106	98	N
BJOTD0591S	0	1	1	0	1	Bothrops jararacussu serine protease mRNA	gi 32396013	0	97	N
BJOTD0604S	0	1	1	0	1	Trimeresurus mucrosquamatus preprotrimubin mRNA	gi 951151	0	96	N
BJOTD0632S	0	1	1	0	1	Bothrops jararaca mRNA for KN-BJ2	gi 2130945	8,98E-35	73	N
BJOTD0706S	0	0	0	1	1	Bothrops jararaca mRNA for hypothetical protein	gi 54650275	0	98	N
BJOTD0888S	0	0	0	1	1	Serine proteinase isoform 8	gi 109254952	7,29E-53	95	X

LTC

BJOTD0011C	2	0	2	0	2	Stejaggregin-A subunit alpha	gi 82129984	1,64E-62	90	X
BJOTD0018C	2	0	2	0	2	Glycoprotein IB-binding protein subunit alpha	gi 82116886	1,66E-61	97	X
BJOTD0019C	3	1	4	1	5	Coagulation factor IX-binding protein subunit A	gi 82130933	8,48E-53	83	X

BJOTD0022C	2	0	2	0	2	C-type lectin BiL	gi 82126834	4,06E-50	100	X
BJOTD0023C	2	0	2	0	2	Stejaggregin-A subunit alpha	gi 82129984	1,24E-69	93	X
BJOTD0033C	3	1	4	0	4	C-type lectin BiL	gi 82126834	6,58E-86	100	X
BJOTD0036C	5	1	6	0	6	Botrocetin subunit alpha	gi 399125	5,11E-68	96	X
BJOTD0042C	10	1	11	1	12	Glycoprotein IB-binding protein subunit beta	gi 82116883	9,75E-71	98	X
BJOTD0049C	4	0	4	0	4	Bothrojaracin subunit beta	gi 82124360	1,02E-74	98	X
BJOTD0052C	2	0	2	0	2	Mamushigin subunit beta	gi 34098771	5,74E-52	87	X
BJOTD0054C	13	3	16	1	17	Glycoprotein IB-binding protein subunit beta	gi 82116883	6,76E-72	99	X
BJOTD0059C	2	1	3	0	3	C-type lectin BiL	gi 82126834	1,00E-86	100	X
BJOTD0064C	2	0	2	1	3	Bothroinsularin subunit alpha	gi 229621684	3,15E-74	99	X
BJOTD0067C	12	2	14	0	14	Botrocetin subunit beta	gi 399126	3,93E-65	92	X
BJOTD0078C	1	0	1	1	2	Bothrojaracin subunit alpha	gi 82124362	5,18E-75	97	X
BJOTD0079C	8	2	10	0	10	Botrocetin subunit alpha	gi 399125	3,57E-69	98	X
BJOTD0081C	1	1	2	0	2	Bothrojaracin subunit beta	gi 82124360	3,78E-73	96	X
BJOTD0089C	1	1	2	0	2	Coagulation factor IX-binding protein subunit A	gi 82130933	1,42E-52	83	X
BJOTD0091C	2	1	3	1	4	C-type lectin clone 2100755	gi 82134956	5,97E-58	85	X
BJOTD0099C	4	4	8	4	12	Glycoprotein IB-binding protein subunit alpha	gi 82116886	1,80E-71	97	X
BJOTD0128C	0	2	2	0	2	Coagulation factor IX-binding protein subunit A	gi 82130933	1,57E-41	82	X
BJOTD0135C	0	2	2	0	2	Coagulation factor IX-binding protein subunit A	gi 82130933	1,49E-44	83	X
BJOTD0136C	0	4	4	0	4	Coagulation factor IX-binding protein subunit A	gi 82130933	8,19E-50	82	X
BJOTD0150C	0	2	2	0	2	C-type lectin clone 2100755	gi 82134956	2,57E-26	89	X
BJOTD0159C	0	1	1	2	3	C-type lectin clone 2100755	gi 82134956	6,07E-61	89	X
BJOTD0160C	0	2	2	2	4	ACF 1/2 B-chain	gi 20562943	6,67E-62	89	X
BJOTD0174C	0	1	1	2	3	Bothrojaracin subunit beta	gi 82124360	1,95E-64	93	X
BJOTD0233C	0	1	1	4	5	ACF 1/2 B-chain	gi 20562943	1,13E-62	89	X
BJOTD0242C	0	0	0	3	3	Trimecetin subunit beta	gi 82125513	2,23E-48	83	X
BJOTD0246C	1	0	1	5	6	Coagulation factor IX-binding protein subunit A	gi 82130933	1,74E-49	80	X
BJOTD0247C	0	0	0	4	4	ACF 1/2 A-chain	gi 20562937	1,73E-48	80	X
BJOTD0256C	0	0	0	7	7	ACF 1/2 B-chain	gi 20562943	4,96E-62	90	X
BJOTD0257C	0	0	0	3	3	Bothrojaracin subunit alpha	gi 82124362	2,58E-73	96	X
BJOTD0286S	1	0	1	0	1	Botrocetin subunit alpha	gi 399125	6,01E-49	97	X
BJOTD0313S	1	0	1	0	1	Bothrojaracin subunit beta	gi 82124360	8,03E-54	98	X
BJOTD0317S	1	0	1	0	1	C-type lectin BiL	gi 82126834	2,09E-46	98	X

BJOTD0342S	1	0	1	0	1	Bothrojaracin subunit alpha	gi 82124362	1,50E-36	80	X
BJOTD0345S	1	0	1	0	1	Stejaggregin-A subunit alpha	gi 82129984	1,21E-62	86	X
BJOTD0363S	1	0	1	0	1	Glycoprotein IB-binding protein subunit alpha	gi 82116886	3,66E-71	97	X
BJOTD0364S	1	0	1	0	1	Botrocetin subunit beta	gi 399126	1,64E-71	96	X
BJOTD0370S	1	0	1	0	1	Bothroinsularin subunit alpha	gi 229621684	3,72E-51	100	X
BJOTD0398S	1	0	1	0	1	ACF 1/2 B-chain	gi 20562943	4,30E-60	87	X
BJOTD0416S	1	0	1	0	1	Glycoprotein IB-binding protein subunit beta	gi 82116883	4,93E-58	87	X
BJOTD0423S	0	1	1	0	1	Bothrojaracin subunit beta	gi 82124360	5,25E-63	91	X
BJOTD0470S	0	1	1	0	1	ACF 1/2 B-chain	gi 20562943	3,11E-66	91	X
BJOTD0503S	0	1	1	0	1	C-type lectin isoform 1	gi 215275173	3,03E-49	81	X
BJOTD0521S	0	1	1	0	1	ACF 1/2 B-chain	gi 20562943	2,98E-58	86	X
BJOTD0647S	0	0	0	1	1	Bothroinsularin subunit alpha	gi 229621684	1,05E-45	77	X
BJOTD0757S	0	0	0	1	1	Deinagkistrodon acutus agglucetin-alpha 2 subunit precursor	gi 23321260	3,73E-48	92	N
BJOTD0768S	0	0	0	1	1	Glycoprotein IB-binding protein subunit alpha	gi 82116886	2,26E-48	97	X
BJOTD0799S	0	0	0	1	1	Bothroinsularin subunit alpha	gi 229621684	1,07E-34	82	X
BJOTD0834S	0	0	0	1	1	Factor IX/X binding protein beta chain-3	gi 33341191	7,64E-37	95	N
BJOTD0838S	0	0	0	1	1	C-type lectin	gi 294961102	2,19E-35	66	X
BJOTD0877S	0	0	0	1	1	ACF 1/2 A-chain	gi 20562937	2,69E-17	84	X
BJOTD0911S	0	0	0	1	1	Trimecetin subunit beta	gi 82125513	1,35E-30	70	X
BJOTD0921S	0	0	0	1	1	C-type lectin isoform 1	gi 215275173	3,10E-42	76	X
BJOTD0922S	0	0	0	1	1	Bothrojaracin subunit beta	gi 82124360	1,46E-66	93	X
BJOTD0950S	0	0	0	1	1	C-type lectin BiL	gi 82126834	2,89E-84	98	X
BPP										
BJOTD0013C	4	1	5	0	5	Bothrops insularis cluster BITB08	gi 20069130	0	99	N
BJOTD0026C	1	1	2	0	2	Bradykinin-potentiating and CNP precursors	gi 82202072	3,25E-23	93	X
BJOTD0041C	2	1	3	3	6	Bradykinin-potentiating and CNP precursors	gi 82202072	7,68E-42	81	X
BJOTD0050C	2	0	2	0	2	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 32478122	0	99	N
BJOTD0053C	2	2	4	0	4	Bothrops insularis cluster BITB08	gi 20069130	0	99	N
BJOTD0057C	6	6	12	0	12	Bradykinin-potentiating and CNP precursors	gi 82223405	1,79E-37	100	X
BJOTD0062C	1	0	1	1	2	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 16124242	5,4E-178	98	N
BJOTD0068C	7	5	12	8	20	Bradykinin-potentiating and CNP precursors	gi 189047126	1,01E-46	95	X

BJOTD0072C	2	1	3	4	7	Bradykinin-potentiating protein precursor	gi 20069131	1,30E-41	100	X
BJOTD0083C	2	1	3	0	3	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 32478122	0	98	N
BJOTD0088C	1	0	1	2	3	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 32478122	8,4E-143	98	N
BJOTD0093C	4	0	4	11	15	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 32478122	0	98	N
BJOTD0110C	1	1	2	1	3	Bradykinin-potentiating and CNP precursors	gi 189047126	7,85E-85	96	X
BJOTD0118C	0	8	8	1	9	Bothrops insularis cluster BITB08	gi 20069130	0	99	N
BJOTD0139C	0	2	2	0	2	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 32478122	9,8E-130	99	N
BJOTD0140C	6	5	11	5	16	Bothrops jararaca mRNA for bradykinin-potentiating peptide	gi 1881400	0	99	N
BJOTD0144C	0	9	9	0	9	Bothrops insularis cluster BITB08	gi 20069130	0	98	N
BJOTD0178C	28	18	46	9	55	Bradykinin-potentiating and CNP precursors	gi 189047126	2,2E-101	99	X
BJOTD0334S	1	0	1	0	1	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 32478122	2,31E-69	97	N
BJOTD0379S	1	0	1	0	1	Bothrops insularis cluster BITB01A	gi 20069128	1,15E-47	97	N
BJOTD0418S	1	0	1	0	1	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 32478122	0	97	N
BJOTD0419S	1	0	1	0	1	Bothrops insularis cluster BITB01A	gi 20069128	1,4E-113	97	N
BJOTD0461S	0	1	1	0	1	Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/CNP precursor	gi 32478122	1,2E-128	98	N
BJOTD0646S	0	0	0	1	1	Bradykinin-potentiating and CNP precursors	gi 189047126	9,14E-72	97	X
BJOTD0676S	0	0	0	1	1	Bradykinin-potentiating and CNP precursors	gi 82223405	7,98E-22	100	X

