AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Análise combinada do transcriptoma de glândula de veneno e do proteoma do veneno da espécie *Pseudonaja textilis* (Elapidae : Serpentes).

Vincent Louis Viala

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

**Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**

**São Paulo
2014**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Análise combinada do transcriptoma de glândula de veneno e do proteoma do
veneno da espécie *Pseudonaja textilis* (Elapidae : Serpentes).**

Vincent Louis Viala

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2014

*Dedico esta tese a minha esposa Heloisa
e a toda minha família.*

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, e agora amigo, Dr. Patrick Jack Spencer por me incentivar e me mostrar os caminhos para alcançar os meus objetivos.

Agradeço à minha esposa Heloisa e toda a minha família por sempre me apoiarem e acreditarem em meu trabalho.

Agradeço especialmente à minha “irmã” Tamara Fucase, não só pelo apoio, amizade e ensino no laboratório, mas também por ter conduzido os experimentos e ensaios de purificações e blots, sem os quais eu não teria alcançado os resultados que obtive.

Também agradeço especialmente à minha outra “irmã” Karina Corleto, que desde o primeiro dia em que me recebeu na Instituição, tem me indicado todos os melhores (e mais fáceis) caminhos para que eu possa concluir meu trabalho com mais tranquilidade.

Sem palavras para agradecer o total apoio, amizade, trabalho, descontração e paciência dos meus colegas de laboratório (em ordem alfabética) Alisson, Bruno, Daniela, Ed Carlos, Helen, Mariana, Marina, Paula, Podé e Rodrigo, essenciais para a conclusão desta tese. Obrigado também pelas divertidíssimas viagens a congressos!

Agradeço o apoio, suporte, paciência, incentivo e amizade de todos desta grande família de pesquisadores, funcionários, alunos, colegas e amigos do Centro de Biotecnologia do IPEN.

Agradeço ao Dr. Peter Mirtschin e Dr. Nathan Dunstan pela colaboração e fornecimento do precioso material biológico para este projeto.

Agradeço ao Dr. Daniel Pimenta pelos valiosos esclarecimentos e orientação em espectrometria de massas, pelo incentivo e colaboração e por abrir suas portas para futuras pesquisas.

Agradeço os institutos de pesquisa IPEN e Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan e Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP pelo espaço e infraestrutura cedidos para o desenvolvimento e conclusão deste projeto.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação do IPEN pela prontidão e eficácia.

Agradeço ao Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni da UNESP de São José do Rio Preto por me convidar para participar de um grande projeto de colaboração Brasil-Alemanha.

Agradeço à minha amiga Dra. Aisha Munawar por me receber e facilitar minha vida em Hamburgo, assim como por me apresentar os grandes amigos que fiz por lá.

Agradeço à Dr. Diana Hildebrand por conduzir os experimentos de espectrometria de massas no laboratório do Dr. Schlüter, essenciais para a conclusão de minha tese.

Agradeço ao Dr. Christian Betzel e sua equipe e ao Dr. Harmut Schlüter e sua equipe por me receberem na Universidade de Hamburgo e na UKE, Alemanha, para a realização do meu doutorado sanduíche.

Agradeço ao programa CAPES-DAAD-PROBRAL de cooperação científica Brasil-Alemanha por me conceder financiamento para o doutorado sanduíche em Hamburgo, Alemanha.

Finalmente, agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro concedido ao projeto nº 2009/10305-8.

RESUMO

As toxinas de veneno de serpentes têm como principal função alterar a homeostase das presas para fins de alimentação ou defesa. O estudo aprofundado da composição do veneno de serpentes é importante para a produção de soros antiofídicos mais eficientes, para a descoberta de novos fármacos e na compreensão de processos biológicos, ecológicos e evolutivos. As pesquisas com toxinas têm mostrado uma versatilidade natural, refinada pela evolução, na diversificação de funções em famílias de proteínas recrutadas de suas funções endógenas, por meio de sucessivas duplicações e acúmulo de mutações levando a uma evolução acelerada. A miríade de toxinas disponíveis e sua diversidade de funções ainda não foram completamente descritas. A combinação das análises em larga escala do transcriptoma *de novo* da glândula de veneno e do proteoma do veneno permite elaborar um perfil mais completo do “toxinoma” do veneno, permitindo inclusive um aumento na sensibilidade da detecção de toxinas pouco representadas e inesperadas nos venenos. O objetivo geral deste estudo foi analisar o “toxinoma” do veneno de uma das mais perigosas espécies australianas, a *Pseudonaja textilis* (Elapidae). Foi possível identificar no veneno as toxinas: fatores de coagulação de veneno do complexo protrombinase, subunidades de fosfolipases A2 (PLA2) da neurotoxina textilotoxin e PLA2 de atividade procoagulante, neurotoxinas tipo *three-finger toxin* (3FTx), inibidores de protease do tipo-kunitz *textilinin*, e pela primeira vez, uma nova variante de 3FTx, lectinas tipo C, CRiSP além de indícios de toxinas de lagarto *Heloderma* e outras proteínas candidatas a toxinas como calreticulin e dipeptidase 2. Metaloproteinases, pouco estudadas em Elapidae, foram clonadas e detectadas no veneno por ensaios de fracionamento e imunoreatividade. A análise do transcriptoma identificou novas isoformas e variantes de toxinas, principalmente das 3FTx e dos inibidores de serinoproteases, assim como transcritos de toxinas que não foram detectadas no veneno e que merecem mais investigações. O quadro de sintomas com acidentes em humanos é bem explicado pelas toxinas identificadas, porém, em seu habitat natural, as toxinas pouco conhecidas e até então não descritas devem ter funções importantes e específicas na predação. Identificar esta diversidade de variantes é importante para entender o modo de ação das toxinas.

ABSTRACT

Snake venom toxins alter prey homeostasis for feeding or defense. In depth studies of venom composition are important for better antivenom production, for new drugs lead and discovery and for better understanding of biological, ecological and evolutionary processes. Research on toxins have shown the nature's way of innovating, refined by evolution, diversifying functions of protein families recruited from their endogenous function to the venom gland by successive gene duplication and mutation accumulation, leading to an accelerated evolution. A myriad of available toxins and diversity of functions is still available for discovery. Combining high throughput techniques such as venom gland *de novo* transcriptomics and venom proteomics, one can assess and observe a more complete profile of the snake "toxinome", additionally allowing an upscale in low represented and unexpected toxin detection. The aim of this project was to investigate the venom "toxinome" of one of the most dangerous Australian species, *Pseudonaja textilis* (Elapidae). The toxins identified in it venom was: protrombinase complex coagulation factors, neurotoxic textilotoxin phospholipase A2 (PLA2) subunits and procoagulant PLA2, neurotoxic three-finger toxins (3FTx), Kunitz-type protease inhibitor textilinin, and for the first time, a new long 3FTx, C-type lectins, CRiSPs, as well as evidences of lizard toxins from *Heloderma* genus and other toxin candidates calreticulin and dipeptidase 2. Metalloproteinases, little investigated in Elapidae, was cloned and detected in the venom after fractionation and immunoassay. The transcriptome revealed new toxin variants and isoforms, specially 3FTx and serine protease inhibitors, as well as transcripts from toxins not detected in the venom that deserves further investigation. Human accident symptoms are well explained by the identified toxins, however, in its natural environment, little known and undescribed toxins must have specific and important role in predation. Identifying this diversity is important to better understand toxins ways of action.

SUMÁRIO

1 – Introdução.....	8
2 – Objetivos.....	16
3 – Materiais e métodos.	17
3.1 – Materiais.....	17
3.1.1 – Glândulas de veneno de <i>Pseudonaja textilis</i>	17
3.1.2 – Amostra de veneno total de <i>P. textilis</i>	17
3.2 - Métodos.	18
3.2.1 - Transcriptoma <i>de novo</i> de glândula de veneno de <i>P. textilis</i>	18
3.2.1.1 - Obtenção da biblioteca normalizada de cDNA.	19
3.2.1.2 - Pirosequenciamento	19
3.2.1.3 - Análise bioinformática.	20
3.2.1.4 - Manejo dos dados e montagem das sequências finais.....	21
3.2.1.5 - Identificação, anotação, organização e análise das sequências.	22
3.2.2 – Clonagem e sequenciamento de cDNA de metaloproteinase.	22
3.2.2.1 - Extração, análise do RNA total e síntese do cDNA.....	22
3.2.2.2 – Desenho dos <i>primers</i> e condições de PCR.	23
3.2.2.3 – Clonagem e sequenciamento.....	24
3.2.3 – Imunodetecção de metaloproteinase do veneno de <i>P. textilis</i>	26
3.2.3.1 - Cromatografia de afinidade.	26
3.2.3.2 – Imunodetecção de SVMP por Western Blot.	26
3.2.4 – Proteoma do veneno de <i>P. textilis</i>	27
3.2.4.1 – Eletroforese bidimensional.	27
3.2.4.2 – Digestão <i>in-gel</i> e espectrometria de massas dos peptídeos.....	28
3.2.4.3 – Identificação das toxinas por PEAKS e MASCOT.	29
3.2.5 - Bioinformática de análises complementares.....	30
3.2.5.1 – BLAST: identificação de sequências por similaridade.	30
3.2.5.2 – SignalP 4.1: detecção de peptídeo sinal.....	31
3.2.5.3 – InterProScan: detecção de domínios e classificação de proteínas.	31
3.2.5.4 – ORF finder: detecção de sequência codificante.....	32
3.2.5.5 – Alinhamento múltiplo de sequências.....	32
3.2.5.6 – Bancos de dados abertos como fonte de informações.....	32
4 – Resultados.	33

4.1 – Transcriptoma <i>de novo</i> de glândula de veneno de <i>P. textilis</i>	33
4.1.1 – Métrica dos dados brutos e da montagem dos <i>isotigs</i>	33
4.1.2 – Alinhamento, identificação e anotação.	35
4.1.3 - Transposons, microssatélites e íntrons de genes de toxinas.....	40
4.2 – Proteoma do veneno de <i>P. textilis</i>	41
4.2.1 – Identificação.....	43
4.3 – Imunodeteção de SVMP do veneno de <i>P. textilis</i>	48
4.4 – Clonagem de transcrito de SVMP.....	50
4.4.1 – Extração do RNA de glândula de veneno e síntese do cDNA.	50
4.4.2 – Clonagem e sequenciamento do transcrito de metaloproteinase.	51
5 – Discussão	53
5.1 – Complexo protrombinase de veneno: Fatores de coagulação Va e Xa.....	53
5.1.1 - Fator de coagulação Va.....	54
5.1.1.1 - Transcriptoma.	54
5.1.1.2 - Proteoma.....	55
5.1.2 - Fator de coagulação Xa.	57
5.1.2.1 - Transcriptoma.	57
5.1.2.2 - Proteoma.....	57
5.2 - Fosfolipases A2.....	58
5.2.1 – Transcriptoma.	59
5.2.2 - Proteoma.....	62
5.3 - Alfa-neurotoxinas da família das <i>three-finger toxins</i>	64
5.3.1 – Transcriptoma.	65
5.3.1.1 – Neurotoxinas curtas.	66
5.3.1.2 - Neurotoxinas longas.	67
5.3.1.3 - 3FTx não convencionais.	68
5.3.2 – Proteoma.....	69
5.3.3 - Considerações sobre a evolução das 3FTx.	69
5.4 – Peptídeos inibidores de serinoproteases S1 do tipo Kunitz e WAP.	71
5.4.1 - Inibidores monodomínio do tipo Kunitz: <i>Textilinin</i> e novas sequências.....	73
5.4.1.1 – Transcriptoma.	73
5.4.1.2 – Proteoma.....	76
5.4.2 - Inibidores de duplo-domínio do tipo Kunitz.	77
5.4.3 - Fragmentos de inibidores BPTI e evidência de triplo-domínio.	79

5.4.4 - Inibidores Kunitz-WAP.	80
5.4.5 - Waprin e isoformas.	84
5.4.6 - Considerações sobre a evolução dos peptídeos tipo Kunitz, WAP e KuWAP.	84
5.5 – Lectinas do tipo C.	85
5.5.1 – Transcriptoma.	86
5.5.2 – Proteoma.	90
5.6 – Cystein rich secretory protein: CRiSP.	90
5.6.1 - Transcriptoma.	91
5.6.2 – Proteoma.	91
5.7 – Metaloproteinases de veneno.	91
5.7.1 – Transcriptoma.	93
5.7.2 - Clonagem de um transcrito de SVMP.	94
5.7.3 - Proteômica, purificação e detecção de SVMP.	95
5.8 - Transcritos de interesse não identificados no veneno.	96
5.8.1 - Peptídeos natriuréticos.	96
5.8.2 – Cobra Venom Factor e o sistema complemento.	98
5.8.3 – Hialuronidase.	98
5.8.4 – Transferrina.	99
5.8.5 – Dipeptidilpeptidase-IV.	99
5.8.6 – Veficolin.	100
5.9 – Toxinas de lagartos do gênero <i>Heloderma</i>	101
5.10 - Proteínas de veneno candidatas a novas toxinas.	103
5.10.1 – Calreticulin.	103
5.10.2 - Dipeptidase 2	103
6 – Conclusões.	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
APÊNDICE 1.	123
APÊNDICE 2.	157

1 – Introdução.

Espécies peçonhentas tem sido uma fonte valiosa de descoberta de novas moléculas (Kurtović *et al.*, 2014; Barnwal e Kini, 2013; McCleary e Kini, 2012; Yang *et al.*, 2014). Alguns fármacos foram desenvolvidos com base em estudos de toxinas de veneno e já estão no mercado ou em desenvolvimento graças a importantes descobertas nesta área (From Venom to Drugs, Toxicon special edition, volume 59, issue 4, 2012). Esforços internacionais para descoberta de novas toxinas realçam a importância deste tipo de estudo: o consórcio de pesquisa Europeu Venomics (www.venomics.eu, último acesso 18 de fevereiro de 2014) tem um investimento estimado superior a nove milhões de Euros. A indústria farmacêutica mostra cada vez mais interesse na seletividade e potência de peptídeos finamente regulados pela evolução (TAB. 1) e movimentou 13 bilhões de dólares na venda de 60 fármacos derivados de peptídeos em 2010 (Thayer, 2011).

TABELA 1. Exemplos de fármacos derivados de peptídeos de veneno de serpentes. nAChR = receptores nicotínicos de acetilcolina. Tabela adaptada de Munawar (2013).

Fármaco	Fonte	Alvo molecular	Função/doença	Empresa
Alfimeprsa	<i>Agkistrodon contortrix</i>	Fibrina	Agente trombolítico e oclusão de cateter	Nuvelo Inc.
Contortrostratin	<i>Agkistrodon contortrix</i>	Integrina	Câncer de mama	Pivotal Biosciences/ University of California
Captopril	<i>Bothrops jararaca</i>	Enzima conversora de angiotensina (ACE)	Inibidores de ACE, anti-hipertensivo	Bristol-Myers Squibb
Aggrastat	<i>Echis carinatus</i>	inibidores de glicoproteína de plaqueta	Síndrome coronária aguda, isquemia refratária	Merck
Viprinex (Ancrod)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	inibidor de fibrinogênio	Trombocitopenia induzida por heparina	Neurobiological Industries
Exanta; ximelagatran	<i>Naja spp.</i>	inibidores de trombina	Fibrilação atrial e coagulação sanguínea pós-operatória	AstraZeneca
Cenderitide	<i>Dendroaspis angusticeps</i>	receptores de peptídeos natriuréticos	Insuficiência cardíaca congestiva	Nile Therapeutics
RPI-MN (α-cobrotoxin)	<i>Naja spp.</i>	nAChR	HIV	ReceptoPharm
RPI-78 (α-cobrotoxin)	<i>Naja spp.</i>	nAChR	Esclerose múltipla	ReceptoPharm

O veneno de serpentes é uma secreção multifuncional, produzido por glândulas especializadas localizadas na cabeça, composta por uma rica diversidade de proteínas e peptídeos bioativos que interagem na homeostase da presa atuando de forma sofisticada em sua paralização, morte e/ou digestão (Stocker, 1990). Para as espécies de serpentes venenosas, ele é uma arma fundamental de ataque ou defesa sob constante pressão da seleção natural (Sunagar *et al.*, 2013; Jackson *et al.*, 2013; Barlow *et al.*, 2009). A evolução molecular acelerada de seus genes caracterizada por sucessivas duplicações e alta taxa de acúmulo de mutações, faz com que novidades sempre sejam encontradas tanto na composição de famílias de toxinas nos venenos quanto em suas sequências, estruturas e funções, gerando uma grande diversidade molecular (Jackson *et al.*, 2013; Casewell *et al.*, 2012; Ohno *et al.*, 1998; Calvete *et al.*, 2005; Reza *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 1993). Como observado em diversos níveis biológicos, desde espécies próximas a subespécies, populações e até indivíduos, pode haver micro ou macrovariações na composição do veneno (Mackessy, 2009). Diversas toxinas com sequências similares podem apresentar características e funções diferentes (Mora-Obando *et al.*, 2013; Lomonte *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2013). Esta diversidade de moléculas se reflete em uma diversidade de tipos, formas, funções que interferem na homeostase da presa, permitindo a descoberta de vias alternativas de estudos sobre processos biológicos e fisiológicos comuns (McCleary e Kini, 2013; Georgieva *et al.*, 2008; Cidade *et al.*, 2006; Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2006).

O conhecimento detalhado da composição e modos de ação das diversas toxinas é importante para o tratamento eficaz de acidentes ofídicos (Wagstaff *et al.*, 2009; Georgieva *et al.*, 2008). Os acidentes com mordidas e envenenamento por serpentes são um problema mundial de saúde pública em muitos países tropicais e subtropicais. Kasturiratne e colaboradores (2008) estimaram que pelo menos 421.000 envenenamentos e 20.000 mortes ocorrem anualmente causados por acidentes ofídicos. Além de investimentos em esforços políticos e sociais para aperfeiçoar a distribuição e o uso eficaz dos soros antiofídicos, é importante aperfeiçoar o desenvolvimento de fármacos e de tratamentos para atender as vítimas destes acidentes (Dr. José María

Gutiérrez, comunicação pessoal). O tratamento adequado do envenenamento por serpentes é criticamente dependente da habilidade dos soros em inibir e reverter a ação anti-homeostática induzida pelo veneno. As toxinas mais conhecidas interferem principalmente na coagulação, na pressão sanguínea, nos impulsos nervosos, na adesão celular e na contração muscular (Mackessy, 2009). Diversas tecnologias têm sido exploradas para desenvolver soros venenos-específicos que aumentem a eficácia dose-resposta e reversão de patologias ainda desconhecidas.

Tecnicamente, o esforço em descrever os constituintes do veneno é geralmente direcionado apenas no isolamento de toxinas proteicas responsáveis por atividades largamente conhecidas, ou na clonagem de genes individuais, o que reduz as chances de encontrar constituintes atípicos ou desconhecidos (Pahari *et al.*, 2007; Cidade *et al.*, 2006) e que podem ter uma relevância clínica. Nenhuma destas abordagens é bem sucedida em detectar toxinas que são encontradas em pequenas quantidades. A ausência aparente de uma família particular de toxinas em um determinado veneno poderia ser explicada tanto pela sua pequena quantidade ou pela falta de sua expressão na glândula de veneno. Toxinas proteicas também são descobertas pelo estudo dos genes expressos nas glândulas de veneno. Dentre os métodos atuais mais eficientes na identificação e descoberta de toxinas, incluindo aquelas expressas em baixa quantidade, destaca-se a análise combinada em larga escala do transcriptoma *de novo* da glândula de veneno com o proteoma do seu veneno por espectrometria de massas, também conhecida como venômica (e.g. Margres *et al.*, 2013; Abdel-Rahman *et al.*, 2013; Calvete, 2013; Rodrigues *et al.*, 2012; Ching *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2011).