PLA2

BJOTD0047C	2	3	5	10	15	Phospholipase A2 2	gi 292630844	3,08E-49	86	X
BJOTD0071C	3	4	7	0	7	Phospholipase A2 homolog bothropstoxin-1	gi 209572966	3,00E-81	100	X
BJOTD0080C	4	12	16	0	16	Phospholipase A2 homolog M1-3-3	gi 17433168	6,15E-69	99	X
BJOTD0098C	0	3	3	0	3	Phospholipase A2 precursor	gi 86450426	6,42E-55	88	X
BJOTD0106C	0	2	2	0	2	Phospholipase A2 homolog 2	gi 166215047	9,02E-60	97	X
BJOTD0111C	0	5	5	0	5	Hypotensive phospholipase A2	gi 25140377	3,75E-57	85	X
BJOTD0112C	2	12	14	51	65	Hypotensive phospholipase A2	gi 25140377	2,64E-55	84	X
BJOTD0300S	1	0	1	0	1	Sistrurus catenatus catenatus isolate cat3 phospholipase A2	gi 166012646	2,3E-156	92	N
BJOTD0466S	0	1	1	0	1	Phospholipase A2 precursor	gi 86450426	8,79E-51	96	X
BJOTD0468S	0	1	1	0	1	Phospholipase A2 gene cluster	gi 211926918	1,81E-29	81	N
BJOTD0829S	0	0	0	1	1	Phospholipase A2 gene cluster	gi 211926918	2,34E-12	87	N
BJOTD0844S	0	0	0	1	1	pgPLA2a gene for phospholipase A2	gi 436250	0	93	N

LAAO

BJOTD0009C	3	5	8	0	8	Crotalus atrox FAD-containing L-amino acid oxidase Apoxin 1	gi 5565691	0	95	N
BJOTD0043C	2	0	2	0	2	Crotalus adamanteus L-amino acid oxidase mRNA	gi 3426323	0	94	N
BJOTD0129C	2	1	3	3	6	L-amino-acid oxidase	gi 6093636	2,1E-121	95	X
BJOTD0283S	1	0	1	0	1	Crotalus atrox FAD-containing L-amino acid oxidase Apoxin 1	gi 5565691	0	93	N

CRISP

BJOTD0199C	5	1	6	13	19	Piscivorin	gi 48428840	3,2E-119	92	X
------------	---	---	---	----	----	------------	---------------	----------	----	---

svVEGF

BJOTD0029C	2	0	2	7	9	Vascular endothelial growth factor toxin	gi 48428663	2,85E-76	100	X
BJOTD0051C	2	1	3	2	5	Bothrops insularis vascular endothelial growth factor	gi 15072459	0	99	N
BJOTD0076C	2	0	2	5	7	Bothrops insularis vascular endothelial growth factor	gi 15072459	0	99	N
BJOTD0181C	0	0	0	2	2	Bothrops jararaca vascular endothelial growth factor	gi 15072461	0	99	N
BJOTD0200C	1	0	1	10	11	Vascular endothelial growth factor toxin	gi 48428663	2,23E-50	100	X
BJOTD0436S	0	1	1	0	1	Vascular endothelial growth factor 166 isoform	gi 51555820	3,76E-89	97	X

ssvNGF

BJOTD0117C	0	6	6	0	6	Venom nerve growth factor	gi 82217029	1,6E-100	100	X
------------	---	---	---	---	---	---------------------------	---------------	----------	-----	---

Outras

BJOTD0162C	0	1	1	1	2	mRNA for ecto-5'-nucleotidase	gi 211926755	4,34E-88	97	N
BJOTD0249C	0	0	0	2	2	Ophiophagus hannah Ohanin precursor	gi 70927664	3,05E-63	74	N
BJOTD0269S	1	0	1	0	1	Ophiophagus hannah Ohanin precursor	gi 70927664	4,29E-33	74	N
BJOTD0297S	1	0	1	0	1	Ecto-5'-nucleotidase	gi 211926756	6,09E-78	97	X
BJOTD0331S	1	0	1	0	1	Hyaluronidase	gi 113203667	3,91E-70	97	X
BJOTD0439S	0	1	1	0	1	Phosphodiesterase	gi 109254994	1,22E-74	91	X
BJOTD0513S	0	1	1	0	1	Ophiophagus hannah Ohanin precursor	gi 70927664	2,01E-63	75	N
BJOTD0659S	0	0	0	1	1	Crotalus durissus terrificus crotoasin (Cts-p2) gene	gi 14915765	2,54E-22	80	N
BJOTD0759S	0	0	0	1	1	Dipeptidylpeptidase 4a	gi 40363634	1,1E-107	98	X
BJOTD0762S	0	0	0	1	1	Truncated hyaluronidase	gi 113203693	3,11E-52	95	X
BJOTD0823S	0	0	0	1	1	Truncated hyaluronidase	gi 224579039	3,33E-66	99	X

BJOTD0850S 0 0 0 1 1 Ophiophagus hannah Ohanin precursor gi | 70927664 | 1,28E-40 80 N

¹Os clusters foram categorizados nas diferentes famílias de toxinas. **MP:** metaloproteinase; **SP:** serino proteinase; **LTC:** lectina tipo-C; **BPP:** peptídeos potenciadores de bradicinina; **PLA2:** fosfolipase A₂; **LAAO:** L-aminoácido oxidase; **CRISP:** proteínas secretadas ricas em cisteínas; **svVEGF:** fator de crescimento do endotélio vascular; **svNGF:** fator de crescimento de nervo.

²Número de clones que compõem o cluster. **AF:** biblioteca de fêmeas adultas; **AM:** biblioteca de machos adultos; **AT:** biblioteca de adultos (machos e fêmeas); **F:** biblioteca de filhotes.

³ *gi number* conforme o banco não redundante do NCBI (nrNCBI - *National Center for Biotechnology Information*).

⁴Porcentagem de similaridade de seqüência.

⁵A identificação dos clusters foi feita utilizando-se o algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1997). **X** representa similaridade verificada por BlastX; **N** representa similaridade verificada por BlastN.

Tabela A8: Identificação dos clusters correspondentes a transcritos celulares das bibliotecas de cDNA de *B. jararaca*.

Cluster	N° de clones ¹				TOTAL	Produto putativo	<i>gi number</i> ²	<i>e-value</i>	% ³	BLAST ⁴
	AF	AM	AT	F						
<i>Processo celular</i>										
<i>Transcrição/tradução</i>										
BJOTD0037C	1	0	1	3	4	EF1a-like protein-like	gi 297489377	4,28E-90	100	X
BJOTD0058C	1	1	2	0	2	Ribosomal protein S13	gi 61369380	4,38E-80	100	X
BJOTD0060C	2	0	2	0	2	Sus scrofa mRNA, clone:OVRM10069A02	gi 115548922	1,44E-17	86	N
BJOTD0066C	2	3	5	1	6	Ribosomal protein L23a-like	gi 297469023	2,74E-64	100	X
BJOTD0070C	1	1	2	1	3	Hypothetical protein PANDA_004510	gi 281346038	1,1E-139	96	X
BJOTD0074C	1	1	2	0	2	Ribosomal protein L4	gi 224062820	7,99E-61	92	X
BJOTD0084C	1	0	1	1	2	Hypothetical protein PANDA_001098	gi 281351554	3,49E-97	99	X
BJOTD0086C	1	2	3	1	4	40S ribosomal protein S20-like isoform 2	gi 297292885	6,29E-63	93	X
BJOTD0094C	1	3	4	2	6	Putative ribosomal protein L31	gi 224042954	1,70E-56	99	X
BJOTD0096C	0	1	1	1	2	Ribosomal protein L4	gi 67043811	6,14E-80	99	X
BJOTD0102C	0	1	1	2	3	40S ribosomal protein S11 isoform 1	gi 297277627	4,49E-81	97	X
BJOTD0107C	0	1	1	2	3	Unnamed protein product	gi 26389925	1,5E-110	98	X
BJOTD0108C	0	1	1	1	2	Similar to Ribosomal protein L8 isoform 2	gi 114622255	7,57E-96	100	X
BJOTD0113C	0	2	2	0	2	60S ribosomal protein L28	gi 259155421	1,56E-49	98	X
BJOTD0120C	1	2	3	1	4	Putative 40S ribosomal protein S8	gi 197127885	4,7E-106	98	X
BJOTD0121C	0	2	2	2	4	Putative 40S ribosomal protein S9	gi 197127111	4,45E-95	99	X
BJOTD0122C	0	2	2	2	4	40S ribosomal protein S3a	gi 82219689	5,5E-142	99	X
BJOTD0123C	0	1	1	2	3	Hypothetical protein PANDA_001098	gi 281351554	4,26E-97	99	X

BJOTD0126C	1	3	4	0	4	Hypothetical protein	gi 31873372	7,65E-68	100	X
BJOTD0133C	0	4	4	2	6	hCG1782414	gi 119613805	3,21E-71	99	X
BJOTD0134C	1	1	2	1	3	putative ribosomal protein L24 variant 2	gi 224044411	1,54E-55	95	X
BJOTD0142C	0	2	2	2	4	similar to ribosomal protein P2	gi 224050947	7,81E-25	85	X
BJOTD0143C	1	2	3	1	4	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein	gi 224070116	1,37E-69	99	X
BJOTD0147C	0	5	5	0	5	similar to insulinoma protein (rig)	gi 126323641	1,53E-58	99	X
BJOTD0148C	0	1	1	4	5	unnamed protein product	gi 189053095	6,52E-72	99	X
BJOTD0151C	1	3	4	0	4	putative ribosomal protein L27a variant 2	gi 224050791	7,97E-69	98	X
BJOTD0152C	0	1	1	1	2	ribosomal protein L29	gi 284413807	9,53E-31	98	X
BJOTD0154C	0	1	1	1	2	Ribosomal protein L29	gi 284413807	9,53E-31	98	X
BJOTD0156C	0	2	2	0	2	Putative ribosomal protein L27 variant 1	gi 197128099	5,97E-65	100	X
BJOTD0157C	0	2	2	0	2	similar to putative ribosomal protein L32	gi 224066697	4,60E-70	99	X
BJOTD0158C	2	2	4	3	7	similar to 40S ribosomal protein S12	gi 50742739	2,72E-70	99	X
BJOTD0161C	0	1	1	3	4	similar to ribosomal protein L7	gi 126321272	3,5E-103	92	X
BJOTD0163C	0	1	1	2	3	putative 60S acidic ribosomal protein P1	gi 224046772	3,42E-28	98	X
BJOTD0164C	0	1	1	2	3	40S ribosomal protein S17	gi 6677801	2,75E-70	100	X
BJOTD0167C	0	1	1	6	7	similar to Ribosomal protein S26, like	gi 126343251	5,01E-40	100	X
BJOTD0169C	0	3	3	3	6	Hypothetical protein PANDA_004968	gi 281344351	2,30E-67	100	X
BJOTD0170C	0	4	4	0	4	60S ribosomal protein L37a	gi 118405214	3,56E-47	100	X
BJOTD0171C	0	3	3	3	6	similar to Rps21-prov protein	gi 118100676	1,24E-38	97	X
BJOTD0172C	1	1	2	3	5	Elongation factor-1 alpha (EF-1alpha)	gi 56377788	6,6E-131	99	X
BJOTD0176C	0	0	0	2	2	60S ribosomal protein L3	gi 57525400	2,3E-152	99	X
BJOTD0195C	1	0	1	3	4	PolyA binding protein	gi 71725699	9,2E-124	98	X
BJOTD0204C	0	0	0	3	3	60S ribosomal protein L6	gi 45383808	8,34E-82	92	X
BJOTD0205C	0	1	1	2	3	DNA-binding protein B-like	gi 291416478	2,18E-22	82	X
BJOTD0218C	0	0	0	2	2	putative laminin receptor 1	gi 224045519	2,4E-101	98	X
BJOTD0220C	0	0	0	2	2	similar to MSTP030	gi 126305867	7,57E-90	97	X
BJOTD0227C	1	0	1	3	4	similar to 60S acidic ribosomal protein P0 (L10E)	gi 126324688	1,38E-91	99	X
BJOTD0232C	0	0	0	2	2	similar to ribosomal protein S10	gi 126309740	6,93E-58	98	X
BJOTD0235C	0	0	0	2	2	Rpl17 protein	gi 28174920	6,65E-91	99	X
BJOTD0243C	0	0	0	2	2	similar to Ribosomal protein L34	gi 126330954	1,28E-59	100	X
BJOTD0245C	1	0	1	4	5	similar to yeast ribosomal protein S28	gi 118104399	5,06E-78	99	X
BJOTD0248C	0	0	0	3	3	similar to ribosomal protein	gi 149264584	4,50E-69	100	X
BJOTD0254C	0	1	1	3	4	similar to ribosomal protein S24	gi 149596022	9,29E-56	97	X
BJOTD0260C	0	1	1	3	4	60S ribosomal protein L35	gi 73917399	1,60E-46	99	X
BJOTD0261C	0	1	1	1	2	60S ribosomal protein L30	gi 56118966	6,41E-59	100	X
BJOTD0262C	0	0	0	2	2	hypothetical protein	gi 126341780	9,86E-66	91	X
BJOTD0275S	1	0	1	0	1	Unnamed protein product	gi 189054729	3,72E-51	75	X
BJOTD0278S	1	0	1	0	1	TATA box binding protein (TBP)-associated factor	gi 224047090	9,93E-07	76	X
BJOTD0279S	1	0	1	0	1	similar to Zinc finger protein 294	gi 118083825	2,53E-70	90	X

BJOTD0289S	1	0	1	0	1	40S ribosomal protein S3-like	gi 296217041	1,24E-22	100	X
BJOTD0312S	1	0	1	0	1	Eukaryotic translation elongation factor 2	gi 269994436	4,30E-55	100	X
BJOTD0316S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 126307226	1,33E-08	46	X
BJOTD0321S	1	0	1	0	1	similar to U2-associated SR140 protein	gi 224060102	5,34E-26	96	X
BJOTD0328S	1	0	1	0	1	ribosomal protein L5	gi 291398505	1,50E-60	98	X
BJOTD0339S	1	0	1	0	1	Eukaryotic translation initiation factor 5	gi 57529903	4,03E-28	91	N
BJOTD0358S	1	0	1	0	1	AChain A, Human Erf1 C-Domain	gi 297787497	1,77E-16	100	X
BJOTD0383S	1	0	1	0	1	similar to Probable ATP-dependent RNA helicase	gi 149639807	1,28E-11	77	X
BJOTD0393S	1	0	1	0	1	hypothetical protein isoform 2	gi 118087998	6,76E-45	76	X
BJOTD0405S	1	0	1	0	1	Taeniopygia guttata ribonuclease H2, subunit B	gi 224043355	6,75E-24	78	N
BJOTD0407S	1	0	1	0	1	Pongo abelii zinc finger protein 71	gi 297706100	1,46E-12	81	N
BJOTD0412S	1	0	1	0	1	60S ribosomal protein L38	gi 223646550	1,08E-26	91	X
BJOTD0431S	0	1	1	0	1	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase	gi 224071988	1,84E-12	85	X
BJOTD0443S	0	1	1	0	1	Hypothetical protein LOC100158615	gi 189230358	9,94E-20	78	X
BJOTD0445S	0	1	1	0	1	Eukaryotic translation initiation factor 3	gi 256355187	4,81E-91	96	X
BJOTD0452S	0	1	1	0	1	similar to enhancer of yellow 2 homolog	gi 126322563	5,65E-41	98	X
BJOTD0467S	0	1	1	0	1	similar to iroquois homologue-1	gi 126320812	3,14E-34	90	X
BJOTD0499S	0	1	1	0	1	putative ribosomal protein S4	gi 224098172	1,44E-55	98	X
BJOTD0507S	0	1	1	0	1	Arginine-tRNA-protein transferase	gi 293603672	1,02E-24	98	X
BJOTD0511S	0	1	1	0	1	Putative DNA polymerase III alpha subunit	gi 229591045	4,91E-36	97	X
BJOTD0517S	0	1	1	0	1	ribosomal protein S14-like	gi 291403260	3,80E-72	100	X
BJOTD0531S	0	1	1	0	1	Alligator mississippiensis CIRBP mRNA	gi 161408090	6,43E-19	82	N
BJOTD0536S	0	1	1	0	1	similar to ribosomal protein L26 isoform 1	gi 118097327	4,21E-68	99	X
BJOTD0550S	0	1	1	0	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	gi 71896752	0	94	N
BJOTD0588S	0	1	1	0	1	60S ribosomal protein L37	gi 115529260	1,59E-46	98	X
BJOTD0590S	0	1	1	0	1	similar to ribosomal protein L23-related	gi 114635613	5,16E-13	81	X
BJOTD0599S	0	1	1	0	1	similar to DEAD box polypeptide 21	gi 224052119	3,11E-51	89	X
BJOTD0608S	0	1	1	0	1	putative ribosomal protein L14	gi 224045445	1,78E-61	97	X
BJOTD0610S	0	1	1	0	1	similar to Ribosomal protein S26, like	gi 126343251	2,51E-39	100	X
BJOTD0614S	0	1	1	0	1	TRM112-like protein	gi 229366094	4,62E-47	87	X
BJOTD0618S	0	1	1	0	1	40S ribosomal protein S5-like	gi 297706267	6,05E-54	100	X
BJOTD0627S	0	1	1	0	1	mCG10725, isoform CRA_b	gi 148693644	2,22E-40	98	X
BJOTD0660S	0	0	0	1	1	Trimeresurus gramineus gTgTBP gene	gi 808898	1,33E-65	81	N
BJOTD0662S	0	0	0	1	1	Ribonuclease H2 subunit B	gi 71895149	3,05E-45	76	X
BJOTD0673S	0	0	0	1	1	zinc finger protein 639 isoform 2	gi 224060810	1,68E-99	97	X
BJOTD0684S	0	0	0	1	1	similar to ribosomal protein L32 isoform 2	gi 50752315	2,24E-40	98	X
BJOTD0701S	0	0	0	1	1	zinc finger RNA binding protein	gi 224090278	3,51E-49	100	X
BJOTD0702S	0	0	0	1	1	Pantherophis guttatus HOXC13 (HoxC13) gene	gi 290760366	3,55E-10	90	N
BJOTD0704S	0	0	0	1	1	basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1)	gi 224044081	2,74E-24	73	X
BJOTD0707S	0	0	0	1	1	similar to tRNA phosphotransferase 1	gi 194218380	8,79E-16	77	X

BJOTD0712S	0	0	0	1	1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	gi 465508	4,09E-42	96	X
BJOTD0713S	0	0	0	1	1	similar to LTV1 homolog	gi 149600821	6,51E-34	74	X
BJOTD0725S	0	0	0	1	1	similar to elongation factor 1 gamma	gi 149641712	3,75E-71	96	X
BJOTD0730S	0	0	0	1	1	Bothrops insularis cDNA 3' similar to EIF 3		2,4E-157	81	N
BJOTD0732S	0	0	0	1	1	similar to 40S ribosomal protein SA (p40)	gi 114633293	1,02E-56	98	X
BJOTD0734S	0	0	0	1	1	Eukaryotic translation elongation factor 2	gi 149445919	9,64E-45	98	X
BJOTD0737S	0	0	0	1	1	Eukaryotic translation elongation factor 1	gi 126323026	3,83E-38	69	X
BJOTD0742S	0	0	0	1	1	protein SET-like	gi 297685481	8,28E-58	100	X
BJOTD0748S	0	0	0	1	1	Gallus gallus hypothetical LOC419815	gi 118102339	8,34E-49	74	N
BJOTD0764S	0	0	0	1	1	TFIIH basal transcription factor complex	gi 157168345	7,17E-95	98	X
BJOTD0771S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 118091862	4,94E-35	87	X
BJOTD0773S	0	0	0	1	1	Hypothetical protein	gi 53136666	2,36E-37	95	X
BJOTD0781S	0	0	0	1	1	Hypothetical protein LOC419329	gi 57529391	6,56E-12	63	X
BJOTD0786S	0	0	0	1	1	Endothelial differentiation-related factor 1	gi 57525242	1,13E-74	97	X
BJOTD0790S	0	0	0	1	1	60S ribosomal protein L7a-like	gi 297685637	2,02E-88	99	X
BJOTD0819S	0	0	0	1	1	Macaca mulatta MKL/myocardin-like 2	gi 297283526	3,84E-14	82	N
BJOTD0837S	0	0	0	1	1	ribosomal protein L15-like	gi 297489463	1,63E-75	100	X
BJOTD0841S	0	0	0	1	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	gi 114644272	2,05E-40	86	N
BJOTD0849S	0	0	0	1	1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like	gi 76154349	2,00E-30	86	N
BJOTD0852S	0	0	0	1	1	Unnamed protein product	gi 74207752	1,10E-63	96	X
BJOTD0853S	0	0	0	1	1	similar to CGI-114 protein	gi 126326996	2,65E-09	100	X
BJOTD0855S	0	0	0	1	1	Transcription initiation factor TFIID subunit 10	gi 225707950	2,03E-25	98	X
BJOTD0856S	0	0	0	1	1	ribosomal protein L39-like	gi 291407871	1,75E-24	94	X
BJOTD0857S	0	0	0	1	1	eukaryotic translation initiation factor 3	gi 297282846	1,40E-34	97	X
BJOTD0863S	0	0	0	1	1	Mustela putorius furo Ferret_c3122	gi 291100667	2,73E-33	89	N
BJOTD0867S	0	0	0	1	1	ribosomal protein S16	gi 293343904	5,39E-50	100	X
BJOTD0876S	0	0	0	1	1	40S ribosomal protein S2-like, partial	gi 297715210	1,60E-66	100	X
BJOTD0900S	0	0	0	1	1	similar to 60S ribosomal protein L36	gi 126323139	2,50E-47	100	X
BJOTD0915S	0	0	0	1	1	similar to ribosomal protein S19	gi 73948285	2,80E-67	99	X
BJOTD0925S	0	0	0	1	1	similar to polycomb group ring finger 1	gi 126332008	4,94E-68	69	X
BJOTD0938S	0	0	0	1	1	similar to ribosomal protein L3	gi 224095133	8,13E-22	96	X
BJOTD0943S	0	0	0	1	1	meiotically up-regulated gene 28 protein-like	gi 297275647	1,49E-33	87	X
BJOTD0951S	0	0	0	1	1	similar to CCAAT/enhancer-binding protein zeta	gi 126304578	5,56E-50	91	X
BJOTD0952S	0	0	0	1	1	activating signal cointegrator 1 complex	gi 291386275	1,37E-89	97	X
BJOTD0962S	0	0	0	1	1	Pantherophis guttatus HOXC13 gene	gi 290760366	6,04E-14	78	N
BJOTD0963S	0	0	0	1	1	similar to CCAAT/enhancer binding protein	gi 224046218	5,27E-41	81	X