As técnicas de sequenciamento massivo de nucleotídeos em paralelo, também conhecidas como sequenciamento de nova geração, permitem obter bibliotecas de mRNA *de novo*, sem a necessidade das etapas clássicas de clonagem heteróloga dos genes e sequenciamento de ESTs. A escolha da plataforma de sequenciamento mais adequada é complexa e estudos, como por exemplo, os de Kim *et al.* (2014), Glenn (2011) e Harrison e Kidner (2011), compararam estas tecnologias e seus custos para ajudar nas escolhas. Comparando-se as novas tecnologias com a técnica clássica

desenvolvida por Sanger *et al.* (1977), ainda ideal para sequenciamento de clones, observa-se uma queda vertiginosa do custo por megabase (Mb) e um aumento no rendimento (Mb por corrida). A técnica do pirosequenciamento (e.g. 454 Roche) pode render em uma única corrida em torno de 700 Mb com 600 a 800 pares de bases (pb) por sequência, sendo indicado para transcriptoma *de novo* de organismos de genoma desconhecido por gerar sequências maiores (Dr. Eduardo Reis, comunicação pessoal; Durban *et al.*, 2011). Outras plataformas como Illumina®, Ion Torrent™ (Life Technologies) e SOLiD™ (Life Technologies), geram sequências pequenas (de 50 a 150 pb) porém com rendimento muito superior (até 200 gigabases (Gb) por corrida) e uma taxa de erro significativamente menor que o pirosequenciamento, sendo indicadas principalmente para detecção de mutações pontuais (SNP). A plataforma PacBio™ (Pacific Bioscience), chamada de 3ª geração, permite a geração de leituras muito grandes de aproximadamente 1000 pb e com ótima qualidade, porém seu uso em transcriptoma *de novo* ainda não foi bem estabelecido. Dependendo da metodologia empregada e dos recursos investidos, os dados gerados podem cobrir completamente a sequência dos genes expressos com excelente qualidade. A escolha de qual plataforma a ser usada depende de objetivos específicos, disponibilidade dos equipamentos, tempo e orçamento de execução. A análise do transcriptoma da glândula de veneno por similaridade com proteínas, transcritos e genes já descritos, permite identificar dentre milhares de transcritos as toxinas e suas mutações. No transcriptoma identificam-se também os produtos gênicos da glândula envolvidos no ciclo celular, na regulação da expressão gênica e na secreção das toxinas. Finalmente, após os transcritos serem montados e identificados, as sequências são anotadas e as toxinas identificadas e suas variantes analisadas e discutidas. O transcriptoma é uma poderosa ferramenta na descoberta de novas toxinas e variantes, porém não é suficiente para a identificação das toxinas presentes no veneno já que nem todo transcrito é necessariamente traduzido em proteína e as toxinas podem sofrer modificações pós-traducionais, importantes para sua toxicidade. Sendo assim, a análise das proteínas presentes no veneno é complementar ao transcriptoma.

Com o progresso das técnicas de espectrometria de massa (MS) para análise proteica, os estudos de proteoma de veneno por identificação de peptídeos em bancos de dados se tornaram recorrentes e permitem uma análise mais completa das proteínas em relação ao estudo convencional da composição dos venenos (e.g. Madrigal *et al.*, 2012; Villalta *et al.*, 2012; Calvete *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012; Kohlhoff *et al.*, 2012). O sequenciamento *de novo* em larga escala de peptídeos derivados de proteínas ainda é um gargalo tecnológico no estudo da diversidade de proteínas desconhecidas ou pouco estudadas. Sendo assim, a identificação de toxinas por comparação de perfis de MS/MS (MS^2) em bancos de dados ainda tem melhor relação custo/benefício. De maneira resumida, para cada amostra um espectro de massas é gerado (MS^1), dentro dos quais são eleitos os peptídeos com os melhores padrões de ionização, subsequentemente refragmentados, por CID ou ETD, para obtenção do espectro de massas dos íons filhos (MS^2) (Westermeyer *et al.*, 2008). O conjunto de informações gerado permite identificar as proteínas presentes nas frações analisadas por meio do uso de programas como MASCOT (www.matrixscience.com) e PEAKS (www.bioinform.com). Estes programas comparam o padrão de fragmentação dos peptídeos com o padrão de fragmentação *in silico* de bancos de dados (e.g. NCBI+SwissProt) (St. Pierre *et al.*, 2007a). Neste ponto, agregar ao banco de dados público o transcriptoma de glândula de veneno espécie-específico é ideal para suprir lacunas de toxinas e variantes ainda desconhecidas e aprimorar os resultados de identificação.

Estudos de venômica proporcionam oportunidades ímpares de encontrar moléculas ainda não estudadas, provendo dados e informações sobre a verdadeira diversidade da composição dos venenos, eventualmente levando à descoberta de novas famílias de toxinas ((Pahari *et al.*, 2007; Cidade *et al.*, 2006; Junqueira-de-Azevedo *et al.*, 2006; Fry *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2012; OmPraba *et al.*, 2010). Desta forma, o estudo do “toxinoma” de serpentes está se expandindo rapidamente. Todos os dados gerados são importantes nos estudos dos processos evolutivos das diferentes espécies de serpentes (Jackson *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2005).

A espécie *Pseudonaja textilis*, objeto de estudo deste trabalho, é popularmente conhecida como *eastern brown snake* e tem ampla distribuição no leste da Austrália (FIG. 1). Ela teve uma boa adaptação às mudanças antropogênicas provocadas em seu habitat e se tornou a causa mais comum de acidentes ofídicos da Austrália (Williams *et al.*, 2008; Madaras *et al.*, 2005). Um estudo clínico sistemático com mais de cem casos de acidentes com *Pseudonaja* (Allen *et al.*, 2012) revelou que a coagulopatia de consumo induzida por veneno ocorreu total ou parcialmente em todos os casos, que quadros de neurotoxicidade foram brandos e raros e que não foi observada miotoxicidade. Os efeitos vasculares foram comuns sendo que o colapso hipotensivo ocorreu em mais de um quarto dos pacientes (Allen *et al.*, 2012). O registro mais recente na literatura de morte por acidentes ofídicos na Austrália mostra que entre 1992 e 1994, seis das 12 mortes atribuídas a acidentes ofídicos foram causadas por serpentes do gênero *Pseudonaja* (Sutherland e Leonard, 1995). Um dos primeiros estudos sobre os efeitos de seu veneno foi publicado em 1971 (Shapel *et al.*) e os primeiros soros antiofídicos começaram a ser fabricados comercialmente em 1958 na Austrália (Winkel *et al.*, 2006). Na última década, novos soros mais eficazes foram testados (Madaras *et al.*, 2005). Seu veneno é considerado o segundo mais tóxico do mundo, e apesar de ter ação procoagulante predominante (Chester e Crawford, 1982), a alta neurotoxicidade característica da família das Elapidae não pode ser ignorada. A neurotoxina pré-sináptica conhecida como *textilotoxin* (Su *et al.*, 1983) é considerada a mais potente já isolada de serpentes terrestres e representa 3% do peso do veneno e 70% de sua letalidade total (Birrell *et al.*, 2006). Em um aparente paradoxo, humanos picados por *Pseudonaja textilis* não desenvolvem quadro de neurotoxicidade, assim como ocorre com a serpente *Oxyuranus scutellatus scutellatus* que apresenta uma toxina homóloga, a *taipoxin*. Este paradoxo pode ser explicado por razões como menor potência da *textilotoxin* em relação à *taipoxin* e menor quantidade de veneno inoculado pela *Pseudonaja textilis* (Barber *et al.*, 2012).

As toxinas descritas em seu veneno são (1) neurotoxinas (Harris e Maltin, 1981) como as fosfolipases A2 (PLA2) componentes da *textilotoxin* (Su *et al.*, 1983, Tyler *et al.*, 1987) e as alpha-neurotoxinas pós-sinápticas do tipo

Three-finger toxin (3FTx) (Gong *et al.*, 1999), (2) pró-coagulantes (Chester e Crawford, 1982) como o complexo protrombinase (VF5a+VF10a) (Masci *et al.*, 1988; Rao e Kini, 2002) e (3) inibidores de proteases do tipo Kunitz como a *textilinin* (Masci *et al.*, 2000).

FIGURA 1. Serpente *Pseudonaja textilis* (Elapidae) endêmica da Austrália e sua distribuição segundo a *World Health Organization* (<http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/snakeframeset.html>, último acesso em abril de 2014). Créditos: Roger Lowe (fotografia da direita).

Um estudo do Centro de Biotecnologia do IPEN detectou, por ensaio de imunoreatividade, metaloproteinases no veneno de Elapidae, incluindo o veneno de *P. textilis* (Spencer, comunicação pessoal). Esta família de toxina é bem caracterizada em Viperidae e pouco conhecida em Elapidae, evidenciando a necessidade de se aprofundar no conhecimento detalhado

deste veneno. Estudos recentes em Elapidae revelaram uma grande diversidade de transcritos que codificam toxinas (Jackson *et al.*, 2013; Margres *et al.*, 2013; St. Pierre *et al.*, 2008). Até hoje a maioria das pesquisas com o veneno de *P. textilis* focaram principalmente em elucidar as relações entre os componentes majoritários do veneno (em quantidade e potência) e os principais sintomas observáveis em acidentes. A diversidade de isoformas e variantes deve ser descrita para melhor entender a clínica do envenenamento, relações específicas entre presa-predador e fornecer informações para elucidar a recente e dinâmica história evolutiva das serpentes e dos répteis venenosos.

O presente trabalho visou investigar mais a fundo o veneno de *Pseudonaja textilis* ao combinar as técnicas de transcriptômica e proteômica, contribuindo assim com um melhor entendimento de sua diversidade genética, da sua composição proteica, dos efeitos nas presas e de sua evolução.

2 – Objetivos.

- Obter o transcriptoma normalizado da glândula de veneno de *Pseudonaja textilis*.
 - Identificar toxinas, variantes e isoformas.
 - Analisar as relações entre os transcritos de toxinas semelhantes.
 - Anotar, organizar e gerar um banco de dados de transcritos para análise proteômica.
- Obter o proteoma do veneno de *P. textilis*.
 - Identificar toxinas, variantes e isoformas.
 - Analisar a composição do veneno.
 - Se possível, identificar candidatos a novas toxinas.
- Clonar e sequenciar transcritos de metaloproteinases da glândula de veneno de *P. textilis*.
- Detectar por imunoreatividade cruzada metaloproteinase no veneno de *P. textilis*.
- Gerar dados que contribuam nos estudos de prospecção de fármacos, de produção de soro mais eficazes, de biologia da espécie, de evolução das serpentes venenosas e de suas toxinas.

3 – Materiais e métodos.

3.1 – Materiais.

3.1.1 – Glândulas de veneno de *Pseudonaja textilis*.

Um par de glândulas de veneno, com aproximadamente 300 mg cada, de um indivíduo macho de Barossa Valley, região de Adelaide, no Sul da Austrália, foi gentilmente cedido pelo Sr. Peter John Mirtschin, (Venom Supplies Pty. Ltd., Austrália). Após três dias da ordenha da peçonha, quando ocorre um pico de produção de veneno (Kochva, 1987), o animal foi eutanasiado e suas glândulas de veneno imediatamente estocadas em *RNA Later*TM (Qiagen) e congeladas para prevenir a degradação dos mRNAs. A remoção e importação das glândulas de veneno seguiram todos os procedimentos legais dos governos de ambos os países.

3.1.2 – Amostra de veneno total de *P. textilis*.

O veneno total é oriundo de um pool de indivíduos de cativeiro, de ambos os sexos, fornecido pela Venom Supplies Pty. Ltd. A criação dos animais e coleta e distribuição do veneno seguem procedimentos padronizados para fornecimento de amostras a laboratórios de pesquisa privados e públicos. O veneno liofilizado e congelado a -20°C foi ressuspendido em tampão adequado antes das análises.

3.2 - Métodos.

3.2.1 - Transcriptoma *de novo* de glândula de veneno de *P. textilis*.

O transcriptoma foi obtido pelo método em larga escala de pirosequenciamento, usando 1/16 da plataforma 454-GS FLX (Roche). O uso desta metodologia se mostrou mais viável técnica e financeiramente do que a técnica clássica disponível de clonagem e sequenciamento de EST pelo método de Sanger. O pirosequenciamento em larga escala permite a leitura simultânea de centenas de milhares de sequências sem a necessidade de clonagem heteróloga dos transcritos.

Após uma análise minuciosa de relação custo/benefício, foi contratado o serviço de sequenciamento de transcriptoma *de novo* da empresa Alemã GATC Biotech (Konstanz). O procedimento rotineiro e padronizado incluiu todas as etapas desde extração do RNA total da glândula até a montagem bioinformática das sequências, (Edwards *et al.*, 2012; Parchman *et al.*, 2010; Kristiansson *et al.*, 2009; Sambrook e Russell, 2001; Soares *et al.*, 1994).

Certas limitações tecnológicas não permitem o sequenciamento completo dos transcritos. Para superar esta limitação e obter as sequências completas dos transcritos foi utilizada a estratégia *shotgun*. Inicialmente desenvolvido para sequenciamento de genomas, o *shotgun* foi adaptado para transcriptoma e consiste na construção de uma biblioteca amplificada de cDNAs fragmentados, em posições aleatórias, no tamanho adequado e em grande quantidade (Head *et al.*, 2014). Neste projeto foram utilizados *primers* randômicos N6, que permitem a síntese de cDNAs iniciados a partir de posições aleatórias dos transcritos. Consequentemente, por meio de algoritmos específicos desenvolvidos para transcriptoma *de novo* (e.g. Oases, Trans-ABYSS, Trinity), é possível inferir estatisticamente a sequência dos transcritos originais por montagem das sequências (alinhamento e fusão de sequências sobrepostas) (Góngora-Castillo e Buell, 2013).

3.2.1.1 - Obtenção da biblioteca normalizada de cDNA.

O RNA total extraído da glândula de veneno foi manuseado em ambiente livre de RNases (Sambrook e Russel, 2001). Os RNAm tem uma cauda poli-adenina (poli-A) em seu terminal 3', característica singular que permite o seu isolamento dos outros tipos (RNAt, RNAr, etc.) usando sondas de oligonucleotídeos de timina (poli-T), complementares à cauda poli-A. Após o enriquecimento da amostra em RNAm, a primeira fita de cDNA complementar aos RNAm foi sintetizada com uso de *primers* hexâmeros randômicos N6 e enzima transcriptase reversa (Head *et al.*, 2014). Em seguida, os cDNA dupla-fita foram obtidos por ligação de adaptadores, específicos para plataforma Roche GS-FLX, e subsequente amplificação da segunda fita com enzima DNA polimerase *proof-reading*. A biblioteca de cDNA foi normalizada com intuito de obter maior representatividade dos transcritos raros da glândula de veneno. As moléculas de cDNA dupla fita foram submetidas a um ciclo térmico de denaturação e renaturação, no qual os cDNA derivados de transcritos presentes em menor proporção no tecido terão menos chances de se renaturar em dupla fita. A normalização da biblioteca foi então obtida ao separar as moléculas renaturadas em dupla fita daquelas simples fita por cromatografia em hidroxiapatita. Após seu isolamento por cromatografia, as moléculas de cDNA simples fita foram amplificadas por PCR e a amostra resultante foi utilizada para o sequenciamento.

3.2.1.2 - Pirosequenciamento

O sequenciamento foi efetuado em 1/16 de placa da plataforma GS FLX Titanium (Roche) segundo as orientações do fabricante. Esta técnica de nova geração se baseia em diferentes princípios e tecnologias. Primeiramente, o PCR por emulsão (emPCR) permite isolar e amplificar individualmente as molécula de cDNA em microesferas metálicas. Estas esferas têm em sua superfície oligonucleotídeos ligados covalentemente, cuja sequência é complementar ao adaptador integrado nos cDNAs. Pelo emPCR é possível multiplicar em cada esfera a sequência de uma única molécula de cDNA. Em seguida, a solução com as esferas é aplicada sobre uma placa de microporos

de tamanho único e com distribuição homogênea. Estes poros têm o tamanho suficiente para conter apenas uma esfera. A sequência dos cDNAs é detectada para cada esfera em sucessivos ciclos de síntese por DNA polimerase. Cada ciclo consiste na lavagem da placa com um tipo apenas de nucleotídeo livre (A, C, T ou G), que será incorporado na extremidade 3' livre da fita sendo sintetizada, quando houver complementariedade à sequência original. Cada vez que um nucleotídeo for incorporado na fita sintética, o ATP liberado ativa a reação de clivagem da luciferina pela luciferase, emitindo luz, detectada por um sistema de captura de imagem de alta resolução. Finalmente, a obtenção de cada sequência ocorre pela associação de cada evento de emissão de luz para cada ciclo correspondente a um nucleotídeo em cada microporo, correspondendo a uma única molécula de cDNA. Finalmente, os dados brutos do sequenciamento são processados, filtrados e arquivos são gerados contendo as sequências e informações importantes como qualidade, coordenadas, tamanho, taxas de erro, etc.

3.2.1.3 - Análise bioinformática.

Esta metodologia de pirosequenciamento permite a obtenção de milhares de sequências de nucleotídeos, chamadas de *reads*. A principal diferença em relação ao método clássico de sequenciamento de ESTs por Sanger é que as sequências geradas foram obtidas de múltiplas regiões de um mesmo transcrito pelo uso de *primers* randômicos N6 ao invés de somente sequências das extremidades 5' e 3' das moléculas de RNAm. Usando algoritmos adequados e com testes estatísticos rigorosos para diminuir taxas de erros e resultados falso-positivos, as sequências originais dos transcritos são deduzidas por agrupamento de *reads* que apresentem sobreposição (Head *et al.*, 2014). Após a obtenção dos dados brutos de sequenciamento, os dados foram filtrados e manipulados no software Newbler (Roche) específico para esta plataforma, de forma semiautomática.

3.2.1.4 - Manejo dos dados e montagem das sequências finais.

O programa Newbler™, adaptado para análises do GS-FLX 454™ (ROCHE), foi utilizado pela empresa GATC® na análise semiautomática inicial contratada. Os dados brutos obtidos pelo sequenciador foram filtrados para executar os próximos passos de análise. Inicialmente os *reads* com *scores* (pontuação de qualidade) insuficientes para montagem das sequências foram eliminados. Em seguida, foram retiradas dos *reads* as sequências dos adaptadores utilizados para o sequenciamento e que não fazem parte dos transcritos. Os *reads* foram submetidos a sucessivas etapas de alinhamento e sobreposição, a partir de parâmetros rigorosos e adequados. Os *reads* foram alinhados e sobrepostos para formar *contigs*, subsequentemente grupos de *contigs* em *isotigs*. *Isotigs* similares, contendo um mesmo conjunto de *contigs*, foram agrupados em *isogroups*. Ou seja, cada *isotig* de um mesmo *isogroup* equivale a uma variante de transcrição de um gene e seus *contigs* equivalem a *exons* de um mesmo gene (FIG. 2). Finalmente, aqueles *reads* que não tem sequência que se sobreponha a outros *reads* são chamados de *singletons*. Os *isotigs* e *singletons* foram utilizados na análise comparativa em bancos de dados para identificação (BLAST).

FIGURA 2: Relação entre *contigs*, *isotigs* e *isogroups*. Extraído de <http://contig.wordpress.com> em 4/2/2014. Autor da figura desconhecido.

3.2.1.5 - Identificação, anotação, organização e análise das sequências.

Para identificação dos *singletons* e *isotigs* gerados foi utilizado o programa Blast2Go (Conesa *et al.*, 2005; Götz *et al.*, 2008) que permite automatizar o uso do algoritmo BLAST de identificação de sequências em bancos de dados públicos. As sequências também foram anotadas automaticamente pelo programa para indicar a provável família de proteína, provável função biológica, tamanho da sequência, etc. Todas as etapas automáticas foram seguidas de uma análise manual criteriosa das sequências de interesse para detectar possíveis erros e efetuar as correções necessárias.

Finalmente, após checar a anotação das sequências, elas foram ordenadas e separadas em quatro grupos principais de acordo com os resultados da identificação e anotação das sequências: (1) toxinas, (2) possíveis toxinas, (3) funções celulares e (4) desconhecidos. É importante lembrar que não houve análise quantitativa da expressão gênica dos transcritos identificados já que a biblioteca foi normalizada e a quantidade de transcritos presentes no transcriptoma não reflete mais a proporção de transcritos nas células da glândula. As sequências anotadas foram formatadas em FASTA para incorporação no banco de dados utilizado na análise do proteoma do veneno da *P. textilis*.

3.2.2 – Clonagem e sequenciamento de cDNA de metaloproteinase.

3.2.2.1 - Extração, análise do RNA total e síntese do cDNA.

O RNA total de uma glândula de veneno foi extraído em um ambiente livre de RNases (Sambrook e Russel, 2001). Para reduzir ao máximo o risco de contaminação das amostras com RNases toda água utilizada nas etapas de manuseio do RNA foi tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) 0,1%, agitada por 12 horas e autoclavada. As vidrarias utilizadas nas etapas de manejo de RNA foram incubadas em NaOH (0,5 M) e enxaguadas com água deionizada logo antes do uso (Sambrook e Russel, 2001). Para extrair o RNA total da glândula, foi utilizado Trizol[®] (Life Technologies), de acordo com as

especificações do fabricante. A glândula foi dividida em três porções iguais com aproximadamente 100 mg cada e cada porção foi triturada em 1 mL de Trizol com pistilo em um triturador de tecidos de vidro banhado em nitrogênio líquido. O RNA total foi ressuspenso em 50 µL de H₂O DEPC. Um controle de extração de RNA foi efetuado com apenas água-DEPC usada na extração do RNA da glândula.

Cinco microlitros do RNA total e 10 µL do controle negativo foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio a 100 V por 45 min. O resultado foi visualizado e fotodocumentado em um transluminador de luz UV.

A amostra foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e o cDNA sintetizado e purificado utilizando o *In-Fusion SMARTer cDNA Library Construction Kit* (Clontech), de acordo com as instruções do fabricante. Este kit permite sintetizar cDNA por transcrição reversa diretamente da amostra de RNA total com *primers* poli-T complementares às caudas poli-A dos RNAm. Para garantir o sucesso da metodologia de síntese, a qualidade das amostras foram analisadas entre algumas etapas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio sob luz UV.

3.2.2.2 – Desenho dos *primers* e condições de PCR.

Os *primers* para clonagem de transcritos de metaloproteinases dos cDNAs de glândula de veneno da *Pseudonaja textilis* foram desenhados para ancorar nas regiões não traduzidas (UTR). Devido a altas taxas de mutações inerentes a evolução acelerada e à neofuncionalização das toxinas de serpentes, as UTRs são muitas vezes mais conservadas que as regiões codificantes (CDS) (Ogawa *et al.*, 1992). Sendo assim, haveria maior probabilidade de clonagem dos genes de sequência desconhecida. Sequências de metaloproteinases de espécies de Elapidae, Colubridae e Viperidae disponíveis no GenBank (NCBI) foram selecionadas e as regiões 3' UTR, 5' UTR e CDS foram detectadas usando a ferramenta ORFfinder (NCBI). Após confirmação do CDS por BLASTx (NCBI), as diferentes regiões foram

separadas e alinhadas. Os alinhamentos foram checados no programa BioEdit e possíveis erros foram corrigidos manualmente. As regiões mais conservadas das UTRs foram utilizadas como molde para o desenho dos *primers* e suas propriedades teóricas (*Tm*, *5GC*, *hairpin*, *self-complement* e outros) testadas *in silico* usando principalmente o programa *Primer3*, entre outros disponíveis on-line (<http://molbioltools.ca/PCR.htm>). Dentre os possíveis *primers* desenhados foram escolhidos o 5'UTR (5'-TTGGAAGCAGAAAGAGATTC-3') e o 3'UTR (5'-GTAGGATAAAGACAGATGGG-3'). Reações de PCR foram feitas com o cDNA de *P. textilis*, mas também com cDNA de *Bothrops erythromelas* conhecida por secretar grande quantidade de metaloproteinase hemorrágica no veneno, testando assim a possibilidade de utilizá-los como *primers* universais para diversas famílias. A PCR seguiu inicialmente as condições do fabricante da DNA polimerase (Biotools) e da *Tm* teórica, sendo em seguida adaptada para obter melhores resultados com modificações no volume da reação, na quantidade de cDNA, no tempo de extensão, na temperatura de anelamento e na quantidade de ciclos. A padronização resultou nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5min seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30s, 51°C por 30s e 72°C por 2min, e finalmente um ciclo de 72°C por 5min. As reações de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V em tampão TAE 1X, frente ao marcador molecular λ HindIII (Fermentas). Os géis corados com brometo de etídio foram visualizados sob luz U.V. e fotodocumentados com aparelho digital.

Um *primer* adicional Ptint1F (5'-ACTTCGGAGTCAGATGAGCC-3') foi desenhado de acordo com os resultados do sequenciamento por M13 para obter a porção interna da sequência de SVMP de interesse.

3.2.2.3 – Clonagem e sequenciamento.

Os fragmentos amplificados foram recortados do gel e o DNA extraído com o *DNA gel extraction kit* (Norgenbiotek), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, os fragmentos purificados foram inseridos em plasmídeo pGEM-Teasy (Promega) com T4 Ligase, de acordo com a metodologia do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram então

clonados em células de *E. coli* DH5 α (New England Biolabs) eletrocompetentes por eletroporação em cubetas de 1 mm a 1500 V, 25 W e 25 mA. Após crescimento por uma hora sob agitação (150 rpm) a 37°C em meio líquido LB, as células transformadas foram cultivadas por 16 h a 37°C em placas de cultivo com meio seletivo com ampicilina (100 μ g/mL), contendo X-Gal (20 mg/mL) e IPTG (20%) para seleção azul-branco de colônias recombinantes. As colônias positivas (cor branca) e isoladas foram coletadas e inoculadas em 10 mL de meio de cultura seletivo LB/Ampicilina em tubos estéreis sob agitação (150 rpm) por 16h a 37°C. Os plasmídeos de cada cultura foram então extraídos de 4 a 6 mL de meio de cultura usando o *QIAprep Spin Miniprep kit* (Qiagen). Para avaliar corretamente o tamanho dos plasmídeos por eletroforese, foi necessário linearizá-los com enzimas de restrição já que estão presentes na amostra em diferentes formas de condensação (*coiled*, *supercoiled* e *nicked*), promovendo um deslocamento da migração em relação ao marcador de peso molecular. A enzima de restrição EcoRI cliva o plasmídeo pGEM-Teasy em dois pontos, um em cada região flanqueadora do sítio de inserção. Logo, após a digestão com EcoRI espera-se obter, após eletroforese, a migração de duas bandas, sendo uma de 3Kb relativa ao plasmídeo e outra do tamanho do fragmento de DNA clonado. As amostras foram digeridas com EcoRI (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante e o tamanho dos plasmídeos recombinantes e a qualidade da extração foram avaliados após eletroforese em gel de agarose (1%) a 100V em tampão TAE1X, frente ao marcador molecular λ HindIII (Fermentas). Os géis corados com brometo de etídio foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados com aparelho digital.

Após análise, as amostras de interesse foram quantificadas por espectrofotometria e sequenciadas pelo Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP em um ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) pelo método de Sanger usando os *primers* universais de sequenciamento *M13 forward* e *M13 reverse*. Após a identificação do clone como SVMF, foi feito o sequenciamento com o *primer* Ptint1F. Os eletroferogramas do sequenciamento foram analisados e as porções pouco informativas e não significativas (*Quality Value* > 20) das sequências foram automaticamente eliminadas pelo software Sequence Scanner v.2 (Applied

Biosystems). As sequências dos vetores foram excluídas usando a ferramenta VecScreen (NCBI) e as sequências resultantes identificadas e alinhadas por BLAST (NCBI).

3.2.3 – Imunodeteção de metaloproteinase do veneno de *P. textilis*.

3.2.3.1 - Cromatografia de afinidade.

Na cromatografia de afinidade são utilizadas resinas que apresentam características específicas como afinidade pela proteína de interesse a ser isolada dos demais componentes do veneno bruto. Para o isolamento das metaloproteinases de veneno (SVMP), enzimas dependentes de íon metálico, optou-se pela estratégia de afinidade ao metal. O fracionamento foi realizado com 15 mg de veneno total dissolvido em 1,2 mL de tampão fosfato (PBS), pH 7,4. Após centrifugação, 500µL do sobrenadante límpido foi injetado em uma coluna de afinidade HisTrap HP™ (GE Healthcare) carregada com Zn²⁺. Como tampão de adsorção, foi usado PBS, pH 7,4 (Tampão A) e, para eluição, foi realizado um gradiente de 0 a 100% de imidazol 100 mM pH 7,4 (Tampão B) que compete gradativamente pelo sítio de afinidade a metal das proteínas. O fluxo foi mantido em 1 mL/minuto e a absorbância do eluato foi monitorada a 280 nm. A composição molecular das frações coletadas foi analisada visualmente por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% a 90 V, corado com *coomassie blue*.

3.2.3.2 – Imunodeteção de SVMP por Western Blot.

As proteínas coletadas na cromatografia de afinidade foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE 15% e em seguida foram transferidas em membrana de nitrocelulose durante 1 hora sob corrente de 0,85 mA/cm². Para realizar a transferência foi utilizado um tampão contendo 192 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,037% de SDS (Sodium Dodecil Sulphate) e 10% de metanol, pH 8,3. Após a lavagem com PBS, a membrana foi incubada durante uma hora com solução de bloqueio contendo 5% de leite, desnatado (Molico,

Nestlé). Posteriormente, a membrana foi incubada, *overnight* a 4°C, em solução de anticorpo primário policlonal de coelho anti-jararagina, gentilmente cedido pela Dra. Splendore Della Casa (Instituto Butantan/SP), na diluição 1:5000. Após a lavagem da membrana com PBS, ela foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:5000). Para a revelação, utilizou-se 25 µL de peróxido de hidrogênio 30% e 10 mg de DAB (Diaminobenzidina) diluídos em 50 mL de PBS.

3.2.4 – Proteoma do veneno de *P. textilis*.

Os dados do proteoma foram gerados pela estratégia de identificação de toxinas por espectrometria de massas do produto de digestão dos *spots* separados por eletroforese em poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE).

3.2.4.1 – Eletroforese bidimensional.

A 2D-PAGE foi efetuada pela empresa Proteome Factory (Hamburg, Alemanha) conforme protocolo descrito a seguir. O veneno total foi dissolvido em uréia 9M, anfólitos 2% e DTT 70 mM. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 15000g por 45 minutos, o sobrenadante foi removido e congelado em novos tubos a -80°C. Foi aplicado 100 µg de proteína ao gel da primeira dimensão (uréia 9M, acrilamida 4%, PDA 0,3%, glicerol 5%, TEMED 0,06% e anfólitos de carregamento 2% pH 2 – 1, APS 0,02%) para focalização isoeletrica a 8820Vh, separando assim as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico. Após a focalização, o gel foi incubado em tampão, contendo tris-fosfato 125 mM pH 6,8, glicerol 40%, DTT 65 mM e SDS 3% por 10 minutos e subsequentemente congelado a -80°C. O gel de segunda dimensão SDS-PAGE (20cm X 30cm X 0,1cm) foi preparado com tampão Tris-HCl 375mM pH 8,8, acrilamida 12%, bisacrilamida 0,2%, SDS 0,1% e TEMED 0,03%. Após o descongelamento, o gel da primeira dimensão foi imediatamente inserido na parte superior do SDS-PAGE. A eletroforese foi efetuada com aumento de corrente em duas etapas, começando com 15 minutos a 65mA seguido de uma corrida de 6h a 140mA até o traçador (azul de

bromofenol) alcançar o final do gel. Após a corrida o gel foi corado com nitrato de prata para massa (Simpson, 2002).

3.2.4.2 – Digestão *in-gel* e espectrometria de massas dos peptídeos.

As toxinas de veneno de serpente apresentam um padrão de migração característico em géis 2D devido a suas modificações pós-traducionais, formando grupos de *spots*. Os *spots* analisados foram selecionados em diversas regiões do gel para cobrir o máximo possível de tamanhos e *pI* diferentes, cobrindo assim o maior espectro de toxinas presentes no veneno. A coleta foi manual em ambiente estéril seguindo normas de espectrometria de massas para evitar contaminações nas análises, e.g. queratina humana. Os *spots* coletados foram digeridos com tripsina modificada (Promega) em 20 µL de solução de digestão (Tripsina 5 ng/µL; NH₄CO₃ 50 mM; acetonitrila 10%) overnight a 37°C. As reações de digestão foram interrompidas com 1 µL de ácido fórmico (FA) 5% e o sobrenadante contendo os peptídeos foi coletado em uma primeira etapa com 50 µL de acetonitrila (ACN) 75% + FA 5% e em seguida com 20 µL de ACN 100%. As amostras de peptídeos foram secadas em centrífuga a vácuo, e estocadas a -20°C até sua análise.

A identificação das proteínas prosseguiu por cromatografia líquida seguida de ionização eletrospray e espectrômetro de massa *Ion Trap (LC-ESI-ion trap)*, de acordo com o protocolo padronizado no laboratório. As amostras foram analisadas pelo grupo de pesquisa do Dr. Schlüter da Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE Hamburg, Alemanha) em um espectrômetro de massas (MS) *Agilent 1100 LC/MSD-trap XCT series system*. O sistema de *eletrospray* utilizado foi o *Chip Cube* usando o *ProtID-Chip-43* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). As amostras foram carregadas da microplaca na coluna de enriquecimento em um fluxo de 2 µL/min com duas fases móveis em uma razão de 98:2 (fase móvel A: FA 0,2% em água; fase móvel B: ACN 100%). Os peptídeos trípticos foram eluídos da coluna de fase reversa no MS usando um gradiente linear de 2 a 40% de B em 40 minutos. Para os experimentos de MS, os seguintes modos e parâmetros foram

escolhidos: *Scan range*: 300-2000 m/z; *polarity*: *positive*; *capillary voltage*: -1800 V; fluxo do gás de secagem e temperatura: 4 L/min e 325 °C.

Experimentos de MS/MS consistem na escolha de peptídeos ionizados (precursores), sua fragmentação e subsequente análise do espectro de massas resultante. Esta etapa gera mais informações complementares e visa aumentar/melhorar as probabilidades de identificação. Os MS/MS foram efetuados em *auto mode* usando uma janela de 4 Da para a seleção dos íons precursores. Após três espectros de MS/MS, os íons precursores foram ativamente excluídos da fragmentação por pelo menos um minuto.

Os arquivos genéricos resultantes para pesquisa em banco de dados foram gerados pelo software “Data Analysis v.3.4”, para a seleção de íon precursor, um *threshold* de 5 S/N foi aplicado e o número absoluto de compostos foi restrito a 1000 por experimento MS/MS.

3.2.4.3 – Identificação das toxinas por PEAKS e MASCOT.

As proteínas analisadas por MS/MS foram identificadas usando dois softwares especializados (MASCOT e PEAKS) frente a um banco de dados, nomeado “Squamata_Toxins”, que combina sequências de proteínas publicamente disponíveis de espécies do grupo Squamata, com o banco de dados público derivado do *Animal toxin annotation program* (<http://www.uniprot.org/program/toxins>) contendo sequências de proteínas de venenos assim como as sequências geradas pela tradução do transcriptoma de glândula de veneno desta espécie.

O programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) compara os dados obtidos experimentalmente com dados resultantes da digestão virtual de sequências de proteínas existentes em um determinado banco de dados, usando parâmetros específicos pré-estabelecidos. Foi usado o algoritmo MS/MS *Ion Search* com $\pm 0,5$ Da de tolerância para o precursor e $\pm 0,5$ Da para os fragmentos de MS/MS, permissão para 1 *missed cleavage site* da digestão por tripsina e a oxidação da metionina como modificação variável. Os dados gerados para cada *spot* foram validados individualmente e ordenados em

planilhas de Excel ao importar os arquivos MASCOT no programa IRMa 1.30.2 (Dupierris *et al.*, 2009).

Adicionalmente à comparação dos dados experimentais de MS/MS com bancos de dados virtualmente fragmentados, o programa PEAKS sequencia *de novo* automaticamente os peptídeos trípticos, resultando em uma lista de possibilidades ordenada em grau de probabilidade. O programa calcula as probabilidades de estas sequências serem oriundas das proteínas identificadas, reforçando o *score* de identificação. Nas análises do PEAKS foram utilizados os mesmos parâmetros apresentados acima. Os dados gerados para cada *spot* foram validados individualmente e ordenados em planilhas. O programa PEAKS permite o controle remoto do programa MASCOT, e a análise de identificação foi efetuada usando o comando *InChorus* que permite combinar os resultados gerados pelos dois programas.

A identidade dos peptídeos foi considerada apenas quando o *score* obtido se mostrou significativo. Informações relevantes como tecido de origem, evidência proteica ou genética, *pI*, massa, espécie de origem e função das proteínas identificadas com *score* significativo foram checadas individualmente nos bancos de dados UniProt e NCBI. A identificação de toxinas e proteínas, em situação de *scores* e qualidades limiares, foi validada pela análise visual dos respectivos espectros de massas.

3.2.5 - Bioinformática de análises complementares.

Uma série de programas gratuitos e acessíveis online está disponível para diversos tipos de análises complementares de sequências genéticas e proteicas. Os programas utilizados para o desenvolvimento desta tese estão listados abaixo, com uma breve descrição.

3.2.5.1 – BLAST: identificação de sequências por similaridade.

A ferramenta de alinhamento e identificação de sequências por similaridade BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) está disponível em

diversos sites como NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e SwisProt (<http://www.uniprot.org/>). Uma ou mais sequências nucleotídicas ou proteicas são submetidas para análise comparativa interligada a diversos bancos de dados. É possível cruzar tipos diferentes de informações ao comparar, por exemplo, sequências de nucleotídeo com banco de dados de proteínas. No site do NCBI, um aplicativo derivado chamado VecScreen faz o BLAST da sequência submetida com bancos de dados de vetores de clonagem, facilitando a identificação e corte das partes vetoriais nos resultados de sequenciamento de nucleotídeos.

3.2.5.2 – SignalP 4.1: detecção de peptídeo sinal.

Ao submeter uma sequência de aminoácidos, o programa SignalP 4.1 analisa na porção N-terminal desta sequência se há a assinatura bioquímica característica de um peptídeo sinal de eucariotos: uma porção hidrofóbica e um sítio de clivagem (Petersen *et al.*, 2011). O peptídeo sinal secretório permite a translocação de sua proteína “passageiro” através da membrana do retículo endoplasmático rugoso em eucariotos e da membrana citoplasmática em procariotos (von Heijne, 1990). O programa gera três índices que juntos indicam a presença de um peptídeo sinal e o local mais provável de clivagem após secreção do produto. Este programa está disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> e é mantido pela Technical University of Denmark.

3.2.5.3 – InterProScan: detecção de domínios e classificação de proteínas.

De forma parecida com o BLAST, este software compara partes de uma sequência de aminoácidos com domínios descritos e disponíveis em bancos de dados, independentemente da sequência completa. Ele identifica os domínios presentes na sequência submetida e retorna o resultado com uma interface amigável e com links para a descrição e caracterização dos domínios identificados (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Jones *et al.*, 2014).

3.2.5.4 – ORF finder: detecção de sequência codificante.

Com base no código genético, este programa permite a fácil visualização de ORFs (*Open Reading Frame*) de sequências genéticas, nos três *frames* de leitura de cada um dos dois sentidos da sequência (sentido 5' → 3' e seu reverso complementar). É possível selecionar ORFs e visualizar as proteínas traduzidas, recuperar estas sequências e identificá-las por BLAST.

3.2.5.5 – Alinhamento múltiplo de sequências.

Os algoritmos Clustal (Sievers e Higgins, 2014), MUSCLE (Edgar, 2004), KALIGN (Lassmann *et al.*, 2009), entre outros, estão disponíveis em diversos sites, como por exemplo o EMBL-EBI (The European Bioinformatics Institute) (McWilliam *et al.*, 2013) para alinhamento de sequências nucleotídicas e proteicas. Programas como, por exemplo, BioEdit (Hall, 1999) e SEAVIEW (Gouy *et al.*, 2010) também realizam estes cálculos. É possível modificar múltiplas variáveis e utilizar diversas matrizes de similaridade de acordo com a necessidade. É possível também editar manualmente os alinhamentos e gerar árvores filogenéticas para melhor visualizar semelhanças, diferenças e possíveis agrupamentos.