**Processamento pós
traducional e
endereçamento**

BJOTD0012C	1	0	1	1	2	Oxyuranus scutellatus scutellatus PDI mRNA	gi 226693321	0	88	N
BJOTD0017C	1	0	1	1	2	FK506 binding protein 11	gi 149601897	3,99E-37	82	X
BJOTD0027C	1	0	1	1	2	Similar to PLC alpha, partial	gi 63146076	3,88E-94	93	X
BJOTD0031C	8	7	15	8	23	PDI	gi 126336351	1,22E-43	98	X
BJOTD0038C	2	0	2	1	3	Similar to arginine-rich	gi 224048738	9,52E-81	89	X
BJOTD0055C	1	0	1	1	2	protein disulfide isomerase family A, member 6	gi 212274308	5,46E-35	97	X
BJOTD0101C	1	3	4	2	6	Selenoprotein M precursor	gi 45383890	1,06E-35	84	X
BJOTD0109C	0	1	1	1	2	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	gi 158517832	2,39E-69	89	X
BJOTD0149C	0	3	3	2	5	protein transport protein Sec61	gi 63146076	1,17E-20	100	X
BJOTD0177C	2	0	2	5	7	PDI	gi 44969651	0	97	X
BJOTD0187C	0	3	3	12	15	calreticulin	gi 45384264	5,9E-137	97	X
BJOTD0213C	0	1	1	2	3	Signal peptidase complex subunit 3	gi 193785784	1,58E-64	95	X
BJOTD0221C	0	0	0	2	2	Unnamed protein product	gi 256574824	3,17E-60	93	X
BJOTD0282S	1	0	1	0	1	Glutathione peroxidase 3	gi 57529546	1,14E-41	69	X
BJOTD0338S	1	0	1	0	1	Translocon-associated protein subunit beta	gi 224042915	1,15E-52	94	X
BJOTD0352S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 5295932	1,54E-28	90	X
BJOTD0440S	0	1	1	0	1	Cctz-1 gene for chaperonin containing TCP-1	gi 118085355	2,76E-07	93	N
BJOTD0490S	0	1	1	0	1	Signal peptidase complex subunit 2	gi 38374145	2,32E-29	98	X
BJOTD0495S	0	1	1	0	1	Bitis gabonica venom gland cyclophilin	gi 149601896	3,30E-17	93	N
BJOTD0497S	0	1	1	0	1	Ornithorhynchus anatinus similar to PLC alpha	gi 291224321	1,62E-09	84	N
BJOTD0534S	0	1	1	0	1	Adaptor-related protein complex 3	gi 284413724	8,57E-12	85	N
BJOTD0552S	0	1	1	0	1	Signal peptidase complex subunit 1 homolog	gi 148231193	3,24E-47	92	X
BJOTD0580S	0	1	1	0	1	Transmembrane emp24-like trafficking protein 10	gi 281339997	1,77E-08	74	X
BJOTD0666S	0	0	0	1	1	Hypothetical protein PANDA_004681	gi 50752556	5,65E-07	79	X
BJOTD0671S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 157909782	6,16E-82	97	X
BJOTD0680S	0	0	0	1	1	Cellular nucleic acid-binding protein isoform 2	gi 149421418	1,12E-73	98	X
BJOTD0708S	0	0	0	1	1	similar to chromosome 5 open reading frame 14	gi 118084248	7,76E-30	65	X
BJOTD0710S	0	0	0	1	1	similar to ATP binding protein isoform 1	gi 149633351	3,01E-61	92	X
BJOTD0719S	0	0	0	1	1	similar to Vacuolar protein sorting 33 homolog A	gi 118096920	6,08E-89	98	X
BJOTD0736S	0	0	0	1	1	similar to sec61-like protein	gi 297265585	7,9E-104	99	X
BJOTD0775S	0	0	0	1	1	Hypothetical protein LOC695627 isoform 2	gi 229589329	3,75E-27	73	X
BJOTD0795S	0	0	0	1	1	Putative glycine betaine-binding protein precursor	gi 296229418	2,79E-50	100	X
BJOTD0839S	0	0	0	1	1	prefoldin subunit 2-like	gi 38374146	6,59E-57	93	X
BJOTD0875S	0	0	0	1	1	Venom gland cyclophilin	gi 126331303	8,35E-19	97	X
BJOTD0896S	0	0	0	1	1	similar to microsomal signal peptidase	gi 291387836	3,36E-28	96	X
BJOTD0937S	0	0	0	1	1	BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 1	gi 126325897	4,64E-17	79	X
BJOTD0947S	0	0	0	1	1	similar to evectin-2		1,18E-17	88	X

Metabolismo geral

BJOTD0040C	1	1	2	3	5	Hypothetical protein	gi 224094659	5,29E-95	86	X
BJOTD0063C	1	2	3	2	5	NADH dehydrogenase subunit 3	gi 156878364	2,09E-14	87	X
BJOTD0095C	0	2	2	0	2	Aldolase A, isoform CRA_g	gi 149067838	2,11E-68	93	X
BJOTD0206C	1	3	4	8	12	NADH dehydrogenase subunit 1	gi 155970508	8,6E-115	94	X
BJOTD0219C	0	0	0	2	2	Calglandulin	gi 82242790	5,59E-84	98	X
BJOTD0230C	0	0	0	2	2	Creatine kinase	gi 8571478	1,31E-72	99	X
BJOTD0231C	0	0	0	2	2	ATP-specific succinyl-CoA synthetase	gi 4104377	2,78E-25	96	X
BJOTD0253C	0	0	0	9	9	Parvalbumin beta	gi 131109	1,39E-48	95	X
BJOTD0298S	1	0	1	0	1	similar to adenylate kinase (EC 2.7.4.3)	gi 118101780	1,00E-48	92	X
BJOTD0315S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 118099923	1,16E-28	89	X
BJOTD0326S	1	0	1	0	1	PDCD8	gi 115607158	9,10E-18	87	X
BJOTD0350S	1	0	1	0	1	Dodecenoyl-Coenzyme A	gi 118119260	5,23E-25	72	N
BJOTD0357S	1	0	1	0	1	Hypothetical protein PANDA_000063	gi 281346664	1,10E-85	95	X
BJOTD0381S	1	0	1	0	1	Rab GDP dissociation inhibitor beta	gi 45384364	3,20E-65	96	X
BJOTD0385S	1	0	1	0	1	similar to Xgs protein	gi 224073061	4,35E-36	93	X
BJOTD0451S	0	1	1	0	1	Homo sapiens phospholipase C	gi 289547593	3,33E-54	76	N
BJOTD0482S	0	1	1	0	1	L-serine dehydratase 1	gi 229588576	8,49E-27	98	X
BJOTD0484S	0	1	1	0	1	Putative NADP-GAPDH	gi 229591279	3,63E-22	100	X
BJOTD0485S	0	1	1	0	1	similar to ocr1l, partial	gi 149413779	4,18E-65	91	X
BJOTD0527S	0	1	1	0	1	NADH dehydrogenase subunit 2	gi 58373467	2,58E-32	89	X
BJOTD0556S	0	1	1	0	1	NADH dehydrogenase subunit 4	gi 156878366	4,10E-18	94	X
BJOTD0593S	0	1	1	0	1	NADH dehydrogenase	gi 224051044	7,07E-80	91	X
BJOTD0613S	0	1	1	0	1	putative NADH dehydrogenase 1	gi 224093523	1,34E-48	92	X
BJOTD0620S	0	1	1	0	1	Phosphoglycerate kinase	gi 45384486	1,89E-26	98	X
BJOTD0625S	0	1	1	0	1	NADH dehydrogenase	gi 71895153	1,31E-40	81	X
BJOTD0626S	0	1	1	0	1	Acyl-CoA-binding protein	gi 46048920	1,00E-32	88	X
BJOTD0638S	0	0	0	1	1	Creatine kinase	gi 8571478	3,09E-76	94	X
BJOTD0655S	0	0	0	1	1	aldolase B, fructose-bisphosphate	gi 224088858	1,59E-84	94	X
BJOTD0778S	0	0	0	1	1	lactate dehydrogenase H chain	gi 5305416	3,86E-09	74	N
BJOTD0806S	0	0	0	1	1	Parvalbumin beta	gi 131109	1,10E-37	95	X
BJOTD0807S	0	0	0	1	1	Protein S100-A11	gi 45384028	8,18E-36	94	X
BJOTD0822S	0	0	0	1	1	phosphoglucomutase 1 isoform 2	gi 224058375	2,35E-13	94	X
BJOTD0825S	0	0	0	1	1	Collapsin response mediator protein-4	gi 88770841	2,82E-16	84	N
BJOTD0861S	0	0	0	1	1	NADH dehydrogenase subunit 5	gi 155970518	3,00E-46	85	X
BJOTD0906S	0	0	0	1	1	NADH dehydrogenase	gi 296210469	7,09E-26	76	X
BJOTD0916S	0	0	0	1	1	Similar to NADH dehydrogenase	gi 126335507	1,93E-10	73	N
BJOTD0940S	0	0	0	1	1	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3	gi 224047273	6,16E-53	97	X
BJOTD0942S	0	0	0	1	1	Muscle-type lactate dehydrogenase	gi 112791221	4,06E-85	96	X
BJOTD0957S	0	0	0	1	1	similar to parvalbumin	gi 126308908	4,89E-44	84	X