3.2.5.6 – Bancos de dados abertos como fonte de informações.

Os bancos de dados mais acessados, NCBI e SwissProt, contêm uma enorme quantidade de dados, exponencialmente crescente, contendo informações importantes sobre os genes e proteínas estudadas, como função, localização, espécie, domínios, sítios ativos, estrutura tridimensional, fonte bibliográfica, etc. O banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), interligado e outros bancos de dados, contêm informações específicas sobre proteases e seus inibidores (Rawlings *et al.*, 2012).

4 – Resultados.

4.1 – Transcriptoma *de novo* de glândula de veneno de *P. textilis*.

4.1.1 – Métrica dos dados brutos e da montagem dos *isotigs*.

O pirosequenciamento da biblioteca normalizada de cDNA de glândula de veneno de *P. textilis* gerou 104.878 *reads* em um total superior a 37 megabases (Mb), distribuídos em *reads* com tamanho entre 944 pares de bases (pb) e 34 pb. Os *reads* apresentaram em média 430 pb e um N50 de 466 pb. A composição das bases foi estimada em 42,25% de GC e 57,75% de AT. Apenas 0,02% das bases não foram corretamente identificadas.

A montagem gerou 1518 *isotigs*, compostos por 1678 *contigs*, agrupados em 1266 *isogroups*. Dentre os *isotigs*, 952 são considerados grandes (>300 pb). O maior *contig* tem 3352 pb e o maior *isotig* 6179 pb. O tamanho médio dos *contigs* foi de 856 pb e seu N50 de 865 pb. O tamanho médio dos *isotigs* foi de 846 pb e seu N50 de 916 pb. Foi observado um máximo de 11 *contigs* por *isotig*, 56 *isotigs* por *isogroup* e 29 *contigs* por *isogroup*. 1142 *isogroups* (90,2%) têm um único *isotig* com um único *contig*. Os *singletons* totalizam 41514 *reads*, o equivalente a 39,5% dos *reads* totais, cujo tamanho variou de 50 a 923 pb (FIG. 3). A distribuição dos *isotigs* pelo tamanho das sequências está representada na FIG. 4.

FIGURA 3. Distribuição do tamanho (em pares de bases) dos *reads* não utilizados na montagem de *isotigs* do transcriptoma de glândula de veneno de *Pseudonaja textilis*, categorizados como *singletons*, gerado pelo Blast2Go. *Lenght* = tamanho das sequências em pares de bases; *#Seqs* = número de *reads* de um determinado tamanho.

FIGURA 4. Distribuição do tamanho (em pares de bases) dos *isotigs* na montagem do transcriptoma de glândula de veneno de *Pseudonaja textilis*, gerado pelo Blast2Go. *Lenght* = tamanho das sequências em pares de bases; *#Seqs* = número de *isotigs* de um determinado tamanho.

4.1.2 – Alinhamento, identificação e anotação.

Usando o programa Blast2Go, foi possível realizar automaticamente o alinhamento das 43032 sequências do transcriptoma (*isotigs* + *singletons*) com os bancos de dados públicos de sequências genéticas e de proteínas (NCBI e SwissProt). Destas sequências, apenas 35 % (15079) têm algum tipo de descrição e anotação relativas à sua família, função, localização tecidual, localização celular, espécie de origem, etc. Dentre os *isotigs*, 461 (30,3%) são sequências desconhecidas (sem similaridade nos bancos de dados) e 1057 (69,7%) foram anotadas.

Termos relacionados a toxinas ou proteínas de veneno foram identificados em anotações de 113 sequências (0,26%) (TAB. 2). É importante destacar que este transcriptoma foi normalizado e as proporções não representam a real proporção dos transcritos na glândula de veneno.

TABELA 2. *Isotigs* e *singletons* identificados por BLAST como transcritos de toxinas ou de proteínas de veneno, já descritos em outras espécies. pb = pares de bases.

Sequência	Tamanho (pb)	Descrição BLAST	#Hits	Similaridade média
isotig01246	488	achain structures of two elapid snake venom metalloproteases	20	84.15%
isotig00391	2207	calreticulin	20	94.15%
AP6WH	423	calreticulin-like isoform x1	10	82.2%
A5YBF_2	227	co3_lamja ame: full=complement c3	20	67.0%
A1X1P	320	coagulation factor v	1	66.0%
AVMO7	473	coagulation factor v	10	91.7%
AX00H	473	coagulation factor v	20	85.7%
isotig00199	4808	coagulation factor v	20	80.05%
isotig00200	4708	coagulation factor v	20	81.15%
A669F	187	coagulation factor x isoform partial	1	63.0%
A9LX7	426	complement c3-like	20	88.15%
AWSDT	379	complement c3-like	20	89.55%
isotig00954	640	c-type lectin domain family 19 member a	20	56.05%

BASPQ	462	c-type lectin domain family 2 member d-like	20	69.75%
A38B7	388	c-type lectin domain family 4 member g-like isoform x1	6	67.17%
A71FI	370	cysteine-rich secretory protein dr-crp	2	72.0%
isotig00188	2199	factor x-like protease	20	87.45%
isotig00189	2182	factor x-like protease	20	87.45%
AP17M	491	fcnv1_varko ame: full=veficolin-1	10	80.0%
A28UX	434	ficolin-1-like	20	82.0%
A608F	476	ficolin-1-like	20	82.6%
AUJZW	420	ficolin-1-like	20	81.0%
BFP5W	375	ficolin-1-like	20	83.3%
isotig00221	1815	hyaluronidase	20	80.85%
A5N8J	439	hyaluronidase-4	19	73.0%
A645S	415	ivbi_sisca ame: full=fused toxin protein	20	64.8%
BC71L	504	ivbi_sisca ame: full=fused toxin protein	20	82.4%
A50X8	237	kunitz-type protease inhibitor 1	20	78.5%
isotig00345	451	kunitz-type protease inhibitor 2	20	60.1%
isotig00346	412	kunitz-type protease inhibitor 2	20	55.45%
BBHPD	455	lecm_thrja ame: full=c-type lectin lectoxin-thr1 short=ctl	20	59.0%
BCIU7	114	lecm_troca ame: full=c-type lectin mannose-binding	3	65.33%
A44VX	434	lecm1_hydha ame: full=c-type lectin 1 short=ctl	20	58.6%
AS39B	399	Intx-1 precursor	16	85.31%
isotig00295	582	Intx-1 precursor	20	81.2%
isotig00296	577	Intx-1 precursor	20	81.2%
BAND2	421	long chain neurotoxin precursor	20	74.35%
isotig00174	485	long chain neurotoxin precursor	20	71.5%
isotig00175	484	long chain neurotoxin precursor	20	70.7%
isotig00176	459	long chain neurotoxin precursor	20	71.4%
AQWS5	432	long neurotoxin	20	73.2%
ARCZE	393	long neurotoxin	20	70.3%
isotig01328	470	long neurotoxin	20	90.8%
isotig00406	1662	metalloproteinase precursor	20	90.85%
isotig00172	542	microlepidin-3 precursor	18	85.56%
isotig00227	1858	natriuretic peptide -a partial	12	75.83%

isotig01037	589	natriuretic peptide -a partial	17	74.82%
isotig00171	811	nigrescinin-1 precursor	20	77.2%
AXQ48	409	nxl1_demve ame: full=long neurotoxin Intx-1	1	52.0%
BBMA3	372	nxl1_oxysc ame: full=long neurotoxin 1 short=Intx-1	20	72.65%
ATS3M	501	nxl31_ophha ame: full=long neurotoxin-like oh-31	4	71.0%
A5N6Y	362	phospholipase a2	20	62.1%
isotig00800	751	phospholipase a2	20	76.9%
isotig00814	734	phospholipase a2	20	81.15%
isotig00819	732	phospholipase a2	20	79.95%
A619A	211	p-iii partial truncado	1	60.0%
isotig00824	729	pla-1 precursor	20	83.9%
isotig00883	687	pla-2 precursor	20	75.45%
isotig00263	758	pla-3 precursor	20	83.25%
isotig00264	716	pla-3 precursor	20	82.15%
BCVZ0	344	PREDICTED: galectin-9	1	64.0%
isotig00418	1536	pseudechetoxin-like protein precursor	20	93.0%
isotig00060	1444	short neurotoxin precursor	20	78.7%
isotig00061	1451	short neurotoxin precursor	20	77.85%
isotig00062	1442	short neurotoxin precursor	20	77.85%
isotig00063	994	short neurotoxin precursor	18	75.44%
isotig00064	994	short neurotoxin precursor	17	74.88%
isotig00065	994	short neurotoxin precursor	20	71.9%
isotig00066	994	short neurotoxin precursor	19	71.63%
isotig00067	664	short neurotoxin precursor	20	75.1%
isotig00068	664	short neurotoxin precursor	20	74.05%
isotig00069	1028	short neurotoxin precursor	16	75.56%
isotig00070	983	short neurotoxin precursor	18	74.17%
isotig00071	986	short neurotoxin precursor	18	75.72%
isotig00072	664	short neurotoxin precursor	20	74.2%
isotig00073	953	short neurotoxin precursor	20	70.05%
isotig00074	664	short neurotoxin precursor	20	72.95%
isotig00076	698	short neurotoxin precursor	20	73.65%
isotig00077	653	short neurotoxin precursor	20	74.75%
isotig00078	656	short neurotoxin precursor	20	75.35%
isotig00079	623	short neurotoxin precursor	20	72.55%
isotig00185	552	short neurotoxin precursor	20	69.25%
isotig00187	484	short neurotoxin precursor	20	71.1%
isotig00186	448	SNTx	0	
AO2GO	166	textilinin-6 frag	20	84.5%
isotig00390	2223	transferrin	20	70.2%
isotig00222	863	truncated hyaluronidase	20	88.75%
A5YBF	227	vco3_croad ame: full=venom factor short=vf ame: full=cvf-	16	61.25%
A0HM0	353	venom c-type lectin	19	85.05%

		galactose binding isoform		
isotig00145	693	venom c-type lectin galactose binding isoform	20	81.75%
isotig00146	693	venom c-type lectin galactose binding isoform	20	82.5%
isotig00147	693	venom c-type lectin galactose binding isoform	20	82.55%
isotig00148	727	venom c-type lectin galactose binding isoform	20	82.9%
AT2VJ	416	venom c-type lectin mannose binding isoform 3	20	82.15%
AY2FH	200	venom c-type lectin mannose binding isoform 3	12	93.33%
isotig00336	455	venom c-type lectin mannose binding isoform 3	20	74.65%
isotig01256	491	venom c-type lectin mannose binding isoform 3	20	68.2%
isotig00335	478	venom c-type lectin mannose binding isoform 5 variant 1	20	72.0%
A3002	286	venom dipeptidylpeptidase iv	10	95.4%
AQQCN	443	venom dipeptidylpeptidase iv	20	81.75%
AT5LN	454	venom dipeptidylpeptidase iv	20	89.9%
ATS17	469	venom dipeptidylpeptidase iv	10	97.6%
isotig00723	806	venom dipeptidylpeptidase iv	20	95.4%
BAFL4	461	venom protease inhibitor precursor	20	82.95%
BD7U0	461	venom protease inhibitor precursor	20	77.5%
AULDK	467	vm3_bunmu ame: full=zinc metalloproteinase- disintegrin-like	20	85.6%
isotig00163	1324	vm3h_najat ame: full=zinc metalloproteinase-disintegrin atragin	20	84.75%
isotig00164	779	vm3h_najat ame: full=zinc metalloproteinase-disintegrin atragin	20	90.5%
A2RRR	482	wap four-disulfide core domain protein 3-like	15	60.13%
A5HBF	463	wap four-disulfide core domain protein 3-like	20	52.05%
A9P90	482	wap four-disulfide core domain protein 3-like	15	60.13%
ALDXQ	403	wap four-disulfide core domain protein 5	6	57.17%
A5QV8	452	wap four-disulfide core domain protein 8	20	56.1%

As sequências acima apresentadas foram analisadas individualmente com o uso de ferramentas bioinformáticas. Alguns *isotigs* e *singletons* podem cobrir completamente a porção codificante de um transcrito, ou *Open Reading Frame* (ORF). Isto pode ser detectado para cada sequência pelo seu alinhamento com suas sequências *hits* dos bancos de dados. Uma ORF pode ser detectada também em uma sequência, analisando em cada *frame* de leitura do transcrito os códons iniciadores (ATG) e os códons de término de transcrição (TAA, TAG, TGA). Uma vez detectada a ORF é possível inferir a sequência de aminoácidos traduzindo o transcrito pelo código genético dos eucariotos.

Algumas sequências identificadas podem também estar “truncadas”, ou seja, ao alinhar seu ORF com o das sequências *hits* dos bancos de dados é possível observar um deslocamento do *frame* de leitura. Este deslocamento pode ser provocado por uma ou mais mutações (deleção, inserção ou modificação) e consequentemente a proteína resultante poderia ter parte da sequência diferente ou até um término prematuro de tradução. Estas mutações podem ser fruto de erros no sequenciamento do cDNA, de erros na montagem dos *isotigs* ou podem ser mutações naturais do indivíduo estudado. Para confirmar a presença de uma mutação e validar o dado obtido pelo transcriptoma *de novo*, o transcrito original pode ser amplificado por PCR, clonado, isolado e sequenciado diversas vezes.

Dentre as toxinas identificadas, alguns transcritos foram detectados como mensagens truncadas. Na prática, as proteínas resultantes, se presentes no veneno, não necessariamente perderam sua atividade tóxica de origem observada nos seus homólogos ou isoformas “normais”. Um estudo recente em serpentes dos gêneros *Echis* e *Psamnophis* sugere que o propeptídeo de SVMPs, que em outras espécies não tem atividade tóxica descrita, esteja sendo expresso sem os outros domínios e que tenham desenvolvido propriedades neurotóxicas (Brust *et al.*, 2013).

4.1.3 - Transposons, microssatélites e íntrons de genes de toxinas.

Muitos *isotigs* foram identificados como transcritos derivados de genes de toxinas, como por exemplo, de PLA2, 3FTx, *textilinin*, *pseutarin C*, entre outros. Estas sequências não codificam toxinas, porém contêm fragmentos de íntrons dos seus genes (regiões não codificantes encontradas no gene e excluídas dos mRNA), regiões microssatélites repetitivas e partes de genes de diversos tipos de transposons e retrotransposons. Alguns destes *isotigs* contêm mistura de íntrons de múltiplos genes. A significância biológica da presença destes transcritos na glândula de veneno de *P. textilis* é desconhecida, mas sua presença poderia indicar um possível mecanismo de regulação gênica ou até mesmo indícios de um mecanismo de evolução e recrutamento das toxinas na glândula. Regiões repetitivas podem facilitar a recombinação e a duplicação de genomas (David *et al.*, 2003) e transposons, entidades autoreplicativas que saltam de região em região nos genomas, facilitam duplicações gênicas (Morgante *et al.*, 2005).

4.2 – Proteoma do veneno de *P. textilis*.

Do gel 2D obtido (FIG. 5) foram coletados 160 spots (FIG. 6).

FIGURA 5: Gel 2D-PAGE do veneno total de *Pseudonaja textilis*. *pl*: ponto isoelétrico; MW: massa molecular.

FIGURA 6: Spots coletados do gel 2D-PAGE do veneno total de *Pseudonaja textilis*. *pl*: ponto isoelétrico; *MW*: massa molecular. Os números correspondem aos spots coletados. 1 a 40: analisados por MALDI-TOF e excluídos da análise. 41 a 160: analisados por LC/MS/MS ESI-IonTrap e utilizados na discussão.

Cada *spot* foi separado em tubo de polipropileno e tripsinizado para obtenção de peptídeos que foram analisados por espectrometria de massas MS/MS. Os spots de 1 a 40 foram analisados por MALDI-TOF/TOF, mas não retornaram resultados satisfatórios e foram excluídos da análise. A metodologia foi adaptada e os spots de 41 a 160 foram analisados por ESI-Ion trap/LC-MS/MS (Agilent 1100). A qualidade dos espectros de massas gerados foi suficiente para obtenção de resultados de identificação. Foram utilizados os programas de análise proteômica para identificação de proteínas e sequenciamento *de novo* automático, PEAKS e MASCOT (Apêndice 1).

4.2.1 – Identificação.

Oitenta e cinco *spots* retornaram resultados significativos na identificação (FIG. 7) pertencentes a seis famílias de toxinas diferentes: fator de coagulação Va (VF5a), fator de coagulação X (VF10a), as cadeias A e B da *textilotoxin* e outras fosfolipases A2 (PLA2), neurotoxinas longas e pequenas do tipo *three finger toxin* (3FTx), inibidores de protease *textilinin* (BPTI/Kunitz-type), lectinas do tipo C (CLect) e peptídeos de toxinas de lagartos do gênero *Heloderma* como *exendin-2*, *exendin-4*, *helokinestatin-1* e *kallikrein-toxin* (Toxinas de *Heloderma*). Outras proteínas identificadas no veneno são *calreticulin* e *dipeptidase-2*. A descrição dos *hits* de bancos de dados públicos identificados nos spots analisados está resumida na tabela a seguir (TAB. 3).

Dentre os 85 spots identificados, 67 tiveram pelo menos um *isotig* como hit das proteínas identificadas, totalizando 19 *isotigs* pertencentes às famílias ou sub-famílias VF5a, VF10a, Acidic PLA2, PLA2 *textilotoxin* A, CRiSP, LNTx 1328, LNTX-1, SNTx, NXS7, *textilinin*, CLect e *calreticulin* (TAB. 4).

TABELA 3: Resumo da identificação em bancos de dados públicos das proteínas, toxinas e putativas toxinas por MS/MS nos *spots* do gel 2D com PEAKS e MASCOT. VF5a: fator de coagulação Va; VF10a: fator de coagulação Xa; PLA2: fosfolipases A2; 3FTx: neurotoxinas *three finger toxin*; BPTI/Kunitz-type: inibidores de protease tipo Kunitz; CLect: lectinas do tipo C; CRiSP: *cystein rich secretory protein*.

<i>spot</i> nº	Descrição do <i>hits</i>	Família
41-48, 50, 61-69, 73, 77, 80-93, 98, 112, 116-127, 130-136, 152, 160	Venom prothrombin activator non-catalytic subunit: pseutarin-C, Coagulation factor V.	VF5a
58, 78, 153, 155, 156	Coagulation factor X. Venom prothrombin activator catalytic subunit: pseutarin-C, Omicarin-C, Oscutarin-C, hopsarin-D.	VF10a
56, 75-78, 131, 133, 139, 141, 147-151	Acidic phospholipase A2, Basic phospholipase A2, Neutral phospholipase A2, Basic phospholipase A2 homolog textilotoxin B chain, Basic phospholipase A2 textilotoxin A chain.	PLA2
77, 139, 145, 146, 158	Short neurotoxin 2,7, 3, Long neurotoxin 1	3FTx
137, 138, 146	Protease inhibitor textilinin-1, 2, 3.	BPTI/Kunitz-type
142, 143, 151, 152, 154	venom C-type lectin galactose binding isoform variant 1, C-type lectin BFL-1.	CLect
60, 114, 115	Pseudechetoxin-like	CRiSP
98, 99, 112, 121, 130-134, 136, 139,	Exendin-2, Exendin-4, Helokinestatin, Kallikrein	Toxinas de <i>Heloderma</i>
157	Dipeptidase-2	Peptidase M19
71	Calreticulin	calreticulin

TABELA 4. Listagem dos spots identificados com *isotigs* deste transcriptoma. VF5a: fator de coagulação Va; VF10a: fator de coagulação Xa; PLA2: fosfolipases A2; LNTx: neurotoxina longa; SNTx: neurotoxina curta; galacCLect: lectinas do tipo C ligantes de galactose; CRiSP: *cystein rich secretory protein*.

spot	isotig	VF5a		VF10a		Acidic PLA2		PLA2 textilitoxinA	CRiSP	LNTx 1238	LNTX-1		SNTx	NXS7	textilinin	galacCLect				calreticulin
		199	200	188	189	263	264				814	418				1238	174	176	66	
	42 a 44	X	X																	
	45				X															
	46 e 48	X	X																	
	56					X	X													
	59			X	X															
	60		X						X											
	62		X		X															
	64	X																		
	65 a 69	X	X																	
	71																			X
	73	X	X																	
	77	X	X									X	X	X	X					
	78			X	X															
	80	X	X																	
	81 a 83		X																	
	84 e 85	X	X																	
	87 e 88		X																	
	89 a 92	X	X																	
	98	X	X																	
	112	X	X																	
	114 e 115								X											
	117 e 118	X	X																	
	119 a 125		X																	
	126 e 127	X	X																	
	131		X																	
	132	X	X																	
	133		X																	
	135	X	X																	
	137 e 138															X				
	141					X	X													
	142																X	X	X	X
	143																	X	X	X
	144									X										
	146												X	X						
	147							X												
	150					X	X													
	151 e 152																X	X	X	X
	153			X	X															
	154																X	X	X	X
	155 e 156			X	X															
	160	X	X																	

Aos spots identificados foram atribuídos rótulos na fotografia do 2D-PAGE (FIG. 7) e padrões gerais de agrupamento e migração das toxinas puderam ser inferidos (FIG. 8). Observa-se que o VF5a apresenta uma grande área de migração de 40 a >120 kDa e de pI 4 a 8, indicando a presença de modificações pós-traducionais e/ou proteólise.

FIGURA 7: Atribuição de rótulos aos spots do gel 2D-PAGE do veneno total de *Pseudonaja textilis* identificados por LC/MS/MS ESI-IonTrap. pI: ponto isoelétrico; MW: massa molecular. Os números correspondem aos spots coletados (círculos laranja). VF5a: Fator de coagulação 5 ativado; VF10a: Fator de coagulação 10 ativado; PLA2: fosfolipases A2; SNTx: neurotoxina pequena; LNTx: neurotoxina longa; Txltnin: inibidor tipo Kunitz *textilinin*; Clect: Lectina tipo C; CRiSP: *cystein rich secretory protein*; HELO: peptídeos de toxinas de *Heloderma*; DPP2: dipeptidil-peptidase 2; Calrtclin: Calreticulin.

FIGURA 8: Identificação do padrão de migração das toxinas de serpentes identificadas por LC/MS/MS ESI-IonTrap no gel 2D-PAGE do veneno total de *Pseudonaja textilis*. pI: ponto isoelétrico; MW: massa molecular. VF5a: Fator de coagulação 5 ativado de veneno; VF10a: Fator de coagulação 10 ativado de veneno; PLA2: fosfolipases A2; 3FTx: *three-finger toxin*; Textilinin: inibidor tipo Kunitz *textilinin*; C-Lect: Lectina tipo C; CRiSP: *cystein rich secretory protein*.

4.3 – Imunodeteção de SVMP do veneno de *P. textilis*.

Quatro picos foram coletados do fracionamento do veneno total de *P. textilis* por cromatografia de afinidade a metal (FIG. 9).

FIGURA 9. Perfil da cromatografia líquida (Akta) de afinidade a metal Zn^{2+} (HiTrap HP, GE) do veneno total de *P. textilis*. Fase móvel A: PBS pH 7,4; Fase móvel B: A + Imidazol 100 mM pH 7,4. Linha azul: leitura de absorvância em 280 nm. Linha verde: gradiente de concentração de B (%). Frações: NA = não adsorvido e picos 1, 2 e 3.

A composição destes picos foi analisada por SDS-PAGE 12% (FIG. 10) onde se observou poucas bandas na fração não adsorvida, indicando que a maioria das proteínas que compõem o veneno tem alguma afinidade por metal. A eletroforese também evidencia na fração 1 a diversidade de moléculas com a mesma afinidade a metal, por eluírem na mesma concentração de competidor (FIG. 9). O *western blot* com anti-jararagina policlonal foi positivo na fração 1 e resultou na detecção de duas bandas imunorreativas de alta massa molecular

(~120 e 90 kDa) evidenciando a presença de proteínas com afinidade a metal imunorreativas a anti-SVMP no veneno (FIG. 11).

FIGURA 10. SDS-PAGE 12% das frações coletadas na cromatografia de afinidade a metal do veneno de *P. textilis*. M: Padrão molecular e as massas correspondentes em kDa. Frações NA (não adsorvido) e picos 1, 2 e 3.

FIGURA 11. *Western Blot* das frações não adsorvida (NA) e 1 coletadas na cromatografia de afinidade a metal com o veneno de *P. textilis*, com anticorpo policlonal anti-jararagina, uma SVMP P-III hemorrágica de *Bothrops jararaca*. As flechas na fração 1 indicam as bandas imunorreativas. M: marcador molecular. Duas massas do marcador, 118 e 90 kDa.

4.4 – Clonagem de transcrito de SVMP.

4.4.1 – Extração do RNA de glândula de veneno e síntese do cDNA.

O RNA total extraído da glândula de veneno foi analisado por eletroforese em gel de agarose (FIG. 12). As duas bandas, correspondentes às subunidades 28S e 18S de RNA ribossomal (RNAr), indicam que o RNA total está íntegro, do contrário, RNAr degradados por RNAses não formariam bandas (Selistre-de-Araújo e Souza, 2007). O “borrão”, observado na amostra Pt, indica que o RNA mensageiro está íntegro e corresponde à grande diversidade de transcritos sendo expressos no tecido com tamanhos diferentes. O controle negativo sem luminosidade indica a pureza da água DEPC.

FIGURA 12. Eletroforese do RNA total extraído da glândula de veneno de *P. textilis* em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz UV. (M) 3 μ L de marcador molecular *DNA mass ladder* 1kb; (Pt) 5 μ L de RNA total; e (C-) controle negativo. As flechas indicam as subunidades 28S e 16S de RNA ribossomal.

A amostra foi quantificada por espectrofotometria ($1,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e uma alíquota foi utilizada para sintetizar o cDNA dupla-fita (FIG. 13). A FIG. 13 mostra a quantidade crescente de cDNA dupla-fita sintetizado proporcionalmente à quantidade de ciclos de amplificação.

FIGURA 13. Eletroforese (100V por 1h) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio comparando quantidades crescentes de repetições dos ciclos para síntese de segunda fita de cDNA. Em (M) Marcador molecular λ -HindIII, (B1) 15 ciclos, (B2) 18 ciclos, (B3) 21 ciclos, (B4) 24 ciclos e (B5) 27 ciclos.

4.4.2 – Clonagem e sequenciamento do transcrito de metaloproteinase.

Após quantificar o cDNA ($150 \text{ ng}/\mu\text{L}$), uma alíquota da amostra foi submetida a uma reação de PCR com os *primers* SVMP5'UTR e SVMP3'UTR (FIG. 14). Duas bandas principais foram amplificadas na amostra de *P. textilis*, uma com aproximadamente 200 pb e outra com 2000 pb. Um controle positivo foi efetuado com uma amostra de cDNA de *Bothrops erythromelas* contendo transcritos de SVMP, e duas bandas de menor massa foram identificadas. Este resultado positivo obtido em espécies de famílias diferentes indica homologia entre as regiões dos *primers* e sugere a possibilidade de usá-los como marcadores de SVMP em serpentes.

Após a transformação das células de *Escherchia coli* DH5 α (New England) por eletroporação com os vetores, não foram obtidas colônias positivas. Devido ao resultado negativo, uma segunda rodada de clonagem foi efetuada após reamplificar por PCR a amostra de DNA extraída da banda de

2000 pb. O resultado foi positivo para uma colônia, cujo DNA plasmidial foi extraído e sequenciado nas duas extremidades com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*. As sequências processadas foram identificadas como semelhante (95%) a *textilease-1* e outras SVMP. A *textilease-1* foi depositada no Genbank por Birrel *et al.*, é descrita como uma SVMP PIII de *P. textilis*, porém não há publicação relacionada.

FIGURA 14: Eletroforese dos produtos de PCR para metaloproteinase nas amostras de cDNA de *P. textilis* (Pt) e *Bothrops erythromelas* (Be), em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. λ /HindIII: marcador, cujas bandas de 2027 pb e 564 pb foram indicadas com flechas. Controle negativo: controle de contaminação cruzada por PCR sem amostra.

As duas extremidades juntas, que totalizaram ~1400 pb, não cobriram as 2000 pb do fragmento clonado. A porção interna desconhecida (~600 pb) foi então sequenciada com o *primer* Pt-SVMPintrn1 e o resultado também permitiu identifica-lo como *textilease-1*. As sequências resultantes foram alinhadas e após uma verificação manual, uma sequência consenso foi gerada e analisada. O transcrito clonado com 1995 pb é composto pela região codificante de uma SVMP do tipo PIII com 1839 pb (612 aminoácidos), similar a *textilease-1* (99%) (Apêndice 2), e por porções das regiões não codificantes 5' UTR (49 pb) e 3' UTR (156 pb).

5 – Discussão.

Ao combinar técnicas de transcriptômica e proteômica de alto desempenho na análise e identificação de toxinas, proteínas de veneno e prováveis toxinas, um grande volume de dados foi gerado. Os resultados foram minuciosamente “garimpados”, avaliados e discutidos à luz do conhecimento nas áreas da toxinologia, biologia, evolução, bioquímica e genética. Foram identificados no veneno toxinas que interferem na coagulação como o complexo protrombinase (fatores de coagulação de veneno 5 e 10 ativados), inibidores de protease *textilinin*, PLA2 ácidas e lectinas tipo C e as neurotoxinas como a presináptica *textilotoxin* (heteropolímero de PLA2s) e as posinápticas *short* e *long three-finger toxin*. Foram também identificadas toxinas homólogas, cuja função é desconhecida neste veneno, como a CRiSP *pseudechetoxin-like* e toxinas de lagartos *Heloderma* (*exendin-2*, *exendin-4*, *helokinestatin* e *kallikrein*). Outras proteínas de função igualmente desconhecida também foram identificadas no veneno, como a dipeptidase-2 e a *calreticulin*. Como muitas famílias de toxinas podem apresentar uma gama variada de funções, as análises e discussões desta identificação estão apresentadas separadamente para cada família proteica identificada no “venoma”.

5.1 – Complexo protrombinase de veneno: Fatores de coagulação Va e Xa.

As toxinas Fator de coagulação Va de veneno (VF5a) e Fator de coagulação Xa de veneno (VF10a) são proteínas presentes em grande quantidade nos venenos das espécies *Oxyuranus microlepidotus*, *O. scutellatus* e *Pseudonaja textilis* (Masci *et al.*, 1988; Bos e Camire, 2010). No veneno de *P. textilis* o complexo foi denominado *Pseutarin-C* (Kini *et al.*, 2001;). Ele tem características similares ao complexo encontrado no plasma sanguíneo. O complexo protrombinase plasmático consiste em uma serino protease (fator de coagulação X ativada) e o cofator V ativado, não catalítico, que juntos convertem a protrombina em trombina, essencial na formação de um coágulo sanguíneo (Mann *et al.*, 1990; Rao e Kini, 2002). As toxinas derivadas deste sistema foram recrutadas na glândula de veneno por duplicação gênica e

mutações específicas (Mihn Le *et al.*, 2005). Elas não só permitem a rápida conversão de protrombina em trombina no sangue de suas presas, como também apresentam mutações específicas que bloqueiam o sistema de *feedback* negativo da coagulação, como por exemplo a inativação pela proteína C ativada (APC) (Bos *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2003). Sendo assim, estas toxinas já traduzidas na sua forma ativada têm um rápido efeito procoagulante *in vitro*, porém, têm também o efeito oposto *in vivo* ao exaurir rapidamente a protrombina do plasma sanguíneo o que explicaria os sintomas observados nas presas como hipotensão, sangramento espontâneo e depleção severa do fibrinogênio (Bos e Camire, 2010). Estas duas toxinas do complexo protrombinase de veneno foram identificadas tanto no transcriptoma como no proteoma.

5.1.1 - Fator de coagulação Va.

O VF5a é uma proteína grande de aproximadamente 160 kDa e é formada pelos domínios estruturais A1, A2, B, A3, C1 e C2 (FIG. 15). O fator de coagulação plasmático está ativo após perder a região conectora B entre as cadeias pesada (A1+A2) e leve (A3+C1+C2). No VF5a a região conectora B (~50 resíduos) é muito menor que do que nos mamíferos (~800 resíduos) e acredita-se que seu tamanho reduzido esteja relacionado com a sua capacidade de se esquivar do sistema de regulação plasmático (Bos *et al.*, 2009).

5.1.1.1 - Transcriptoma.

O *isogroup* 35, composto pelos *isotigs* 199 e 200, é o único que codifica VF5a. O *isotig* 200 está completo e codifica uma isoforma descrita pela primeira vez da toxina VF5a, contendo algumas mutações, quando comparada à toxina já descrita nesta espécie FA5V_PSETE UniProt (Minh Le *et al.*, 2005), porém nenhuma em posições que possam alterar funções descritas (Camire e Bos, 2009). Uma destas mutações, presente entre os domínios estruturais A1 e A2, modifica os resíduos FRELM por LKQWR. O *isotig* 199 também apresenta

outras mutações, sendo que uma delas introduziu um stop códon prematuro próximo à metade da proteína, codificando então a toxina truncada. A continuação da toxina ainda está no transcrito, porém, em outro *frame* de leitura, que, se fosse traduzida a partir de um novo códon iniciador não apresentaria peptídeo sinal, descartando a possibilidade de ser uma variante reduzida da toxina. Já o pedaço inicial está bem conservado, apresenta o peptídeo sinal e poderia codificar alguma variação, já que este ainda apresenta os domínios A1, A2, conector B e parte do domínio A3.

FIGURA 15. Figura extraída de Bos e Camire, 2010. Representação esquemática dos domínios A1-A2-B-A3-C1-C2 de fator 5 humano e de veneno de serpente (*P. textilis*). Os sítios de clivagem da trombina estão indicados por setas verdes, os sítios de clivagem por APC indicados por setas vermelhas, os círculos amarelos são potenciais sítios de N-glicosilação, pontes dissulfeto estão indicadas por S-S e cisteínas livres indicadas por SH.

5.1.1.2 - Proteoma.

Esta toxina foi identificada em 57 dos 120 spots coletados (41-48, 50, 61-69, 73, 77, 80-93, 98, 112, 116-127, 130-136, 152 e 160). No spot 87 o VF5a foi identificado com 30 peptídeos e dois por sequenciamento *de novo* automático que cobrem 22% do *isotig* 200 (FIG. 16). Não foram identificadas isoformas e variantes desta toxina no transcriptoma indicando que esta família de toxinas provavelmente não seja poligênica, contrariamente a muitas outras toxinas. Sendo assim, é mais provável que seu amplo padrão de dispersão no gel (FIG. 8) indique a presença de modificações pós-traducionais (PTM), e.g. glicosilações, e/ou fragmentos derivados de proteólise.

FIGURA 16. Figura gerada por PEAKS na análise do spot 87, ilustrando a cobertura dos peptídeos detectados na proteína identificada como fator de coagulação 5 ativada de veneno no *isotig* 200. As linhas azuis indicam peptídeos identificados, as linhas cinza indicam sequenciamento *de novo* e as caixas vermelhas contendo “O” indicam a modificação pós-traducional “oxidação da metionina”.

5.1.2 - Fator de coagulação Xa.

O VF10a é a subunidade catalítica do complexo protrombinase da *Pseutarin-C*, com uma massa aproximada de 50 kDa (Filippovich *et al.*, 2005). O fator de coagulação X plasmático inativo é formado por uma cadeia leve e uma pesada contendo o domínio catalítico, ligadas por um peptídeo de ativação, de forma semelhante ao fator V. O fator X é ativado após a clivagem e liberação deste peptídeo e ligação das cadeias leve e pesada. No VF10a, este peptídeo de ativação é muito menor do que o do plasmático e ainda não se sabe se ele é clivado ou não e qual seu papel no reconhecimento do substrato e na ativação da protease (Bos e Camire, 2010).

5.1.2.1 - Transcriptoma.

Dois *isotigs* (188 e 189) foram identificados como VF10a, formando o *isogroup* 28. As ORFs das duas sequências são idênticas e as diferenças dos *isotigs* detectadas nas UTRs devem refletir uma duplicação gênica. As sequências traduzidas têm 99,1% de identidade com a toxina já descrita nesta espécie, e as mutações não estão localizadas nos sítios ativos.

5.1.2.2 - Proteoma.

O VF10a foi identificado em cinco spots (58, 78, 153, 155 e 156) do gel 2D. Todos os spots identificados estão agrupados em uma região em torno de 35 kDa e *pI* entre 6 e 8,5. No spot 78 o PEAKS detectou 10 peptídeos, dois por sequenciamento *de novo*, cobrindo 13% da ORF dos *isotigs* 188 e 189 (FIG. 17).

FIGURA 17. Figura gerada por PEAKS na análise do spot 78, ilustrando a cobertura dos peptídeos detectados na proteína identificada como fator de coagulação 10 ativada de veneno no *isotig* 188. As linhas azuis indicam peptídeos identificados e as linhas cinza indicam sequenciamento *de novo*.

5.2 - Fosfolipases A2.

As fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas ubíquas na natureza, intra e extracelulares, que hidrolisam fosfolipídeos e têm um papel importante em diversas atividades biológicas como fertilização, contração muscular, proliferação celular, entre outras (Kini, 2003). As PLA2 foram recrutadas para a glândula de veneno de serpentes por duplicações gênicas e mutações aceleradas fazendo com que tenham função tóxica e muitas até percam a sua função enzimática original (Ohno *et al.*, 1998). Elas também são descritas em venenos de outros animais, como as abelhas (Palm *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2013). A grande diversidade de PLA2 é refletida na diversidade de funções como, por exemplo, neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, atividade hemolítica, hemorrágica, hipotensiva, entre outras (Kini, 2003). As PLA2 de Elapidae são do Grupo I, de acordo com sua sequência e posição das cisteínas, com aproximadamente 120 aminoácidos e sete pontes dissulfeto. De acordo com a ausência ou presença do *loop* pancreático (resíduos em torno da posição 60-67), elas podem ser ainda subdivididas em IA ou IB, respectivamente. Em *P. textilis*, o principal grupo de PLA2 estudado são as subunidades da *textilotoxin*, uma neurotoxina pré-sináptica heterohexamérica formada pelas subunidades A, B e C do subgrupo IA, e D (subgrupo IB), nas

proporções (A/B)₂C₂D_{2a} e (A/B)CD_{2a}D_{2b} (Aquilina, 2008). Apesar de todas as subunidades terem o putativo sítio de atividade, apenas a A apresenta alguma letalidade quando isolada (4 mg/kg intravenoso em camundongo) (Pearson *et al.*, 1993). Outras PLA2 descritas nesta espécie do subgrupo IB tem atividade procoagulante (Amurgam *et al.*, 2004).

5.2.1 – Transcriptoma.

Foram identificados sete *isotigs* de PLA2 (TAB. 5), todos completos e já descritos nesta espécie. A sequência nucleotídica da *textilotoxin B chain* está sendo descrita pela primeira vez, pois somente a sequência de aminoácidos da proteína madura havia sido descrita (Pearson *et al.*, 1993). Neste estudo, obtivemos sequências parciais das regiões não traduzidas, assim como a sequência completa do peptídeo sinal. Uma análise filogenética de suas sequências de aminoácidos deduzidas com as das proteínas já descritas mostra a identidade dos *isotigs* e o agrupamento dos subgrupos A e B (FIG. 18).

Ao analisar com mais detalhes as sequências dos *isotigs* 263 e 264, percebe-se que o peptídeo sinal é diferente enquanto a proteína madura é idêntica (FIG. 19). Ao alinhar as sequências nucleotídicas das ORFs foi possível observar algumas deleções que promovem um deslocamento do *frame* de leitura, porém o *frame* da proteína madura é restabelecido (FIG. 20).

Ao alinhar por BLAST apenas os peptídeos sinal destas duas sequências, foi possível identificar que o do *isotig* 263 é similar a PLA2s já descritas em diversas Elapidae, por exemplo, *Pseudonaja*, *Pseudechis* e *Oxyuranus*, enquanto o peptídeo sinal do *isotig* 264 é similar ao peptídeo sinal de PLA2 previamente descrito apenas em *Bungarus multicinctus* (Sul da Ásia) e *Micrurus fulvius* (Sudeste da América do Norte) (FIG. 21).