BJOTD0961S	0	0	0	1	1	similar to LOC496978 protein	gi 118094545	1,35E-75	93	X
Regulação										
BJOTD0002C	4	0	4	1	5	Heat shock protein 90kDa	gi 224095440	0	97	X
BJOTD0048C	1	0	1	1	2	Heat shock 70kDa protein 5	gi 224073965	1,2E-150	99	X
BJOTD0085C	1	0	1	2	3	45 kDa calcium-binding protein	gi 239977113	3,49E-49	96	X
BJOTD0105C	0	2	2	0	2	HSP108 mRNA for heat shock protein 108,	gi 161408088	3,71E-45	78	N
BJOTD0268S	1	0	1	0	1	heat shock protein 60	gi 161408075	5,74E-36	100	X
BJOTD0277S	1	0	1	0	1	latent TGFb binding protein 3	gi 293344564	3,73E-47	54	X
BJOTD0291S	1	0	1	0	1	Heat shock protein 108	gi 161408089	4,08E-88	97	X
BJOTD0293S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 224053105	1,56E-54	80	X
BJOTD0335S	1	0	1	0	1	similar to Poly (ADP-ribose) polymerase family	gi 126336674	8,23E-43	84	X
BJOTD0360S	1	0	1	0	1	Hypoxia up-regulated protein 1 precursor	gi 57528712	5,72E-07	63	X
BJOTD0366S	1	0	1	0	1	HSP70	gi 63146078	6,49E-27	100	X
BJOTD0446S	0	1	1	0	1	Xaa-Pro dipeptidase	gi 119331076	3,27E-81	91	X
BJOTD0449S	0	1	1	0	1	45 kDa calcium-binding protein	gi 239977113	5,06E-84	97	X
BJOTD0651S	0	0	0	1	1	FACT complex subunit SPT16	gi 296214423	1,00E-72	100	X
BJOTD0652S	0	0	0	1	1	similar to hDj9	gi 126314456	1,21E-57	99	X
BJOTD0667S	0	0	0	1	1	Putative osteonectin	gi 15558808	2,80E-91	99	X
BJOTD0677S	0	0	0	1	1	F112I Human Sorcin Mutant	gi 158428943	3,51E-73	93	X
BJOTD0685S	0	0	0	1	1	Putative signaling protein	gi 229592248	1,18E-41	98	X
BJOTD0686S	0	0	0	1	1	mitogen-activated protein kinase associated prot1	gi 224073977	1,65E-52	97	X
BJOTD0692S	0	0	0	1	1	14-3-3 sigma	gi 224081649	8,89E-21	94	X
BJOTD0720S	0	0	0	1	1	heat shock protein 90a	gi 161408085	4,30E-39	97	X
BJOTD0722S	0	0	0	1	1	HSP 90	gi 67480188	4,08E-74	100	X
BJOTD0767S	0	0	0	1	1	similar to cell cycle protein p38-2G4 homolog	gi 126343237	2,86E-59	95	X
BJOTD0931S	0	0	0	1	1	hypothetical protein isoform 1	gi 224096978	2,03E-49	78	X
Degradação										
BJOTD0119C	0	2	2	4	6	ubiquitin-like protein FUBI-like	gi 296218727	2,47E-43	89	X
BJOTD0146C	0	1	1	1	2	similar to ubiquitin A-52 residue	gi 114676157	3,73E-69	99	X
BJOTD0155C	0	1	1	1	2	similar to ubiquitin	gi 73970166	9,70E-65	98	X
BJOTD0285S	1	0	1	0	1	chromatin modifying protein 6	gi 224074369	1,52E-45	93	X
BJOTD0309S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 118093769	3,84E-73	95	X
BJOTD0367S	1	0	1	0	1	ubiquitin-like protein FUBI-like	gi 296218727	1,82E-43	89	X
BJOTD0502S	0	1	1	0	1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	gi 197102638	5,35E-86	94	X
BJOTD0526S	0	1	1	0	1	ubiquitin-like protein FUBI-like	gi 296218727	4,44E-40	89	X
BJOTD0565S	0	1	1	0	1	similar to prosomal P27K protein	gi 149410335	2,03E-49	98	X
BJOTD0575S	0	1	1	0	1	proteasome alpha 4 subunit-like	gi 291410735	4,68E-09	97	X
BJOTD0743S	0	0	0	1	1	similar to Proteasome subunit	gi 126309277	1,00E-60	89	X
BJOTD0753S	0	0	0	1	1	Putative proteasome	gi 197128000	2,38E-82	98	X

BJOTD0779S	0	0	0	1	1	78 kDa glucose-regulated protein precursor	gi 296482166	1,69E-43	99	X
BJOTD0791S	0	0	0	1	1	putative proteasome	gi 224045021	7,04E-90	100	X
BJOTD0932S	0	0	0	1	1	similar to Ufm1-conjugating enzyme 1	gi 57111435	2,93E-80	98	X
BJOTD0953S	0	0	0	1	1	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1	gi 269994412	1,42E-81	92	X
BJOTD0960S	0	0	0	1	1	Small ubiquitin-related modifier 1 precursor	gi 45383836	1,18E-51	100	X
Retrotransposons										
BJOTD0141C	0	1	1	1	2	Reverse transcriptase-RNase H-integrase	gi 5002510	7,77E-15	49	X
BJOTD0304S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 118089925	1,57E-09	63	X
BJOTD0340S	1	0	1	0	1	Reverse transcriptase-like protein	gi 4378025	9,43E-15	62	X
BJOTD0392S	1	0	1	0	1	similar to Gag-Pol polyprotein, partial	gi 224170547	8,45E-11	69	X
BJOTD0635S	0	1	1	0	1	Polymerase polyprotein	gi 5777387	9,39E-18	79	X
BJOTD0700S	0	0	0	1	1	similar to transposase	gi 72012604	3,89E-08	56	X
BJOTD0729S	0	0	0	1	1	ORF2	gi 6576738	1,60E-18	75	X
BJOTD0804S	0	0	0	1	1	similar to polyprotein	gi 224048666	2,76E-07	68	X
BJOTD0816S	0	0	0	1	1	similar to Gag-Pol polyprotein	gi 224047378	1,38E-13	60	X
BJOTD0828S	0	0	0	1	1	similar to pol protein, partial	gi 224163174	1,79E-13	70	X
BJOTD0874S	0	0	0	1	1	similar to Gag-Pol polyprotein	gi 224047378	5,13E-11	79	X
BJOTD0924S	0	0	0	1	1	similar to Gag-Pol polyprotein	gi 224047378	2,30E-08	56	X
BJOTD0929S	0	0	0	1	1	similar to Gag-Pol polyprotein	gi 224047378	7,28E-09	81	X
Estruturais										
BJOTD0183C	0	0	0	2	2	Actin gamma 1	gi 60653037	3,1E-177	100	X
BJOTD0186C	0	0	0	2	2	slow skeletal ventricular myosin	gi 189516972	7,54E-77	95	X
BJOTD0188C	0	0	0	3	3	Troponin T class IVc alpha-2	gi 1256738	8,28E-81	94	X
BJOTD0193C	0	0	0	2	2	novel protein similar to tubulin	gi 89268111	7,1E-106	100	X
BJOTD0217C	0	0	0	2	2	Procollagen, type 1, alpha 1, isoform CRA_a	gi 149053909	5,57E-66	95	X
BJOTD0229C	0	0	0	5	5	Actin, alpha 1, skeletal muscle, isoform CRA_a	gi 149043182	0	100	X
BJOTD0259C	0	0	0	5	5	Myosin light chain	gi 52078482	7,64E-92	99	X
BJOTD0301S	1	0	1	0	1	putative myosin alkali light chain	gi 197128586	1,10E-55	100	X
BJOTD0341S	1	0	1	0	1	Hypothetical protein PANDA_018253	gi 281338717	4,04E-41	76	X
BJOTD0378S	1	0	1	0	1	Gallus gallus sel-1 suppressor of lin-12-like	gi 118091891	1,74E-21	79	N
BJOTD0578S	0	1	1	0	1	tubulin beta-2C chain-like isoform 3	gi 297685834	4,60E-33	100	X
BJOTD0594S	0	1	1	0	1	collagen type VI alpha 5	gi 293361347	8,17E-30	63	X
BJOTD0657S	0	0	0	1	1	Embryonic fibroblast tropomyosin 1 isoform 5	gi 126334768	3,48E-74	97	X
BJOTD0669S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 224147797	3,32E-36	88	X
BJOTD0674S	0	0	0	1	1	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	gi 215274109	1,05E-53	95	X
BJOTD0750S	0	0	0	1	1	hypothetical LOC100386176 (LOC100386176)	gi 296236499	5,44E-71	84	N
BJOTD0794S	0	0	0	1	1	Gallus gallus collagen, type I	gi 206597433	7,09E-25	77	N
BJOTD0820S	0	0	0	1	1	similar to alpha 2 type I collagen	gi 224044919	1,06E-66	94	X
BJOTD0894S	0	0	0	1	1	troponin I, skeletal, fast	gi 224050904	2,28E-63	96	X

BJOTD0927S	0	0	0	1	1	microlepidota alpha actin mRNA	gi 15825435	2,60E-90	96	N
Outras funções										
BJOTD0056C	1	0	1	1	2	similar to TRAM-protein	gi 126321059	2,6E-132	93	X
BJOTD0069C	1	0	1	1	2	similar to DRIM protein	gi 118082562	1,39E-83	83	X
BJOTD0175C	3	4	7	7	14	ATPase 6	gi 213391163	7,86E-61	89	X
BJOTD0197C	0	0	0	2	2	Churchill protein	gi 224050719	1,63E-17	93	X
BJOTD0239C	0	0	0	3	3	Human translationally controlled tumour associated prot.	gi 126296321	8,42E-37	89	X
BJOTD0240C	0	0	0	2	2	Taeniopygia guttata nucleophosmin 1-like	gi 224068533	5,61E-30	75	N
BJOTD0244C	0	0	0	2	2	hypothetical protein LOC100403508	gi 296227833	1,74E-31	83	X
BJOTD0255C	0	0	0	3	3	clone 0058P0031E04 putative thymosin beta	gi 76159009	1,09E-35	84	N
BJOTD0270S	1	0	1	0	1	Rare lipoprotein A	gi 293408759	7,94E-30	95	X
BJOTD0271S*	1	0	1	0	1	Lachesis muta cDNA 5' similar to UNR-interacting protein		1,07E-30	73	N
BJOTD0272S	1	0	1	0	1	Taeniopygia guttata akirin 2 (AKIRIN2), mRNA	gi 224048446	1,9E-105	97	N
BJOTD0296S	1	0	1	0	1	rCG33857, isoform CRA_c	gi 149053020	5,41E-07	62	X
BJOTD0307S	1	0	1	0	1	Cytosolic non-specific dipeptidase	gi 57530409	1,21E-57	91	X
BJOTD0323S	1	0	1	0	1	Galectin 3 (LOC100229673), mRNA	gi 224051931	1,98E-28	79	N
BJOTD0347S	1	0	1	0	1	guanine nucleotide-binding protein	gi 297717144	1,86E-71	100	X
BJOTD0359S	1	0	1	0	1	similar to solute carrier family 9	gi 224075240	2,73E-14	83	X
BJOTD0365S	1	0	1	0	1	Magnesium transporter NIPA2	gi 71895211	2,47E-10	81	X
BJOTD0375S	1	0	1	0	1	similar to Ribose-phosphate pyrophosphokinase I -like	gi 126344678	3,02E-45	100	X
BJOTD0377S	1	0	1	0	1	WD repeat-containing protein 24	gi 71894803	7,43E-20	97	X
BJOTD0382S	1	0	1	0	1	mKIAA0051 protein	gi 37359752	1,35E-32	92	X
BJOTD0404S	1	0	1	0	1	similar to SEC24 related gene family, member A	gi 149639326	1,10E-18	96	X
BJOTD0409S	1	0	1	0	1	similar to metadherin, partial	gi 224166970	6,99E-50	82	X
BJOTD0415S	1	0	1	0	1	Stromal cell derived factor receptor 1-like	gi 76158926	1,65E-37	74	N
BJOTD0417S	1	0	1	0	1	Ki-1/57 intracellular antigen	gi 3403154	1,12E-15	76	X
BJOTD0421S	0	1	1	0	1	Integral membrane protein 2A	gi 60302789	3,47E-17	72	N
BJOTD0425S	0	1	1	0	1	Hypothetical protein PFLU2156	gi 229589653	6,55E-30	91	X
BJOTD0426S	0	1	1	0	1	Pilus assembly protein CpaF	gi 293606488	1,22E-49	99	X
BJOTD0429S	0	1	1	0	1	similar to family with sequence similarity 44, member A	gi 118090702	3,22E-48	75	X
BJOTD0432S	0	1	1	0	1	muscle-derived protein 77	gi 224047974	5,78E-36	82	X
BJOTD0433S	0	1	1	0	1	Bcl-2 related anti-apoptotic protein	gi 28200456	8,80E-31	75	N
BJOTD0442S	0	1	1	0	1	Transmembrane protein 14A-like protein	gi 290874552	1,13E-33	86	X
BJOTD0444S	0	1	1	0	1	similar to clusterin	gi 149640991	4,82E-11	66	X
BJOTD0454S	0	1	1	0	1	Smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog	gi 149638721	2,07E-78	99	X
BJOTD0455S	0	1	1	0	1	Heme transport protein, putative	gi 70732683	4,42E-60	87	X
BJOTD0456S	0	1	1	0	1	B-cell receptor-associated protein 31	gi 291412844	9,74E-20	78	X
BJOTD0463S	0	1	1	0	1	TonB-dependent siderophore receptor	gi 167031889	5,01E-24	55	X
BJOTD0464S	0	1	1	0	1	similar to pantothenate kinase 4	gi 224079778	5,94E-81	93	X
BJOTD0472S	0	1	1	0	1	Olfactory receptor KSOR11	gi 289152988	2,28E-48	94	X

BJOTD0481S	0	1	1	0	1	similar to Rad51C	gi 118100296	1,44E-31	85	X
BJOTD0489S	0	1	1	0	1	similar to ankyrin repeat-containing cofactor-1	gi 118096590	5,90E-25	80	X
BJOTD0493S	0	1	1	0	1	similar to Ephx1 protein	gi 50740570	1,49E-31	84	X
BJOTD0498S	0	1	1	0	1	hypothetical protein	gi 118094778	3,30E-31	82	X
BJOTD0501S	0	1	1	0	1	barrier to autointegration factor 1	gi 297468376	2,56E-44	98	X
BJOTD0505S	0	1	1	0	1	Novel 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily protein	gi 118098492	7,54E-60	91	X
BJOTD0516S	0	1	1	0	1	AF159543_1transport protein Sec61 beta subunit	gi 18000273	5,09E-40	100	X
BJOTD0519S	0	1	1	0	1	similar to RAB24, member RAS oncogene family	gi 118097376	3,54E-48	92	X
BJOTD0525S	0	1	1	0	1	Hypothetical protein	gi 290965786	1,13E-34	95	X
BJOTD0535S	0	1	1	0	1	Nucleoside diphosphate kinase A	gi 68299781	1,76E-53	96	X
BJOTD0537S	0	1	1	0	1	cell adhesion molecule 1 isoform 5	gi 291383848	6,96E-42	94	X
BJOTD0540S	0	1	1	0	1	protein glycosyltransferase	gi 213512236	5,65E-67	100	X
BJOTD0543S	0	1	1	0	1	Tsimilar to Male-enhanced antigen 1	gi 224047315	2,25E-41	93	N
BJOTD0544S	0	1	1	0	1	Homo sapiens solute carrier family 6	gi 197276622	1,23E-19	84	N
BJOTD0547S	0	1	1	0	1	short-wavelength sensitive opsin (OPN1SW)	gi 218944448	8,86E-24	84	N
BJOTD0548S	0	1	1	0	1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	gi 71896824	5,1E-159	90	N
BJOTD0553S	0	1	1	0	1	similar to ADP-ribosylation factor	gi 114558505	3,96E-33	88	N
BJOTD0555S	0	1	1	0	1	B-cell translocation gene 1	gi 224094335	4,0E-154	92	N
BJOTD0558S*	0	1	1	0	1	Lachesis muta cDNA 5' similar to catechol-O-methyltransferase		1,87E-93	98	N
BJOTD0559S	0	1	1	0	1	Immunoglobulin mu heavy chain constant region	gi 165928934	1,88E-10	82	N
BJOTD0570S	0	1	1	0	1	interleukin enhancer-binding factor 3-like	gi 296232890	1,66E-12	82	N
BJOTD0572S	0	1	1	0	1	Cytohesin 1, transcript variant 3	gi 297701925	2,43E-10	80	N
BJOTD0576S	0	1	1	0	1	Cystatin-C precursor	gi 130485692	1,86E-18	72	X
BJOTD0579S	0	1	1	0	1	protein transport protein Sec61 subunit alpha	gi 297263181	2,16E-14	100	X
BJOTD0582S	0	1	1	0	1	High-mobility group box 1	gi 224043265	1,58E-71	73	N
BJOTD0584S	0	1	1	0	1	Similar to divalent cation tolerant protein CUTA isoform 1	gi 73972585	6,83E-22	82	N
BJOTD0586S	0	1	1	0	1	putative Phosphohistidine phosphatase 1	gi 224058872	2,05E-25	92	X
BJOTD0597S	0	1	1	0	1	similar to procollagen C-endopeptidase enhancer	gi 126309331	4,46E-28	69	X
BJOTD0616S	0	1	1	0	1	similar to OTTHUMP0000018663	gi 118084662	3,95E-21	73	N
BJOTD0617S	0	1	1	0	1	Coatomer subunit epsilon-like	gi 297276545	7,27E-09	83	N
BJOTD0631S	0	1	1	0	1	Receptor for activated C kinase 1	gi 162424903	3,37E-19	100	X
BJOTD0633S	0	1	1	0	1	Clone 0058P0025H05 putative thymosin beta 4	gi 76158596	1,4E-141	86	N
BJOTD0639S	0	0	0	1	1	similar to Copine VII	gi 118096593	5,60E-22	90	X
BJOTD0643S	0	0	0	1	1	Fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog	gi 194332761	2,70E-25	96	X
BJOTD0644S	0	0	0	1	1	Olfactomedin-like protein 3 precursor	gi 90968644	4,40E-94	91	X
BJOTD0645S	0	0	0	1	1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	gi 215983070	1,29E-27	68	X
BJOTD0649S	0	0	0	1	1	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2	gi 55742430	6,78E-57	80	X
BJOTD0650S	0	0	0	1	1	Death-associated protein 1	gi 71896843	1,01E-40	93	X
BJOTD0654S	0	0	0	1	1	similar to PHD finger protein 20	gi 224077253	1,11E-89	95	X
BJOTD0656S	0	0	0	1	1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	gi 291387624	4,20E-22	100	X

BJOTD0661S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 118093152	1,59E-25	93	X
BJOTD0663S	0	0	0	1	1	Hypothetical protein PANDA_008171	gi 281346174	1,05E-53	80	X
BJOTD0668S	0	0	0	1	1	HERV-R(b)_3p24.3 provirus ancestral Env polyprotein	gi 44887882	2,61E-12	60	X
BJOTD0678S	0	0	0	1	1	similar to arylacetamide deacetylase-like 1	gi 224060839	1,12E-56	74	X
BJOTD0681S	0	0	0	1	1	mRNA for aminopeptidase A	gi 148367283	1,4E-165	96	N
BJOTD0682S	0	0	0	1	1	Cytokine-like protein	gi 37993397	3,04E-70	91	X
BJOTD0691S	0	0	0	1	1	source of immunodominant MHC-associated peptides	gi 224045413	1,02E-24	100	X
BJOTD0695S	0	0	0	1	1	similar to dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	gi 118084951	3,85E-32	79	X
BJOTD0711S	0	0	0	1	1	similar to TP53RK-binding protein	gi 194220602	5,48E-18	91	X
BJOTD0718S	0	0	0	1	1	tyrosylprotein sulfotransferase 1	gi 291412107	4,68E-46	88	X
BJOTD0721S	0	0	0	1	1	multiple coagulation factor deficiency 2	gi 224047072	6,78E-33	83	X
BJOTD0726S	0	0	0	1	1	Basigin	gi 37700234	2,03E-09	64	X
BJOTD0727S	0	0	0	1	1	SERPINE1 mRNA binding protein 1-like isoform 3	gi 291398731	8,94E-37	98	X
BJOTD0738S	0	0	0	1	1	protein glycosyltransferase subunit STT3A isoform 3	gi 296216574	3,46E-25	100	X
BJOTD0754S	0	0	0	1	1	multiple ankyrin repeats single KH domain protein	gi 118097192	1,84E-75	84	X
BJOTD0777S	0	0	0	1	1	Chemotaxis sensory transducer, Pas/Pac sensor	gi 77460879	5,19E-08	91	X
BJOTD0780S	0	0	0	1	1	transmembrane protein 39A	gi 224044017	1,05E-21	98	X
BJOTD0803S	0	0	0	1	1	Activated leukocyte cell adhesion molecule	gi 45383997	7,00E-13	87	N
BJOTD0832S*	0	0	0	1	1	Lachesis muta cDNA 5' similar to Vit. D3 receptor-interacting protein		3,93E-76	97	N
BJOTD0842S	0	0	0	1	1	similar to Galectin-1	gi 149632412	9,46E-35	67	X
BJOTD0848S	0	0	0	1	1	ribophorin II	gi 224077966	4,04E-50	97	X
BJOTD0860S	0	0	0	1	1	Semaphorin 3fa	gi 190337611	3,48E-25	98	X
BJOTD0865S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 118087538	4,78E-81	97	X
BJOTD0869S	0	0	0	1	1	Gallus gallus unc-84 homolog A	gi 118097737	9,94E-38	82	N
BJOTD0885S	0	0	0	1	1	Leu-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4	gi 118091123	2,85E-74	82	N
BJOTD0893S	0	0	0	1	1	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	gi 71894779	3,65E-22	91	X
BJOTD0902S	0	0	0	1	1	FK506 binding protein 4, 59kDa	gi 224043784	5,23E-21	81	X
BJOTD0913S	0	0	0	1	1	Phosphoserine phosphatase	gi 293605675	6,20E-22	89	X
BJOTD0917S	0	0	0	1	1	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	gi 224046794	1,41E-27	68	X
BJOTD0918S	0	0	0	1	1	retinoblastoma binding protein 8	gi 291394192	1,45E-30	91	X
BJOTD0928S	0	0	0	1	1	Putative fatty acid binding protein 5 variant 1	gi 197127225	1,58E-33	89	X
BJOTD0935S	0	0	0	1	1	High mobility group nucleosomal binding domain	gi 76158875	1,52E-69	81	N
BJOTD0944S	0	0	0	1	1	fidgetin-like 1	gi 224045854	1,57E-96	96	X
BJOTD0949S	0	0	0	1	1	similar to Amplified in osteosarcoma	gi 126343814	2,43E-18	63	X
Função desconhecida										
BJOTD0124C	0	3	3	1	4	hypothetical protein THERM_02141640	gi 118392259	3,28E-41	71	X
BJOTD0202C	0	0	0	2	2	putative comparative gene identification 20	gi 224070442	3,09E-50	97	X
BJOTD0237C	0	0	0	3	3	hypothetical protein	gi 50758256	1,20E-13	64	X