TABELA 5. Resumo das PLA2 identificadas no transcriptoma da glândula de veneno da *Pseudonaja textilis*. O BLAST hit corresponde ao nome da toxina já descrita nesta espécie.

<i>Isogroup</i>	<i>Istotig</i>	BLAST hit	Atividade descrita	Sub-grupo
562	814	<i>textilotoxin A chain</i>		A
631	883	<i>textilotoxin B chain</i>	neurotoxina	A
567	819	<i>textilotoxin C chain</i>	hexamérica	A
548	800	<i>textilotoxin D chain</i>		B
572	824	<i>Acidic A2 1</i>	pro-coagulante	B
67	263	<i>Acidic A2 2</i>	pro-coagulante	B
	264	<i>Acidic A2 2</i>	pro-coagulante	B

FIGURA 18. Árvore filogenética de máxima verossimilhança (PhyML), com análise de confiança bootstrap de 100 réplicas, das sequências de aminoácidos deduzidas dos *isotigs* 814, 819, 883, 800, 824, 263 e 264 e das toxinas PLA2 já descritas em *Pseudonaja textilis*, textilotoxin subunidades A, B, C e D e as *Acidic PLA2-1* e 2. Os valores nos nós representam a porcentagem da análise de confiança do *bootstrap*.

FIGURA 21. Alinhamento, por MUSCLE, das sequências de aminoácidos dos peptídeos sinal deduzidos dos *isotigs* 263 e 264 com três PLA2 de *Pseudonaja textilis* (Acidic PLA2, textilotoxin A chain e textilotoxin D chain), uma de *Micrurus fulvius* (PLA2 18) e Beta-bungarotoxin A chain de *Bungarus multicinctus*. A região do peptídeo sinal está dentro da caixa preta. O código de coloração Clustal indica pela mesma cor quais resíduos têm características semelhantes.

5.2.2 - Proteoma

As PLA2s foram identificadas em 10 *spots* (56, 130, 131, 139, 141, 147-151) do gel 2D (FIG. 7 e 8).

Os *isotigs* 263 e 264, correspondentes às PLA2 subgrupo IB, foram identificados nos *spots* 56, 141, 150 e 151. O spot 56 apresentou a melhor identificação, sendo dois por identidade e dois outros por sequenciamento *de novo* automático (FIG. 22).

```

1  MHPAHLVPL GVCVSLGAA RIPPLPLSLV EFRILIKCAN HNSRNVLDYA DYGCYCGKGG SGTVPDELDR
71  CCQAHDYCYD DAEKLPACNY RFSGPYWNPY SYK CNEGEVT CTDDNDECKA FICNCDRTAA ICFAGAPYND
141 ENFMITIKKK NICQ

```

FIGURA 22. Figura gerada pelo PEAKS mostrando os peptídeos identificados do *spot* 56 sobre a proteína derivada do *isotig* 263. Peptídeos sublinhados em azul foram identificados e os sublinhados em cinza foram sequenciados *de novo* automaticamente.

Nos spots 147, 148 e 149, que migraram no gel 2D com a mesma massa ~15 kDa mas em *pIs* diferentes (entre 6 e 9) (FIG. 7), foram identificadas as subunidades da *textilotoxin*, porém apenas as subunidades A e B (TAB. 6).

TABELA 6. Número dos *spots* identificados como subunidades da *textilotoxin*, a quantidade de peptídeos detectados e a porcentagem de cobertura da toxina, gerados por PEAKS 7.0.

Spot	Textilotoxin	Peptídeos	Cobertura
147	B	4	27%
148	B	4	27%
	A	2	16%
149	A	2	16%

O spot 139 (~14 kDa e *pI* 4,5) foi identificado como similar a uma PLA2 básica de *Naja mossambica* (CM-II), pelo peptídeo YIDANYNINLK. Este mesmo peptídeo também foi identificado nos *spots* 130 e 131, cujo comportamento de migração foi diferente, posicionados em torno de 66 kDa e *pI* próximo a 7. A atividade da CM-II foi descrita como sendo miotóxica e neurotóxica, sendo que este tipo de PLA2 nunca foi descrita em *Pseudonaja*. Por BLAST, observou-se que as PLA2s de *P. textilis* mais próximas à CM-II são as *textilotoxin* C e a PLA2 ácida 1, cujo índice de similaridade é de 57% e 52% respectivamente, porém, a região do peptídeo detectado é pouco conservada

entre elas. Apesar da qualidade do experimento e do rigor estatístico esta PLA2 foi identificada a partir de um único peptídeo e nenhum transcrito com esta sequência foi detectado. Sendo assim, mais experimentos deverão ser efetuados para confirmar a presença desta isoforma desconhecida nesta espécie.

5.3 - Alfa-neurotoxinas da família das *three-finger toxins*.

As *three-finger toxins* (3FTx) são polipeptídeos não enzimáticos, contendo de 60 a 74 resíduos de aminoácidos. Provavelmente são peptídeos homólogos à família das Lynx (*Ly-6 antigen family neurotoxin-like*) presentes em mamíferos, com função semelhante modulando receptores nicotínicos de acetilcolina, também conhecida como prototoxina endógena de mamíferos (Miwa *et al.*, 2006; Mywa *et al.*, 1999; Fry, 2005). O aspecto característico principal é sua estrutura tridimensional com três *loops* “em forma de dedos” saindo de um núcleo hidrofóbico ligado por quatro pontes dissulfeto conservadas. Apesar da semelhança estrutural das 3FTx, elas têm diferentes atividades biológicas como bloqueadoras de vários tipos de receptores nicotínicos de acetilcolina, subtipos distintos de receptores muscarínicos de acetilcolina, canais de Ca^{2+} tipo L, inibidoras de acetilcolinesterases, inibidoras de agregação plaquetária, analgésicas e formação de poros em membranas (Hedge *et al.*, 2009; Utkin, 2013; Kini e Doley, 2012).

Elas estão entre os principais constituintes do veneno das Elapidae e são conhecidas como uma de suas toxinas mais letais. As 3FTx mais estudadas são as alfa-neurotoxinas antagonistas dos receptores pós-sinápticos nicotínicos de acetilcolina, que promovem paralisia, parada respiratória e morte (Servent *et al.*, 1997). O mecanismo molecular de sua evolução acelerada é tema de discussão entre diferentes hipóteses propostas por Doley *et al.* (2009) (ASSET - Accelerated Segment Switch in Exons to alter Targeting) e Sunagar *et al.* (2013) (RAVER - Rapid Accumulation of Variations in Exposed Residues), evidenciando a importância da detecção de novas variantes para a compreensão destes mecanismos. Classicamente, elas são classificadas, de acordo com o seu tamanho, sequência e padrão de cisteínas em *short*

neurotoxins (SNTx) com aproximadamente 60 aminoácidos e quatro pontes dissulfeto e *long neurotoxins* (LNTx) de tamanho de 61 a aproximadamente 80 aminoácidos e quatro pontes dissulfeto conservadas e uma ponte dissulfeto adicional (Hedge *et al.*, 2009). Porém, uma grande diversidade de isoformas de SNTx e LNTx já foram descritas nesta e outras espécies (Jackson *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 1999; St. Pierre *et al.*, 2007a; Tyler *et al.*, 1987) evidenciando a possibilidade de existir uma maior diversidade de tamanhos e funções. Com base nestas observações uma classificação mais recente foi proposta (Fry *et al.*, 2003). Em *P. textilis*, as LNTx foram reclassificadas em α -neurotoxinas tipo-II e as SNTx em α -neurotoxinas tipo-III.

5.3.1 – Transcriptoma.

No transcriptoma, esta família de toxina apresentou o maior número de *isogroups* e *isotigs*. Ao analisar minuciosamente estas sequências, foi possível reagrupá-las em oito subgrupos, de acordo com a semelhança entre as ORF, sendo que o *isogroup* 2 apresentou 3 subgrupos diferentes (TAB. 7).

TABELA 7. Lista de *isotigs* identificados como neurotoxinas. Os *isogroups* foram determinados automaticamente pela montagem. Os subgrupos foram determinados manualmente de acordo com a composição da ORF. A descrição foi anotada automaticamente pelo Blast2Go. SNTx: *Short neurotoxin*, LNTx: *long neurotoxin*, NA: sem correspondência.

<i>Isogroup</i>	<i>Subgrupo</i>	<i>Istotig</i>	Descrição do Blast2Go	Comentários
2	1	67 e 68	Short neurotoxin precursor	Isoformas de SNTx
		72	Short neurotoxin precursor	Isoforma de SNTx
		74	Short neurotoxin precursor	Isoforma de SNTx
		75	---NA---	Isoforma de SNTx (com deleção interna)
		76 a 79	Short neurotoxin precursor	Isoformas de SNTx
	2	60 a 62	Short neurotoxin precursor	Inserção de um stop codon
	3	57 a 59	Uncharacterized transposon- derived protein	
		63 a 66	Short neurotoxin precursor	Inserção / Perda do peptídeo sinal
		69 a 71	Short neurotoxin precursor	

73			Short neurotoxin precursor	
27	4	185 e 187	Short neurotoxin precursor	Novas SNTx em <i>P. textilis</i>
		186	---NA---	Nova SNTx em <i>P. textilis</i> (185 com deleção)
23	5	174 e 176	Long chain neurotoxin precursor	LNTx-1 (100% similar)
		175	Long chain neurotoxin precursor	LNTx-1 (isoforma)
83	6	295 e 296	LNTx-1 precursor	LNTx <i>Pseudonajatoxin b</i> homologue (100% similar)
1076	7	1328	Long neurotoxin	LNTx nova em <i>P. textilis</i>
6	8	112 a 118	---NA---	Não codificam, contêm regiões intrônicas

5.3.1.1 – Neurotoxinas curtas.

Os *isogroup* 2 e 27 contêm *isotigs* derivados de transcritos de 3FTx. No *isogroup* 2, o *isotig* 74 codifica exatamente a NXS7 descrita em *P. textilis* (Gong *et al.*, 2000) e os *isotigs* 67, 68, 72 e 76 a 79 codificam novas isoformas de SNTx, com algumas mutações (FIG. 23).

Já os *isotigs* 185 e 187 (*isogroup* 27) codificam novas SNTx nunca descritas em *P. textilis*. De acordo com a montagem do transcriptoma, estes *isotigs* foram agrupados em um mesmo *isogroup* indicando compartilhamento de *contigs* e alta similaridade genética, porém as proteínas codificadas têm diferenças interessantes. O *isotig* 187 tem alta identidade (~90%) com isoformas descritas em *Pseudonaja modesta*, por exemplo, a Pse-290 (Jackson *et al.*, 2013) e 65% com a NXS3 de *P. textilis*. O *isotig* 185 tem 84% de identidade com a 3FTx-Oxy6 de *Oxyuranus microlepidotus* e apenas 60% de identidade com a NXS3 de *P. textilis*. A 185 e 3FTx-Oxy6 têm dois aminoácidos adicionais no início da proteína madura, quando comparadas às outras SNTx (FIG. 23).

Outros *isotigs* contêm a informação genética de SNTx mas por diversas razões, não devem ser traduzidas, ou se traduzidas não devem ser funcionais. O subgrupo 2 contém a informação truncada devido a mutações que inseriram um códon de parada prematuro, impossibilitando a tradução de proteína. Já o subgrupo 3 apresenta uma grande inserção dentro do peptídeo sinal, descaracterizando-o e teoricamente impedindo sua secreção da glândula. Analisando a similaridade desta sequência de aminoácidos (YVIKLQNQKNKYQ) com o banco de dados de nucleotídeos pelo algoritmo tblastn (NCBI) foi possível observar que ela corresponde a uma sequência de um *intron*, próximo ao 2º *exon* do gene da NXS6 da *P. textilis*. No subgrupo 8 diversos fragmentos de *introns* foram detectados em sua sequência. Porém neste caso, diversos *stop codons* foram introduzidos, fazendo com este transcrito não possa ser traduzido. Em diversos *singletons* identificados como transcritos de 3FTx foi detectada informação genética truncada, contendo mutações que eliminam o códon iniciador, geram *stop codons* prematuros ou deslocam o *frame* de leitura descaracterizando totalmente a 3FTx original.

5.3.1.2 - Neurotoxinas longas.

O subgrupo 5 contém dois *isotigs* (174 e 176) que codificam exatamente a 3FTx longa LNTx-1 descrita em *P. textilis* (St. Pierre *et al.*, 2007a) e também o *isotig* 175 que codifica uma isoforma, contendo algumas mutações (FIG. 23). É interessante observar que este tipo de LNTx tem apenas oito cisteínas, contradizendo a regra que a classifica em LNTx.

O subgrupo 6 (*isotigs* 295 e 296) codifica exatamente a *Pseudonajatoxin b homologue* descrita em *P. textilis* (Gong *et al.*, 2001), uma LNTx com cinco pontes dissulfeto (FIG. 23).

Já o *isotig* 1328 do subgrupo 7 codifica uma nova LNTx em *P. textilis*, com cinco pontes dissulfeto (FIG. 23). Ela é 93% similar a uma descrita em *Pseudonaja modesta* (Jackson *et al.*, 2013), 85% a α -neurotoxina *Long neurotoxin 20* de *Drysdalia coronoides* (Chatrath *et al.*, 2011) e apenas 78% similar a *Pseudonajatoxin b homologue* de *P. textilis*.

Alguns *singletons* foram identificados como LNTx, porém haviam mutações que truncaram a informação genética impossibilitando sua tradução.

FIGURA 23: Alinhamento por MUSCLE do Seaview das sequências de aminoácidos de 3FTx, deduzidas de *isotigs*, com sequências similares. Os *isotigs* estão codificados como SNTx ou LNTx seguido de seu número. As outras proteínas alinhadas são: Alphabungarotoxin_de: *Alphabungarotoxin deletion Bungarus multicinctus*; Naja_naja_atra_cardi: *Naja naja atra deletion of cardiotoxin5*; NXS1_Ptextilis a NXS7_Ptextilis: *short neurotoxin de 1 a 7* descritas em *P. textilis*; 3FTxOxy6_Omicrolepid: 3FTxOxy6 de *Oxyuranus microlepidotus*; NXL1_Ptextilis: *long neurotoxin 1* descrita em *P. textilis*; NXL20_Dcoronoides: *long neurotoxin 20* descrita em *Drysdalia coronoides*; Pse290: isoforma 290 de *Pseudonaja modesta*; Pseudonajatoxin_b_ho: *Pseudonajatoxin b homologue* descrita em *P. textilis*. O código de coloração Clustal indica pela mesma cor quais resíduos têm características semelhantes.

5.3.1.3 - 3FTx não convencionais.

Os *isotigs* 75 e 186 codificam SNTx com grandes deleções internas, diminuindo consideravelmente o seu tamanho (FIG. 23). Estas deleções podem ser interpretadas como *splicing alternativo*, pois alguns *contigs* são compartilhados com os *isotigs* do mesmo *isogroup*. Apesar da deleção, um novo ponto de clivagem de peptídeo sinal foi detectado pelo SignalP 4.1 entre os resíduos 23 e 24 do *isotig* 75 (entre os resíduos ILA e RG) e do *isotig* 186 (entre os resíduos VVA e RG). Deleções semelhantes já foram descritas em

um clone da LNTx *bungarotoxin* de *Bungarus multicinctus* (Acessão: Q9YH67_BUNMU) e em um clone da SNTx *cardiotoxin 5* de *Naja naja atra* (Acessão: O93443_NAJAT), porém não há nenhuma publicação relacionada a estes dados. Ao analisar mais detalhadamente a sobreposição dos *reads* na montagem dos *isotigs* 75 e 186 usando o programa Tablet (Milne *et al.*, 2013), é possível observar que, justo na região da suposta deleção, a sustentação desta sobreposição é muito baixa em relação às regiões adjacentes. Sendo assim, apesar do rigor estatístico na montagem das sequências, este resultado poderia ser interpretado como um falso positivo. A hipótese da existência deste tipo de deleção deve ser testada, por exemplo, por clonagem direta dos RNAm, direcionada com *primers* específicos.

5.3.2 – Proteoma.

A análise do proteoma detectou 3FTx nos spots 77, 144, 145 e 146 do gel 2D (FIG. 7). A detecção de 3FTx em gel 2D não era esperada devido ao seu tamanho ser inferior à resolução mínima da eletroforese (~10 kDa), porém migrações anômalas podem ocorrer. Foram identificadas nos spots 145 e 146 as variantes, todas já descritas em *P. textilis*, NXS2 e NXS 7, assim como as proteínas codificadas pelos *isotigs* 66 e 74. Apesar do *isotig* 66 apresentar uma inserção que elimina o seu peptídeo sinal, a sua sequência codifica em outra porção de sua ORF um peptídeo detectado por espectrometria de massas. No spot 77 foram identificadas variantes de SNTx agrupadas em NXS3, NXS2 e NXS7 com os *isotigs* 66 e 74, e um peptídeo específico da variante LNTX-1, assim como os *isotigs* 176 e 174.

A nova LNTx, descoberta no *isotig* 1328, foi identificada no spot 144 em três espectros. A identificação foi feita pelo único peptídeo K.TPYVK.S, cuja sequência é suficiente para diferenciar este tipo de outros já descritas nesta espécie. A qualidade de seu espectro de massas foi validada manualmente (FIG. 24).

FIGURA 24. Figura extraída do spot 144 no programa PEAKS contendo informações acerca da identificação do peptídeo TPYVK correspondente à nova neurotoxina longa codificada no *isotig* 1328. (A) Um espectro de massas, dentre três encontrados; (B) erro de massa dos picos do espectro (Da) e alinhamento do peptídeo identificado com o espectro; (C) Séries de fragmentação dos íons.

5.3.3 - Considerações sobre a evolução das 3FTx.

Na tentativa de visualizar melhor as relações filogenéticas entre as sequências aqui descritas e algumas sequências de 3FTx já descritas, diversas análises filogenéticas foram testadas (PhyML, SEAVIEW) com diferentes parâmetros. As árvores geradas sempre apresentavam topologias diferentes com valores de confiança de *bootstrap* muito baixos e foram descartadas. Os métodos e a amostragem deverão ser reavaliados para uma análise mais robusta que reflita melhor a evolução molecular complexa desta família poligênica de toxinas. O uso de sequências genéticas (RNAm e genes) e a detecção do gene ancestral Lynxs nos répteis poderiam ajudar na resolução da filogenia desta toxina.

A grande diversidade de transcritos obtidos neste transcriptoma, também observada em outros estudos (Jackson *et al.*, 2013; St. Pierre *et al.*, 2007a), indicam que as 3FTx formam uma família poligênica em processo de diversificação. Com certas exceções, não se sabe quais destas isoformas são efetivamente traduzidas e secretadas no veneno, e quais teriam ação tóxica. Neurotoxinas que agem com alta letalidade em certas presas podem não surtir efeito algum em outras (Hedge *et al.*, 2009; Barber *et al.*, 2012). Do ponto de vista da neurotoxicidade do veneno, o sucesso na predação da *P. textilis* deve depender de diferentes tipos de neurotoxinas, cada qual especializada em um tipo específico de presas. Esta grande diversificação molecular das 3FTx pode ser interpretada de várias formas como, por exemplo, (1) uma pré-adaptação que permitirá que a espécie mude de dieta em casos de mudanças ecológicas, (2) como uma adaptação especializada a uma grande gama de presas, ou até (3) como a evidência de que esteja ocorrendo uma “corrida armamentista” entre presa e predador. Maiores informações sobre a diversificação dos genes e sobre a história natural desta espécie se fazem necessárias para testar estas hipóteses.

5.4 – Peptídeos inibidores de serinoproteases S1 do tipo Kunitz e WAP.

Inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz (família I2), também conhecidos como *Bovine Protease Trypsin Inhibitors* (BPTI), estão presentes em uma grande variedade de tecidos e em quase todos os Reinos, menos em Archaeae e Fungi (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=i2>, acessado em 27 de março de 2014). Uma ampla variedade de BPTIs com diferentes características e funções é encontrada em veneno de diversas espécies, como anêmonas (e.g. Schweitz *et al.*, 1995), vespas (e.g. Hisada *et al.*, 2005), aranhas (e.g. Chung *et al.*, 2002), musaranhos (e.g. Kita *et al.*, 2004), escorpiões (e.g. Chen *et al.*, 2012), serpentes Viperidae (e.g. Cheng *et al.*, 2012) e Elapidae (e.g. Masci *et al.*, 2000), entre outras. Em *Pseudonaja textilis*, a toxina *textilinin* é um BPTI que inibe seletivamente e reversivelmente a plasmina tem chamado atenção de pesquisadores para o seu uso como fármaco no controle da coagulação (Masci *et al.*, 2000). Recentemente, ela foi

patenteada para fins farmacológicos para ser usado como agente antifibrinolítico para reduzir perda de sangue em cirurgias e operações complicadas (Earl *et al.*, 2012). Uma grande diversidade de genes e transcritos de BPTI foi descrita em diversas espécies de Elapidae, sendo que alguns transcritos sequenciados continham dois domínios BPTI e outros contendo adicionalmente um domínio BPTI e outro WAP (KuWAP) (Jackson *et al.*, 2013; St. Pierre *et al.*, 2008).

Os inibidores de serinoprotease do tipo WAP (família I17), sigla para *Whey Acidic Protein*, são peptídeos achados em grande quantidade no soro de leite de muitos mamíferos contendo um domínio chamado de núcleo de quatro pontes dissulfeto, e que pode ser encontrada em outros tipos de proteínas, inclusive junto com outros inibidores de proteases (Hennighausen e Sippel, 1982; Bingle *et al.*, 2002). As WAP são encontradas em animais e protozoários, também com uma grande variedade de características e funções (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=i17>, acessado em 27 de março de 2014). Os peptídeos *omwaprin* e *nawaprin*, classificadas como *snake waprins*, foram isolados do veneno das Elapidae *Oxyuranus microlepidotus* e *Naja nigricollis* respectivamente, do qual foi observada atividade antimicrobiana e não foi detectada nem atividade hemolítica, nem toxicidade em camundongos e nem inibição de elastase e catepsina G (Nair *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2003). Nas glândulas de veneno de serpentes transcritos de WAP foram identificadas, inclusive a *textwaprin* de *P. textilis* (Fry *et al.* 2008; St. Pierre *et al.*, 2008). Suas funções no veneno ou na glândula são desconhecidas.

Os peptídeos fusionados KuWAP não são classificados em uma família específica. Em humanos e roedores, uma família de proteínas chamadas de EPPIN (*Epididymal Protease Inhibitor*), formadas por um domínio Kunitz e outro WAP, são encontradas na superfície de espermatozoides e têm um papel bactericida e contraceptivo (Wang *et al.*, 2007; Yenugu *et al.*, 2004). Já foram descritos em transcritos de glândula de veneno da Viperidae *Sistrurus catenatus edwardsii* (Pahari *et al.*, 2007) e da Elapidae *Suta fasciata* (Jackson *et al.*, 2013), porém sua função e presença no veneno continua desconhecida.

Estes dois tipos de inibidores e suas variações estão evolutivamente relacionados nas glândulas de veneno de serpentes devido a características como compartilhamento de peptídeo sinal e de alta similaridade do primeiro exon, mas a forma como evoluem ainda é discutida (St. Pierre *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2013).

5.4.1 - Inibidores monodomínio do tipo Kunitz: *Textilinin* e novas sequências.

5.4.1.1 – Transcriptoma.

No *isogroup* 22 foram identificadas sequências similares a *textilinin*. O *isotig* 173 codifica a *textilinin-4* com 100% de similaridade. O *isotig* 171 apresenta uma mutação que elimina o códon iniciador de transcrição, porém é possível observar que é derivada do gene que codifica a isoforma Tx-4 da *textilinin*. O *isotig* 172 codifica a *textilinin-1*, porém apresenta uma mutação que gera um stop códon prematuro no final da sequência. O final da proteína está codificado em outro *frame* de leitura. Esta versão reduzida da *textilinin* apresenta o sítio de inibição RV, porém este novo peptídeo conserva apenas duas cisteínas e a consequente estrutura poderia tanto acarretar a perda de função original quanto favorecer o surgimento de uma nova função.

No *singleton* BC91X foi identificado um novo tipo de BPTI (FIG. 25) nunca antes descrito em serpentes, assemelhando-se mais com inibidores descritos em sanguessuga (Simakov *et al.*, 2013) e carrapato (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2008). No carrapato *Rhipicephalus microplus*, o *Boophilin-H2* (Acession: BOOH2_RHIMP) é um o inibidor com duplo-domínio BPTI que previne a formação de coágulos para permitir a alimentação do carrapato ao inibir trombina e outros fatores do hospedeiro como os fatores tipo kalikreína, fator de coagulação VII ou plasmina (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2008). Apesar de esta função anticoagulante ser potencialmente interessante para a predação da *P. textilis*, o sítio de inibição KA da *Boophilin-H2* não está conservado em BC91X (FIG. 26) e é substituído por YN. A BC91X apresenta uma sequência madura

de 59 aminoácidos contendo seis resíduos de cisteína conservados. Seu alinhamento com as proteínas mais próximas e com o inibidor de serpente mais similar (*bitisilin*) está apresentado na FIG. 26. O seu peptídeo sinal, identificado pelo programa SignalP v.4.1 (FIG. 27), apresenta muito pouca similaridade com outros desta mesma família de inibidores.

FIGURA 25. Representação gráfica do InterProScan 4.8 de domínios identificados na sequência de aminoácidos codificada no *singleton* BC91X_1. A legenda de cores nas figuras indicam quais bancos de dados de domínios proteicos foram acessados.

FIGURA 26. Alinhamento (SeaView) da sequência de aminoácidos derivada do *singleton* BC91X_1 (BC91X) com inibidores BPTI da sanguessuga *Helobdella robusta*, do carrapato *Rhipicephalus microplus*, e o *bitisilin-1* da serpente *Bitis gabonica*. Devido à característica duplo domínio da Boophilin H2, dois métodos diferentes de alinhamento, CLUSTAL (a) e MUSCLE (b) resolvem de forma diferente. O caractere * representa os resíduos conservados. Triângulo cheio (▲) indica, por homologia, o sítio de inibição de protease. O código de coloração Clustal indica pela mesma cor quais resíduos têm características semelhantes.

FIGURA 27. Representação gráfica da identificação de peptídeo sinal na sequência do inibidor BPTI BC91X, gerado pelo SignalP v. 4.1. O provável ponto de clivagem entre TSG e DL, indicado por uma seta, está na intersecção dos índices C-score, S-score e Y-score.

5.4.1.2 – Proteoma.

Em três spots do gel 2D (137, 138 e 146) foram identificados os peptídeos *textilinin-1*, *textilinin-2* e *textilinin-3* (FIG. 7). Nenhum outro tipo de inibidor de protease descrito neste transcriptoma foi identificado no proteoma. Isto pode ser explicado porque (1) os transcritos podem não ser traduzidos ou, caso contrário, a proteína traduzida não ser secretada no veneno ou (2) a resolução limitada do gel 2D em um mínimo de ~10 kDa pode não permitir sua detecção. Estudos de peptidoma (a porção de menor massa molecular, e.g. < 10 kDa) do veneno de *P. textilis* por espectrometria de massas e estudos de imunodetecção ajudariam a elucidar se estes compostos estão presentes no veneno e qual seria sua importância no envenenamento.

5.4.2 - Inibidores de duplo-domínio do tipo Kunitz.

O *isogroup* 108 codifica outro tipo de inibidor BPTI, diferentes da *textilinin*, com duplo-domínio. Ao analisar as ORFs, é possível observar que não há stop códon e ao analisar os alinhamentos por BLAST, observa-se que elas codificam principalmente o domínio N-terminal da proteína (FIG. 28). Estudos de clonagem por PCR poderiam permitir a obtenção da sequência completa deste gene. Apesar de incompleta, a informação é suficiente para identifica-las como inibidores BPTI duplo domínio, descritos em Elapidae, como a IVBI_AUSLA de *Austrelaps labialis* (Doley *et al.*, 2008), a KP-Hop-7 de *Hoplocephalus bungaroides* (Jackson *et al.*, 2013) e a *Kunitz inhibitor 4* de *Micrurus fulvius* (Margres *et al.*, 2013). Ao analisar com mais detalhes as sequências nucleotídicas, percebe-se que na extremidade 3' inicia-se o segundo domínio BPTI (FIG. 29). É possível identificar também os resíduos RA nos sítios de inibição de protease (FIG. 28).

A sequência do *isotig* 346 apresenta no início uma grande deleção, ausente no *isotig* 345, que fica evidente quando alinhadas às proteínas homólogas. No alinhamento é possível observar que esta deleção encontra-se entre os dois domínios encurtando a distância entre eles (FIG. 27).

Este tipo de peptídeo inibidor BPTI duplo-domínio nunca havia sido identificado antes em veneno ou glândula de veneno de *Pseudonaja textilis* e sua sequência é bem conservada comparando-a com as suas homólogas (FIG. 29), devendo apresentar uma função similar.

FIGURA 28. Alinhamento por MUSCLE dos *isotigs* 345 e 346 com inibidores tipo Kunitz duplo domínio de *Austrelaps labialis*, *Hoplocephalus bungaroides* e *Micrurus fulvius*, gerado pelo programa SeaView v.4. O final do peptídeo sinal e início da proteína madura estão indicados pela seta. Os sítios de ligação com a tripsina estão indicados por **RA**. O domínio N-terminal está destacado por uma caixa laranja e o domínio C-terminal por uma caixa amarela. O código de coloração Clustal indica pela mesma cor quais resíduos têm características semelhantes.

FIGURA 29. Representação gráfica dos domínios identificados nas sequências de aminoácidos pelo InterProScan 4.8. A figura superior representa a sequência codificada pelo *isotig* 345 e a inferior pelo *isotig* 346. Destacados em círculos vermelhos os domínios de inibição tipo Kunitz. A legenda de cores nas figuras indicam quais bancos de dados de domínios proteicos foram acessados.

5.4.3 - Fragmentos de inibidores BPTI e evidência de triplo-domínio.

O *singleton* A7S2W_1 (A7S2W) codifica um fragmento de inibidor BPTI, identificado pelo InterProScan. Este fragmento de 32 aminoácidos tem 79% de similaridade com inibidores tipo Kunitz de anêmonas. Dentre eles, a toxina *APEKTx1* de *Anthopleura elegantíssima* que bloqueia de forma potente

e seletiva canais de potássio em camundongos (Peigneur *et al.*, 2011). O fragmento A7S2W tem também 75% de similaridade com um inibidor descrito na serpente *Phylodrias olfersii* (Fry *et al.*, 2008).

O *isotig* A90YR_1 (A90YR) codifica um fragmento contendo um domínio íntegro BPTI. Este fragmento é similar a inibidores triplo-domínio envolvidos na coagulação, descritos em humanos, macacos, ratos e em algumas serpentes, entre outros animais (e.g. Wesselschmidt *et al.*, 1990; Kamei *et al.*, 1994, Vonk *et al.*, 2013). Este tipo de inibidor tem habilidade de se associar com lipoproteínas do plasma e apresenta ação antitrombótica, inibindo, por exemplo, os fatores X e VII de coagulação. Se presente no veneno, ele poderia inibir a toxina fator de coagulação Xa presente na glândula, prevenindo ação tóxica endógena. Outra possibilidade é ela ter evoluído para agir como toxina interferindo no sistema de coagulação da presa.

5.4.4 - Inibidores Kunitz-WAP.

Um conjunto de três *singletons* foi identificado como transcritos de KuWAP, similares à KP-Sut-1 da Elapidae *Suta fasciata* (67%) e às proteínas *Fused toxin isoform* e *Ku-wap-fusin* de diferentes subespécies de *Sistrurus catenatus* (Viperidae) (aproximadamente 65%). O *singleton* BC71L_1 (BC71L) codifica uma proteína completa e a detecção de seus domínios está apresentada na FIG. 30. Outros *singletons* codificam fragmentos deste mesmo tipo de KuWAP (BD7U0 e B4FL4). Curiosamente, o *singleton* B4FL4 é similar às KuWAP, mas apresenta uma mutação que descaracteriza o domínio WAP da proteína. Uma característica diferente destas KuWAP para aquelas já descritas, é a presença de uma região repetitiva rica em resíduos polares dentro do domínio WAP, formado principalmente por repetição de glutamina ou treonina (FIG. 31). Estas proteínas apresentam diferenças em suas sequências que podem ser explicadas por algumas deleções pontuais observadas nas sequências genéticas, em regiões repetitivas de adenina, que geraram um deslocamento do *frame* de leitura (FIG. 32) e consequentemente uma sequência diferente de aminoácidos (FIG. 31). O pirosequenciamento tem uma limitação técnica na leitura de homopolímeros superiores a quatros

nucleotídeos, podendo gerar erros de leitura (Shin e Park, 2014), o que poderia também justificar a não uniformidade destas sequências. Infelizmente a sequência consenso destes três *singletons* insere um stop códon que descaracteriza a KuWAP e a obtenção de mais sequências deste tipo poderão elucidar este novo tipo de KuWAP.

FIGURA 30. Representação gráfica dos domínios identificados na sequência de aminoácido do *singleton* BC71L, pelo InterProScan 4.8. No mesmo transcrito estão um domínio BPTI na porção N-terminal e um domínio WAP na porção C-terminal. A legenda de cores na figura indica quais bancos de dados de domínios proteicos foram acessados.

FIGURA 31. Alinhamento MUSCLE gerado pelo programa SeaView v.4 dos *singletons* A5QV8, BC71L, BD7U0 e BAFL4 que codificam KuWAPs. O final do peptídeo sinal e início da proteína madura estão indicados pela seta. O sítio de inibição BPTI está indicado por uma caixa preta. O domínio N-terminal BPTI está destacado por uma caixa laranja e o domínio WAP C-terminal por uma caixa amarela. A perda da segunda cisteína de A5QV8 está indicada por um raio vermelho. O código de coloração Clustal indica pela mesma cor quais resíduos têm características semelhantes.

FIGURA 32. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos *singletons* BAFLA4, BC71L e BD7U0, por MUSCLE. O códon iniciador ATG está representado pela seta preta. A região repetitiva que codifica um peptídeo rico em glutamina ou treonina está dentro da caixa vermelha. As caixas amarelas representam homopolímeros de adenina com deleções que podem ser resultantes de erro de sequenciamento. Os colchetes pretos representam o stop códon TGA de BC71L e BD7U0. BAFL4 não apresenta stop códon e é considerado um fragmento. Consensus é a sequência consenso resultante do alinhamento dos três *isotigs*.

O *singleton* A645S também contém a mensagem de um KuWAP similar a ku-wap-fusin de *Sistrurus catenatus edwardsi*, porém truncada de forma que a informação está dividida em vários *frames* de leitura, sendo um indício de acúmulo de mutações.

Um novo tipo de KuWAP foi identificado no *singleton* A5QV8. Por causa de seu domínio BPTI, ele se assemelha mais (76%) com *kunitoxin-1* monodomínio de *Philodryas olfersii* (Fry *et al.*, 2008) do que com o KuWAP mais similar (39%) *KP-Sut-1* de *Suta fasciata* (Jackson *et al.*, 2013). Ele tem uma característica interessante que é a perda da segunda cisteína do inibidor maduro, que por homologia estaria envolvida em uma ligação dissulfeto importante na estrutura tridimensional da proteína próximo ao provável sítio inibidor. Ela foi detectada na sequência genética como uma transversão G → C, modificando o códon TGT (codifica cisteína) por TCT (codifica serina). Todas as sequências de aminoácidos de KuWAP de *P. textilis* foram alinhadas e estão apresentadas na FIG. 31.

5.4.5 - Waprin e isoformas.

Os *singletons* A2RRR e A9P90 são idênticos e codificam o único WAP encontrado neste transcriptoma. Este tipo de WAP é diferente dos já descritos, sendo 49% similar ao WAP mais próximo, a Veswaprin da Elapidae *Demansia vestigiata* (St. Pierre *et al.*, 2008). Ao analisar a sequência proteica, foi possível detectar tanto o peptídeo sinal quanto uma região transmembranar na porção N-terminal, indicando que este inibidor WAP pode ficar associado à membrana e pode não ter função tóxica.

5.4.6 - Considerações sobre a evolução dos peptídeos tipo Kunitz, WAP e KuWAP.

A grande diversidade aqui relatada deste tipo de proteínas cujos transcritos foram identificados na glândula de veneno de *Pseudonaja textilis*, foi recentemente relatada também em glândulas de veneno de outras espécies de

Elapidae australianas (Jackson *et al.*, 2013). Em uma pesquisa anterior de St. Pierre e colaboradores (2008), os autores sugerem com base no compartilhamento de peptídeo sinal e na estrutura dos genes dos peptídeos inibidores tipo Kunitz e waprins que estas proteínas surgiram após a duplicação de um gene ancestral comum, e que a diversificação subsequente tenha ocorrido apenas nas regiões que codificam toxinas. Porém, devido a descoberta de grandes quantidades *de novos* transcritos codificando inibidores tipo Kunitz mono-domínio, domínio-duplo, *waprins* e KuWAPs, com base em análises filogenéticas, Jackson e colaboradores (2013) refutam esta hipótese de ancestralidade comum recente e sugerem que as Kunitz duplo-domínio são ancestrais destes tipos de toxinas. Porém, ambas as hipóteses ignoram a existência de todos estes tipos de variantes de inibidores em outros Reinos, como vegetais e protistas, evidenciando uma origem muito mais ancestral do que a do surgimento dos répteis. Com base nos resultados do transcriptoma acima descritos, há evidências de que a diversidade de transcritos codificando este grupo de peptídeos seja muito maior do que é hoje conhecida. A presença desta diversidade no veneno ainda precisa ser confirmada e, em caso positivo investigar qual a contribuição no envenenamento. A compreensão da evolução e dos mecanismos de ação destas mesmas famílias de proteínas nos diversos tipos de organismos vivos em diferentes tecidos deverá ajudar na compreensão de sua função no veneno e glândula de veneno de serpentes. Futuras pesquisas de identificação e sequenciamento em larga escala destas famílias de proteína nas serpentes venenosas deverão colaborar na melhor compreensão de seu processo evolutivo e adaptativo.

5.5 – Lectinas do tipo C.

Dois tipos de Lectinas tipo C (CLect) encontradas no veneno de serpentes são categorizadas de acordo com características estruturais e propriedades funcionais. As mais comumente descritas em Elapidae são lectinas ligantes de galactose ou manose estruturadas em homodímeros de 26 a 28 kDa que aglutinam eritrócitos via ligação a carboidratos. No domínio de reconhecimento de carboidratos, os sítios de ligação QPD (Gln-Pro-Asp) para

galactose e EPN (Glu-Pro-Asn) para manose são os mais comuns e importantes na identificação de cada tipo. Sua função no veneno ainda não está clara, pois são pouco tóxicas. Já as *C-type lectin-like protein* (CLP) não apresentam o loop de ligação a açúcar. As CLP são bem descritas em Viperidae (e.g. convulxina de *Crotalus durissus terrificus*) e são compostas de heterodímeros na forma monomérica ou oligomérica $(\alpha\beta)_x$ que desregulam a hemostase das presas ao ativar ou inibir diversos componentes plasmáticos ou células sanguíneas, geralmente plaquetas (Du e Clemetson, 2009).

Para *P. textilis*, Earl *et al.* (2010, não publicado) depositaram em banco de dados públicos cinco sequências de cDNA de CLect ligantes de galactose e de manose. Jackson *et al.* (2013) também identificaram cDNAs de variantes de CLect em *Pseudonaja modesta*.

5.5.1 – Transcriptoma.

O isogrup 13 contém os *isotigs* 145 a 148 que codificam a mesma isoforma de *venom C-type lectin galactose binding isoform variant 1* (96% de similaridade), contendo o sítio QPD. Esta variação tem poucas substituições e pode ter origem na variação genética individual. Curiosamente, ao alinhar o *isotig* 148 com os outros do *isogroup* 13 observa-se uma inserção no início do transcrito, que recua o provável início da tradução em 16 aminoácidos. Este alongamento do peptídeo sinal não modifica a sequência do precursor da CLect, porém transformaria o peptídeo sinal em uma região transmembranar, segundo previsão do TMHMM Server v.2.0.