BJOTD0250C	0	1	1	2	3	Lithognathus mormyrus clone lmos8p03h04	gi 116745266	2,33E-24	94	N
BJOTD0320S	1	0	1	0	1	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	gi 148227746	6,68E-28	90	X
BJOTD0333S	1	0	1	0	1	Tetratricopeptide repeat domain 15	gi 118088980	1,22E-22	88	N
BJOTD0344S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 291415304	2,42E-18	69	X
BJOTD0348S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 224044061	5,36E-18	61	X
BJOTD0361S	1	0	1	0	1	BAC clone CH261-2F13 from chromosome ul	gi 84875715	8,30E-25	69	N
BJOTD0368S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 291415304	5,36E-34	78	X
BJOTD0400S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 118083778	6,99E-21	94	X
BJOTD0411S	1	0	1	0	1	hypothetical protein	gi 224058216	3,43E-41	86	X
BJOTD0459S	0	1	1	0	1	hypothetical protein	gi 149637362	2,42E-74	97	X
BJOTD0475S	0	1	1	0	1	similar to DKFZP459P083 protein isoform 2	gi 224090703	5,30E-97	97	X
BJOTD0476S	0	1	1	0	1	Hypothetical protein PANDA_011511	gi 281350192	3,66E-14	80	X
BJOTD0479S	0	1	1	0	1	MGC80480 protein	gi 148227590	1,44E-67	85	X
BJOTD0504S	0	1	1	0	1	Aphanomyces euteiches cDNA	gi 166044478	7,9E-122	99	N
BJOTD0512S	0	1	1	0	1	DNA packaging protein FI	gi 288871749	7,40E-23	98	X
BJOTD0530S	0	1	1	0	1	Gekko japonicus GekBS130P	gi 58568144	1,25E-13	73	N
BJOTD0542S	0	1	1	0	1	similar to MGC53931 protein	gi 149634015	1,00E-52	96	X
BJOTD0561S	0	1	1	0	1	hypothetical protein	gi 224081582	8,88E-13	87	X
BJOTD0562S	0	1	1	0	1	Hypothetical LOC100063824	gi 149728931	7,90E-43	80	N
BJOTD0574S	0	1	1	0	1	Split hand/foot malformation ectrodactyly type 1	gi 60654499	9,41E-15	98	X
BJOTD0612S	0	1	1	0	1	hypothetical protein TATV_DAH68_216	gi 113195393	1,21E-09	69	X
BJOTD0630S	0	1	1	0	1	Gallus gallus finished cDNA, clone ChEST294h12	gi 46239341	1,99E-24	77	N
BJOTD0640S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 126308335	3,77E-47	75	X
BJOTD0658S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 118083457	1,37E-33	63	X
BJOTD0679S	0	0	0	1	1	Unnamed protein product	gi 21756308	9,57E-19	74	X
BJOTD0697S	0	0	0	1	1	Aphanomyces euteiches cDNA	gi 166046584	2,2E-168	100	N
BJOTD0782S	0	0	0	1	1	Hypothetical protein LOC420161	gi 57530610	6,63E-40	85	X
BJOTD0783S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 224068254	7,35E-10	92	X
BJOTD0810S	0	0	0	1	1	UPF0183 protein C16orf70-like	gi 297698947	4,57E-08	79	N
BJOTD0866S	0	0	0	1	1	hypothetical protein	gi 224075120	9,20E-37	77	X
BJOTD0895S	0	0	0	1	1	Gallus gallus finished cDNA, clone ChEST383o16	gi 45426208	4,72E-68	85	N
BJOTD0903S	0	0	0	1	1	Hypothetical LOC100451265	gi 297693206	1,42E-07	85	N
BJOTD0912S	0	0	0	1	1	Gallus gallus finished cDNA, clone ChEST62o10	gi 46238581	8,04E-39	77	N

¹Número de clones que compõem o cluster. **AF:** biblioteca de fêmeas adultas; **AM:** biblioteca de machos adultos; **AT:** biblioteca de adultos (machos e fêmeas); **F:** biblioteca de filhotes.

²gi number conforme o banco não redundante do NCBI (nrNCBI - *National Center for Biotechnology Information*).

³Porcentagem de similaridade de seqüência.

⁴A identificação dos clusters foi feita utilizando-se o algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1997). **X** representa similaridade verificada por BlastX; **N** representa similaridade verificada por Blast. Os clusters indicados com um (*) foram identificados utilizando o banco de ESTs do NCBI (dbEST).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: André Zelanis Palitot Pereira

Local e data de nascimento: Porto Alegre, 25/07/1981

EDUCAÇÃO

Ensino médio: Colégio Nossa Senhora do Rosário, Curitiba-PR (1996-1998)

Graduação: Licenciatura e Bacharelado em Biologia -Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). (2000-2004).

Pós graduação: Mestrado em Ciências (Fisiologia geral)- Universidade de São Paulo (USP-SP). Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia (2004-2006).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cursos de Extensão

- Dezembro 2010. Curso - Proteomics methods and approaches for protein identification and quantitation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (FCF-USP-SP).Carga horária: 12h.
- Dezembro 2009. Curso - Proteômica quantitativa e interpretação de espectros de peptídeos. Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas (BrMass). Carga horária: 8h.
- Dezembro 2007. Curso - Aspectos fundamentais de espectrometria de massas em análise proteômica. Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas (BrMass). Carga horária: 8h
- Novembro 2007. Curso da Rede Proteoma do Estado de São Paulo. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS, Campinas, São Paulo. Carga horária: 40h.
- Fevereiro de 2006. Curso - Serpentes. Instituto Butantan, IBU, Brasil. Carga horária: 40h.
- Maio de 2005. 1ºCurso de Redação Científica. Instituto Butantan, IBU, Brasil. Carga horária: 9h.

- Março de 2005. Curso de Extensão Universitária sobre Acidentes por animais peçonhentos (Disciplina MIP 5729, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias). Instituto Butantan, IBU, Brasil. Carga horária: 75h
- Outubro de 2004. Mini-curso: Princípios Básicos em sistemática filogenética. Instituto Butantan, IBU, Brasil. Carga horária: 10h.
- Abril de 2004. Curso- Peptídios- Isolamento, caracterização e atividades biológicas (Disciplina BTC 5721 do Instituto de Ciências Biomédicas IV, Interunidades em biotecnologia). Instituto Butantan, IBU, Brasil. Carga horária: 60h.
- Julho de 2003. II Curso de Inverno de Bioquímica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Carga horária: 120h.
- Maio de 2003. Mini-curso: Bioquímica do câncer. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Brasil. Carga horária: 6h
- Maio de 2003. Extensão Universitária sobre Ecologia de serpentes da Mata Atlântica. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Brasil. Carga horária: 20h.
- Agosto de 2002. Disciplina optativa - Farmacologia aplicada à Biologia. Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil. Carga horária: 80h.
- Setembro de 2001. Curso de extensão universitária sobre Controle biológico de pragas. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Brasil. Carga horária: 20h.
- Junho de 2001. Curso de extensão universitária sobre Herpetologia da Floresta com araucária. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Brasil. Carga horária: 20h.
- Setembro de 2000. Curso de extensão universitária sobre Biologia, ecologia e sistemática de aranhas. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Brasil. Carga horária: 20h.
- Agosto de 2000. Curso de extensão universitária sobre répteis do Brasil - Manutenção em cativeiro. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Brasil. Carga horária: 16h.
- Junho de 2000. Curso de extensão universitária sobre Serpentes do Sul do Brasil. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Brasil. Carga horária: 18h.

OCUPAÇÃO

Bolsista de doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 06/60486-0; Vigência: Abril-2007 a Fevereiro-2011).

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos completos

1. **ZELANIS, A.**; TASHIMA, A.K.T.; ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D.; CAMARGO, A.C.M.;HO, P.L.; SERRANO, S.M.T. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *Journal of Proteome Research* 9: 2278-2291, 2010.
2. **ZELANIS, A.**; ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D. Preliminary biochemical characterization of the venoms of five Colubridae species from Brazil. *Toxicon* 55:666-669, 2010.
3. TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R., **ZELANIS, A.**, FURTADO, M.F.D. Sexual dimorphism in development and venom production of the insular threatened pit-viper *Bothrops insularis* (Serpentes:Viperidae) of Queimada Grande Island, Brazil. *Journal of Threatened Taxa* 2(10): 1177-1184., 2010.
4. OLIVEIRA, A.K.; LEME, A.P.; ASSAKURA, M.T.; MENEZES, M.C.; **ZELANIS, A.**; TASHIMA, A.K. ; LOPES-FERREIRA, M. ; LIMA, C. ; CAMARGO, A. C. M. ; FOX, J. W. ; SERRANO, S. M. T. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 53: 797-801, 2009.
5. **ZELANIS,A.**; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; FURTADO, M.F.D. Ontogenetic changes on *Bothrops insularis* (Serpentes:Viperidae) snake venom and its biological implications. *South American Journal of Herpetology* 3 (1):443-50, 2008.
6. **ZELANIS,A.**; VENTURA, J.S.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FURTADO, M.F.D. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: An ontogenetic approach. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 145:601-609,2007.
7. LORENCETTI,T.T., HESS,P.L., PEREIRA, E.R., KIZLTLYKA,V. **ZELANIS, A.**; PEREIRA,L.F., ELÍFIO-ESPÓSITO, S.L. Purificação parcial de proteases do veneno de *Bothrops cotiara* (Serpentes:Viperidae). *Revista Estudos de Biologia* 27(59): 19-25, 2005.
8. **ZELANIS, A.**; PEREIRA, L. F.; ELÍFIO-ESPOSITO,S.L. Comparação do perfil protéico e atividade biológica in vitro de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (SERPENTES: Viperidae). *Revista Estudos de Biologia* 25(52): 11-15, 2003.

Resumos em Congressos

1. ZELANIS, A. ;TASHIMA, A.K., PINTO, A.F.M., PAES-LEME, A.F., FURTADO, M.F.D., SHERMAN, N.E., FOX, J.W., HO, P.L., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M., SERRANO, S.M.T. Insights into the ontogenetic variability of *Bothrops jararaca* snake venom from proteomic, peptidomic and transcriptomic approaches. Em: 9º Human Proteome World Congress. Abstract book of 9º World HUPO Congress, Sydney, Australia, 2010.

2. SERRANO, S. M. T. ; ZELANIS, A. ; TASHIMA, A. K. ; FURTADO, M. F. D. ; HO, P.L ; PINTO, A. F. M. ; SHERMAN, N. E. ; FOX, J. W. . Bothrops jararaca: Insights into the ontogenetic variation from pharmacological and proteomic approaches. Em: Annual meeting of the Association of Biomolecular Resource Facilities (ABRF) 2010, 2010, Sacramento, California. Abstract book of the annual meeting of the ABRF 2010, 2010. p. 82-83.
3. ZELANIS, A. ; LEME, A. P. ; TASHIMA, A. K. ; FURTADO, M. F. D. ; HO, P.L ; CAMARGO, A. C. M. ; PINTO, A. F. M. ; SHERMAN, N. E. ; FOX, J. W. ; SERRANO, S. M. T. . Exploring Bothrops jararaca venom variability by proteomic approaches. Em: Keystone Symposia on molecular and cellular biology - Omics meets cell biology, 2009, Breckenridge, Colorado. Abstract book of Keystone Symposia on molecular and cellular biology - Omics meets cell biology, 2009.
4. TASHIMA, A. K. ; ZELANIS, A. ; CAMARGO, A. C. M. ; SERRANO, S. M. T. . Comparative peptidomics of Bothrops cotiara, Bothrops fonsecai and Bothrops jararaca snake venoms. Em: XVI World COngress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2009, Cabo de Santo Agostinho- PE. Abstracts of the XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009.
5. ZELANIS, A. ; TASHIMA, A. K. ; PINTO, A. F. M. ; SHERMAN, N. E. ; FURTADO, M. F. D. ; CAMARGO, A. C. M. ; HO, P.L ; FOX, J. W. ; SERRANO, S. M. T. . Proteomic profiling of age and sex-based variability in Bothrops jararaca snake venom. Em: XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X COngresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2009, Cabo de Santo Agostinho - PE. Abstracts of the XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009.
6. ZELANIS, A. ; TASHIMA, A. K. ; Dias, G.S ; Kitano, E.S ; FURTADO, M. F. D. ; HO, P.L ; SERRANO, S. M. T. . Comparative analysis of the glycoproteomes of newborn and adult venoms of Bothrops jararaca. Em: 3 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2009, Campinas-SP. Resumos do 3 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas (BrMASS), 2009.
7. TASHIMA, A. K. ; ZELANIS, A. ; Kitano, E.S ; SANTANNA, S. S. ; CAMARGO, A. C. M. ; SERRANO, S. M. T. . Peptidomic analyses of Bothrops cotiara, Bothrops fonsecai and Bothrops jararaca venoms reveal novel peptides from the BPP-CNP precursor, and fragments from L-amino acid oxidase.. Em: 3 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS, 2009, Campinas-SP. Resumos do 3 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2009.
8. Kitano, E.S ; TASHIMA, A. K. ; Dias, G.S ; ZELANIS, A. ; SERRANO, S. M. T. . Exploring the proteome of the South American rattlesnake Crotalus durissus terrificus by electrophoretic and mass spectrometric analysis. Em: 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS, 2009, Campinas-SP. Resumo do 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2009.
9. ZELANIS, A. ; Dias, G.S ; TASHIMA, A. K. ; PINTO, A. F. M. ; SHERMAN, N. E. ; FURTADO, M. F. D. ; CAMARGO, A. C. M. ; HO, P.L ; FOX, J. W. ; SERRANO, S. M. T. . Proteomics profiling of age and sex-based variability in Bothrops jararaca snake venom. Em: XI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2009, São Paulo-SP. CD de resumos da XI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2009.
10. TASHIMA, A. K. ; ZELANIS, A. ; Kitano, E.S ; SANTANNA, S. S. ; CAMARGO, A. C. M. ; SERRANO, S. M. T. . Comparative peptidomics of Bothrops cotiara, Bothrops fonsecai and bothrops jararaca snake venoms. Em: XI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2009, São Paulo-SP. CD de resumos da XI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2009.
11. Kitano, E.S ; TASHIMA, A. K. ; Dias, G.S ; ZELANIS, A. ; SERRANO, S. M. T. . Exploring the proteome and the peptidome of South American viperid venoms. Em: XI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2009, São Paulo. CD de resumos da XI Reunião Científica Anual do

Instituto Butantan, 2009.

12. ZELANIS, A. ; LEME, A. P. ; TASHIMA, A. K. ; FURTADO, M. F. D. ; CAMARGO, A. C. M. ; HO, P.L ; FOX, J. W. ; SERRANO, S. M. T. . Proteomic analysis of Bothrops jararaca venom variability. Em: 37 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008. CD de resumos da 37 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008.
13. GARCIA, T. C. ; ZELANIS, A. ; TASHIMA, A. K. ; KLITZKE, C. ; LEME, A. P. ; SILVA JR, P. I. ; CAMARGO, A. C. M. ; SERRANO, S. M. T. . Isolation of toxins with high affinity for heparin from Bothrops cotiara venom. Em: X Reunião Científica Anual do instituto Butantan, 2008, São Paulo. CD de resumos da X Reunião Científica Anual do instituto Butantan, 2008.
14. OLIVEIRA, A. K. ; ASSAKURA, M. T. ; TASHIMA, A. K. ; ZELANIS, A. ; LOPES-FERREIRA, M. ; LIMA, C. ; CAMARGO, A. C. M. ; FOX, J. W. ; SERRANO, S. M. T. . Role of the disintegrin-like/cysteine-rich domains in the interactions of snake venom metalloproteinases with plasma and extracellular matrix proteins. Em: X Reunião científica Anual do Instituto Butantan, 2008, São Paulo. CD de resumos da X Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2008.
15. ZELANIS, A. ; GOIS, C. ; MENEZES, M. C. ; CAMARGO, A. C. M. ; FURTADO, M. F. D. ; HO, P.L ; SERRANO, S. M. T. . Exploring the variability of Bothrops jararaca venom by proteomic analysis. Em: 9th Pan-American Congress of the International Society on Toxinology, 2007, Querétaro, México. Abstracts of the 9th Pan-American Congress of the International Society on Toxinology, 2007.
16. ZELANIS, A. ; LEME, A. P. ; TASHIMA, A. K. ; FURTADO, M. F. D. ; HO, P.L ; CAMARGO, A. C. M. ; FOX, J. W. ; SERRANO, S. M. T. . Proteomic analysis of Bothrops jararaca venom variability. Em: 2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas (BrMASS), 2007, Campinas, São Paulo-SP. CD de resumos do 2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas (BrMASS), 2007.
17. ZELANIS, A. ; TRAVAGLIA-CARDOSO ,S.R. ; FURTADO, M. F. D. . Variações ontogenéticas no veneno de Bothrops insularis (Amaral,1921) e suas implicações adaptativas. Em: XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, 2006, Londrina-PR. CD de resumos do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, 2006.
18. TRAVAGLIA-CARDOSO ,S.R. ; ZELANIS, A. ; FURTADO, M. F. D. . Aspectos da reprodução, desenvolvimento e quantidade de veneno de Bothrops insularis (Serpentes, Viperidae). Em: XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, 2006, Londrina-PR. CD de resumos do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, 2006.
19. LEME, A. P. ; ZELANIS, A. ; MENEZES, M. C. ; ROCHA, M. M. T. ; FURTADO, M. F. D. ; CAMARGO, A. C. M. ; SERRANO, S. M. T. . Proteomic analysis of the venom of the opisthoglyphous colubrid snake *Phalotris mertensi*. Em: 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia - SP. CD de resumos da 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.
20. ZELANIS, A. ; ROCHA, M. M. T. ; FURTADO, M. F. D. . Preliminary study of venoms of five Colubrid species from Brazil. Em: 8º Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2006, São Paulo. Memórias do Instituto Butantan, 2006. v. 63. p. 29-29.
21. FURTADO, M. F. D. ; NARVAES, L. V. P. ; ZELANIS, A. . Possui o veneno de *Bothrops alcatraz* características pedomórficas?. Em: II Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2005, Belo Horizonte, MG. CD de resumos do II Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2005.
22. ZELANIS, A. ; VENTURA, J. S. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ; FURTADO, M. F. D. .

- Ontogenetic changes on *Bothrops insularis* snake venom. Em: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia molecular, 2005, Águas de Lindóia, São Paulo. CD de resumos da XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005.
23. ZELANIS, A. ; TRAVAGLIA-CARDOSO ,S.R. ; FURTADO, M. F. D. . Development and venom production in *Bothrops insularis* (Amaral, 1921) maintained in captivity. Em: VI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2005, São Paulo. Memórias do Instituto Butantan, 2005. v. 61. p. 36-36.
 24. FURTADO, M. F. D. ; NARVAES, L. V. P. ; ZELANIS, A. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. . Is *Bothrops alcatraz* venom a paedomorphic characteristic?. Em: VI Reunião Científica anual do Instituto Butantan, 2005, São Paulo. Memórias do Instituto Butantan, 2005. v. 61. p. 38-38.
 25. ZELANIS, A. ; TRAVAGLIA-CARDOSO ,S.R. ; FURTADO, M. F. D. . Ontogenetic variability and adaptative characteristics of *Bothrops insularis* snake venom. Em: 7 Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2005, São Paulo. Memórias do Instituto Butantan, 2005. v. 62. p. 14-14.
 26. LORENCETTI, T. T. ; ZELANIS, A. ; BRACHICK, F. ; PEREIRA, L. F. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Investigations on *Bothrops cotiara* venom proteases. Em: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia molecular, 2004, Caxambu. Anais da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004.
 27. ZELANIS, A. ; TRAVAGLIA-CARDOSO ,S.R. ; FURTADO, M. F. D. . Análise do desenvolvimento e quantidade de veneno produzida por uma ninhada de *Bothrops insularis* (Amaral,1921) criada em cativeiro. Em: I Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2004, Curitiba. CD de resumos do I Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2004.
 28. LORENCETTI, T. T. ; BRACHICK, F. ; ZELANIS, A. ; LOPES, P. H. ; PEREIRA, L. F. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Purificação parcial de proteases do veneno de *Bothrops cotiara* (SERPENTES: VIPERIDAE). Em: I Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2004, Curitiba. CD de resumos do I Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2004.
 29. ZELANIS, A. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Investigação dos efeitos tóxicos de frações protéicas isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* (SERPENTES:VIPERIDAE). Em: 11º Jornada Nacional de Iniciação Científica, 2004, Cuiabá. CD de resumos da 56 Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2004.
 30. ZELANIS, A. ; PEREIRA, L. F. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Comparative Study On The venoms Of *Bothrops* Species Found In Paraná, Brazil. Em: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003, Caxambu. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003.
 31. LOPES, P. H. ; PEREIRA, L. F. ; ZELANIS, A. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Investigação da atividade hemaglutinante em venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Em: 4 BIOCEC- Ciclo de Estudos Científicos de Biologia, PUC PR, 2003, Curitiba. 4 BIOCEC- Ciclo de Estudos Científicos de Biologia, Caderno de Resumos PUC PR. Curitiba : Champagnat, 2003.
 32. ZELANIS, A. ; LORENCETTI, T. T. ; PEREIRA, L. F. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Estudo de algumas atividades biológicas no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* ocorrentes no Estado do Paraná, Brasil. Em: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2003, Curitiba. XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2003.
 33. LOPES, P. H. ; ZELANIS, A. ; PEREIRA, L. F. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Identificação de lectinas dependentes de Ca²⁺ no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* ocorrentes no Estado do Paraná

,Brasil. Em: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2003, Curitiba. XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2003.

34. ZELANIS, A. ; LORENCETTI, T. T. ; PEREIRA, L. F. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Estudo comparativo dos venenos de algumas espécies de *Bothrops* (Serpentes:Viperidae) do Estado do Paraná. Em: 4 Biocec - Ciclo de Estudos Científicos de Biologia, 2003, Curitiba-PR. Caderno de resumos da 4 Biocec. Curitiba : Champagnat, 2003. p. 28-28.
35. ZELANIS, A. ; ELIFIO-ESPOSITO, S. L. . Investigação dos efeitos tóxicos de frações protéicas isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* (Serpentes, Viperidae). Em: XI Seminário de Iniciação Científica da PUC-PR, 2003. Caderno de Resumos do XI Seminário de Iniciação Científica da PUC-PR, 2003.