O *isotig* 954 codifica uma CLect QPD ligante de galactose, nunca antes descrita em Elapidae, similar a uma CLect de *Crotalus adamanteus* (J3S814_CROAD) (Rokyta *et al.*, 2012) e *Lachesis muta* (Q27J51_9SAUR) (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2006), ambas identificadas apenas por transcriptômica. Ela se assemelha pouco às CLect de veneno como, por exemplo, a *C-type lectin galactose-binding isoform* (LECG_PSEPO) de *Pseudechis porphyriacus* com apenas 32% de similaridade (Earl *et al.*, 2011).

O *isotig* 1256 codifica um fragmento de CLect, contendo o sítio EPN, 95% similar a um tipo descrito em *Pseudonaja modesta* (Jackson *et al.*, 2013). Uma região transmembranar foi detectada na porção N-terminal da proteína indicando a possibilidade de ser uma CLect endógena acoplada à membrana celular. O *singleton* BBHPD, que também contém EPN, codifica um fragmento 100% similar ao fragmento correspondente da *venom C-type lectin mannose binding isoform 3* de *P. textilis* (D2YVJ2_PSETE).

O *isogroup* 103 contém os *isotigs* 335 e 336 que codificam fragmentos N-terminal similares a *mannose-binding isoform 5* de Elapidae. Estes *isotigs* contêm um sítio EPG (Glu-Pro-Gly) em substituição aos sítios clássicos. Poucas sequências foram detectadas nos bancos de dados contendo este *motif*, que foram descritas nas Elapidae *Pseudonaja modesta*, *Suta nigriceps*, *Brachyuropsis roperi*, *Pseudechis australis*, *Hoplocephalus bungaroides* e *Notechis scutatus*, mas os efeitos desta mutação ainda são desconhecidos.

Para melhor visualizar as relações de semelhança entre estes transcritos, uma árvore foi gerada pelo método de máxima verossimilhança (PhyML no Seaview; parâmetros: *LG model, bootstrap 1000 replicates, best of NNI & SPR, add 3 random starts*) usando como *outgroup* sequências distantes, porém semelhantes, de *Anolis carolinensis*, *Chelonia mydas* entre outras espécies (FIG. 33).

A filogenia destas proteínas não agrupou as proteínas por espécie ou gênero, posicionados de forma polifilética na árvore. No entanto é provável que ela reflita a evolução dos genes após duplicações sucessivas anteriores aos eventos de surgimento destes grupos de serpentes.

É possível observar que as CLect de veneno formam um *cluster* monofilético. Com exceção do *isotig* 954 (contém QPD), todas as sequências identificadas no transcriptoma estão inseridas no *cluster* de CLect de veneno. O *isotig* 954 agrupou-se com a CLect 17 identificada em glândula de veneno de *Crotalus adamanteus* e a proteína *aggrecan core-like* de *A. carolinensis* no *cluster* mais externo, indicando que esta CLect deve ser uma proteína fisiológica comum, ancestral às toxinas e às outras CLect escolhidas como

outgroup. As outras sequências escolhidas como *outgroup* agruparam-se no grupo irmão das CLect de veneno.

É interessante observar que dentro do *cluster* das CLect de veneno, aquelas ligantes de galactose formam um subgrupo derivado das ligante de manose, dentro do qual os *isotigs* 145 ao 148 formam um subgrupo monofilético. As sequências de sítio EPG (335 e 336) se agruparam com outras contendo EPG. Nenhuma sequência do transcriptoma se agrupou com as CLP, descritas em Viperidae, que se agruparam em um único *cluster*. A árvore filogenética apresentada a seguir (FIG. 33) nos dá uma ideia da proximidade dos transcritos identificados com as CLect já descritas, mas para elucidar a história evolutiva deste grupo poligênico multifuncional é preciso analisar as relações filogenéticas com uma amostragem mais ampla e com métodos mais robustos.

5.5.2 – Proteoma.

Foi possível identificar, pela primeira vez em nível proteico, as CLect no veneno de *P. textilis*. Nos spots 142, 143, 151, 152 e 154 identificou-se as *galactose-binding* CLect identificadas nos *isogroup* 13 e outras similares já descritas em outras espécies (FIG. 7). Nenhum outro tipo de CLect identificada no transcriptoma foi identificada no veneno, tampouco peptídeos derivados de CLP.

5.6 – Cystein rich secretory protein: CRiSP.

A família das *Cystein Rich Secretory Protein* (CRiSP) é encontrada em uma grande diversidade de espécies e em diferentes tecidos. As CRiSP são proteínas com massa ~23 kDa e já foram isoladas dos três principais grupos de serpentes venenosas: Colubridae, Viperidae e Elapidae. A sua sequência é bem conservada entre as espécies, inclusive a característica que a nomeou, as 16 cisteínas envolvidas nas oito pontes dissulfeto. Embora algumas funções tenham sido identificadas para algumas espécies e a estrutura tridimensional esteja resolvida, no geral pouco se conhece sobre suas funções, atividades biológicas e sítios ativos (Heyborne e Mackessy, 2009).

A toxina *helothermine* foi descrita pela primeira vez em lagartos venenosos do gênero *Heloderma* e altera em camundongos a atividade de canais iônicos causando letargia, paralisia parcial dos membros posteriores e diminuição da temperatura corpórea (Mochca-Morales *et al.*, 1990; Morrisette *et al.*, 1995). Nas Elapidae, a CRiSP mais estudada é a *pseudechetoxin* da espécie australiana *Pseudechis australis*, que age inibindo a contração de músculos lisos e bloqueando canais de íons CGN (cyclic nucleotide-gated ion channel). Já a *pseudecin* da espécie *Pseudechis porphyriacus*, que tem 97% de identidade, apresenta uma potência menor o que indica que pequenas modificações podem alterar a potência ou função (Brown *et al.*, 1999). Em *P. textilis* uma CRiSP denominada *pseudechetoxin-like* foi descrita, porém sua função continua desconhecida (St. Pierre *et al.*, 2005).

5.6.1 - Transcriptoma.

O *isotig* 418 codifica a *pseudechetoxin-like* já descrita em *P. textilis* (St. Pierre *et al.*, 2005). Uma deleção foi detectada no domínio ShKT. Por homologia em outras espécies, o domínio ShKT é uma das regiões responsáveis pelo bloqueio de canais iônicos com seis cisteínas conservadas (Dauplais *et al.*, 1997). Esta deleção modifica o *frame* de leitura a partir do resíduo 214, eliminando quatro das seis cisteínas essenciais para a estrutura tridimensional característica. Esta deleção pode ser natural ou pode ser oriunda de um erro de sequenciamento, pois foi detectada em um homopolímero de adeninas (Shin e Park, 2014). Se esta deleção for natural é possível que esta CRiSP tenha outra função do que aquela descrita em *Pseudechis australis*. O *singleton* A71FI contém um pequeno fragmento pertencente a uma porção interna desta CRiSP.

5.6.2 – Proteoma.

Nos spots 60, 114 e 115 do gel 2D (FIG. 7), a CRiSP *pseudechetoxin-like* foi identificada. Os peptídeos estão posicionados dentro do domínio SCP (Sperm Coating Protein) e não foi possível confirmar ou refutar a existência da mutação encontrada no transcriptoma. Pela primeira vez a CRiSP foi identificada em nível de proteína no veneno desta espécie. As posições distintas dos spots no gel indicam a provável existência de isoformas ou modificações postraducionais. Devido à potência da *pseudechetoxin* no envenenamento por *Pseudechis australis*, investigações sobre a função da CRiSP em *P. textilis* são importantes.

5.7 – Metaloproteínases de veneno.

As metaloproteínases de veneno de serpentes (SVMP) formam uma família poligênica de enzimas, bem caracterizadas por serem encontradas em grande quantidade no veneno da maioria dos Viperidae e Colubridae. No local da picada, induzem hemorragia, edema, mionecrose, formação de bolhas, dermonecrose e reação inflamatória além de efeitos sistêmicos como, por

exemplo, coagulopatia, fibrinólise, indução de apoptose e ativação do fator X e protrombina (Markland e Swenson, 2013). Elas são categorizadas, de acordo com a composição de seus domínios, em P-I, P-II e P-III. Na forma de precursor, as três classes apresentam as regiões peptídeo sinal, pré e prodomínio. As P-I contém um domínio peptidase M12B, as P-II contém adicionalmente na porção C-terminal um domínio disintegrina ADAM, as P-III somam a estes dois domínios um domínio rico em cisteínas. Elas ainda podem ser sub-classificadas de acordo com modificações pós-traducionais como dimerização ou dissociação de domínios por proteólise (FIG. 34). Existem também as P-III com uma lectina tipo C ligada à porção rica em cisteínas por uma ponte dissulfeto, chamadas de P-III_d ou P-IV (Gutiérrez *et al.*, 2009).

FIGURA 34. Figura reproduzida de Casewell *et al.*, 2011. Representação dos domínios componentes das classes P-I, P-II e P-III de SVMP e suas subclasses. SP: peptídeo sinal; P: prodomínio; Pro: prodomínio; Metalloproteinase: domínio peptidase M12B; DIS: domínio disintegrina; CYS: domínio rico em cisteínas; DIS-like: domínio tipo disintegrina.

As SVMP foram recrutadas para a glândula de veneno antes da origem das serpentes avançadas e o gene tem sua origem nas metaloproteínas de membrana do tipo ADAM, das quais os domínios EGF, transmembrana e citoplasmático, na porção C-terminal, foram perdidos. As SVMP evoluem por sucessivas duplicações e perdas de domínios, sendo as P-III as mais ancestrais (Casewell, 2012; Casewell *et al.*, 2011). Estudos recentes encontraram em *Echis* e *Psammophis* transcritos de SVMP que contêm apenas

o propeptídeo e que por um processo de neofuncionalização podem ter se tornado neurotoxinas (Brust *et al.*, 2013).

Em Elapidae algumas P-III foram descritas, em poucas espécies, por exemplo, em *Naja atra* (Guan *et al.*, 2010), *Pseudechis australis* (Georgieva *et al.*, 2011) e *Pseudechis guttatus* (Viala *et al.*, manuscrito em preparação). Em outras Elapidae, Spencer *et al.* (comunicação pessoal) testaram a atividade hemorrágica do veneno total *in vivo* e detectaram bandas de SVMP por western-blot anti-jararagina, uma P-III hemorrágica de *Bothrops jararaca*. Apesar de estas SVMP terem homologia estrutural suficiente com a jararagina para uma imunodeteção cruzada positiva por western blot, nem todas apresentaram atividade hemorrágica. Neste estudo detectaram-se bandas imunorreativas de SVMP em *P. textilis*, sem atividade hemorrágica *in vivo*. Uma sequência de cDNA de SVMP de *P. textilis* (*textilease-1*) está disponível no banco de dados NCBI (Accession: EF199640), porém não há publicação relacionada contendo maiores informações (Birrel *et al.*, não publicado).

5.7.1 – Transcriptoma.

Algumas sequências foram identificadas como *textilease-1*, porém todas apresentam mutações que inviabilizam a tradução da proteína codificada. Em relação ao cDNA descrito da *textilease-1*, os *isotig* 163, 164 e 406 contêm inúmeras mutações. O *isotig* 1246 codifica um fragmento de 120 resíduos correspondente à porção C-terminal do domínio rico em cisteínas, com três mutações pontuais que não modificam o padrão de cisteínas. O *singleton* A619A contém uma sequência que codifica um fragmento da região 5'UTR, o peptídeo sinal e uma sequência sem registros nos bancos de dados.

O *singleton* BDL DY codifica um fragmento com 82% de identidade com uma porção do domínio peptidase da P-III clonada e identificada no veneno de *Naja atra* (Accession: VM3_NAJAT) (Guo *et al.*, 2007). Outros *singletons* foram identificados codificando fragmentos de metaloproteínases de matriz e mitocondriais, provavelmente enzimas endógenas envolvidas na homeostase celular.

Apesar de não ter sido possível obter uma sequência completa e íntegra deste tipo de SVMP no transcriptoma, os fragmentos identificados evidenciam de sua existência no genoma da espécie, sendo que as mutações observadas podem ser consequência de variabilidade genética individual ou um indício de acúmulo de mutações pré-adaptativas em um possível processo de neofuncionalização ou de perda de função ecológica e consequente diminuição de pressão seletiva.

5.7.2 - Clonagem de um transcrito de SVMP.

Com o uso de *primers* desenhados especificamente para seu anelamento em regiões UTR de transcritos de SVMP P-III, foi possível clonar um transcrito identificado como P-III similar a *textilease-1*, com poucas diferenças (99% de identidade). Em relação à *textilease-1*, as diferenças detectadas não modificam drasticamente a sequência de aminoácidos deduzida, logo, as cisteínas envolvidas nas pontes dissulfeto, os domínios e o sítio ativo DCD do domínio disintegrina estão conservados. A proteína apresenta os domínios esperados em uma PIII, como o peptídeo sinal, o propeptídeo e os domínios metaloproteinase, disintegrina e rico em cisteínas (FIG. 35). Da sequência deduzida de aminoácidos foi possível identificar o peptídeo sinal e calcular características bioquímicas como a massa molecular da proteína secretada (66.395,7 Da) e o pI teórico (4,9). O propeptídeo, normalmente ausente em SVMPs maduras, foi deduzido por alinhamento com outras SVMPs semelhantes e as prováveis massas e pI desta SVMP de *P. textilis* madura foram calculadas em 46507 Da e 5,27, respectivamente.

FIGURA 35. Representação gráfica dos domínios identificados na sequência de aminoácido derivada do clone de SVMP, pelo InterProScan 4.8. Estão presentes os domínios característicos de uma PIII: propeptídeo, metaloproteínase, disintegrina e rico em cisteínas.

5.7.3 - Proteômica, purificação e detecção de SVMP.

Na tentativa de complementar os resultados de proteômica, nos quais não foi possível identificar SVMP, foi realizado um fracionamento do veneno total por cromatografia líquida (Akta - GE) de afinidade a metal. Das quatro frações coletadas, duas bandas foram imunorreativas usando anti-jararagina policlonal, indicando a presença de SVMP homólogas à jararagina de *Bothrops jaracaca* no veneno de *P. textilis*. A migração das bandas em ~120 e ~90 kDa corresponde a massas superiores a P-III, indicando a presença de P-IIIc e/ou P-IV. Apesar de a jararagina ser uma P-III com forte atividade hemorrágica (Laing e Moura-da-Silva, 2005), o veneno de *P. textilis* não apresenta a mesma ação hemorrágica quando injetado pela via intradérmica em dorso de camundongo (Spencer, comunicação pessoal). Destes dados, supõe-se que (1) a SVMP de *P. textilis* é uma P-III que não apresenta ação hemorrágica devido a mutações específicas nos sítios ativos e pode apresentar outra função ou (2) a SVMP presente no veneno de *P. textilis* é hemorrágica, mas a quantidade e/ou especificidade não é suficiente para promover hemorragia em camundongos, podendo promover hemorragia em grandes quantidades ou em certas presas que façam parte de sua dieta natural. Futuros ensaios de sequenciamento de genes e transcritos, purificação da proteína e

identificação por espectrometria de massas irão elucidar as formas presentes no veneno e suas funções.

5.8 - Transcritos de interesse não identificados no veneno.

Alguns transcritos identificados como toxina ou possíveis toxinas no transcriptoma não foram identificados em nível proteico no veneno. Tendo em vista que: (1) Há nas células uma diversidade complexa de mecanismos regulatórios que, por exemplo, permite ou não a tradução de um RNAm em proteína ou degrada proteínas recém traduzidas antes ou depois do processo de maturação (Alberts *et al.*, 2002); (2) O transcriptoma é derivado de um único indivíduo macho e a variação genética e epigenética entre indivíduos de uma mesma espécie pode interferir na identificação destes compostos. (3) Há limitações técnicas no 2D-PAGE, como por exemplo, a manipulação das amostras, a perda de peptídeos inferiores a 10 kDa no gel, a resolução limitada de *pI* e limitações na coloração das moléculas no gel e consequentemente na observação e coleta dos spots. (4) Finalmente, a capacidade de ionização de certos peptídeos devido a sua carga e composição de aminoácidos limita a sua detecção em espectrômetros de massas.

A seguir se discorre sobre famílias de toxinas, prováveis toxinas ou proteínas de veneno encontradas no transcriptoma sem correspondência neste proteoma.

5.8.1 - Peptídeos natriuréticos.

Os peptídeos natriuréticos (NP) são moduladores de volume dos fluidos corporais com papéis natriurético (excreção de sódio na urina) e diurético (aumento na produção de urina), encontrados em animais e bactérias. Os NP de veneno de répteis, homólogos aos NP fisiológicos, agem diminuindo o volume sanguíneo nos vasos das presas, induzindo hipotensão imediata o que dificulta sua locomoção e facilita consequentemente a captura (Vink *et al.*, 2012). O primeiro NP descrito em serpentes foi o DNP da Elapidae *Dendroaspis angusticeps*, de 38 aminoácidos e 4 kDa (Schweitz *et al.*, 1992).

5.8.2 – Cobra Venom Factor e o sistema complemento.

O *Cobra Venom Factor* (CVF) é um análogo estrutural e funcional ao componente C3b do sistema complemento (Fritzinger *et al.*, 1994). O complexo CVF/Bb é uma C3/C5 convertase estável, resistente aos mecanismos de regulação pelos fatores H, que esgota a atividade do sistema complemento essencial para a resposta imune (Murphy *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2010; Kock *et al.*, 2004). Inicialmente isolado e descrito em Elapidae, como as espécies de cobras *Naja*, *Ophiophagus* e *Austrelaps* (Fritzinger *et al.*, 1992; Rehana e Kini, 2007; Zeng *et al.*, 2012), o seu cDNA também foi descrito em glândula de veneno de *Crotalus* (Viperidae) (Rokyta *et al.*, 2012; Rokyta *et al.*, 2013). O seu papel no envenenamento ainda não foi elucidado, mas tem sido utilizado para depleção terapêutica do sistema complemento em humanos (Vogel e Fritzinger, 2010). Sua sequência parcial foi identificada pelos *singletons* A5YBF, A9LX7 e AWSDT.

5.8.3 – Hialuronidase.

O *isogroup* 46 codifica a hialuronidase, uma enzima responsável pela degradação do hialuronan, um glicosaminoglicano constituinte da matriz extracelular e de tecidos conectivos de vasos sanguíneos. Sendo assim, seu papel nos venenos de serpentes, quando presente, é primariamente descrito como sendo um fator de espalhamento do veneno no local da picada aumentando o potencial tóxico do veneno e provocando danos no local da picada (Kemparaju *et al.*, 2009). O *isotig* 221 codifica uma hialuronidase de alta similaridade (>80%) com as descritas em outras serpentes. Em Elapidae, esta enzima foi identificada em transcriptoma de *Micrurus fulvius* (Margres *et al.*, 2003) e genoma de *Ophiophagus hannah* (Vonk *et al.*, 2013). Já o *isotig* 222 codifica uma hialuronidase chamada de truncada, não usual, que é uma versão reduzida, pois apresenta em relação à hialuronidase citada acima uma grande deleção. Este tipo de transcrito já foi observado em Viperidae como *Echis*, *Cerastes* e *Bitis* (Harisson *et al.*, 2007). Porém, neste transcrito não foi detectado peptídeo sinal e foram detectados domínios transmembrana e citoplasmáticos, indicando que esta forma não deve ser secretada no veneno.

5.8.4 – Transferrina.

Transferrinas foram identificadas no proteoma do veneno de *Pseudechis australis* (Georgieva *et al.*, 2011) assim como no veneno de *P. guttatus* (manuscrito em elaboração). Ensaio mostram atividade antimicrobiana da transferrina e sugeriu-se que ela tenha esta função no veneno de *P. australis* (Georgieva *et al.*, 2011). As transferrinas são proteínas secretadas que têm como função fisiológica transportar íons de ferro pelo organismo, mas também têm a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica via receptores (Liao *et al.*, 2001) e poderia estar envolvida no carregamento de toxinas para o sistema nervoso central das presas. O *isotig* 390 codifica uma transferrina similar (~80%) a outras descritas em serpentes como na glândula de veneno de *Crotalus horridus* (Rokyta *et al.*, 2013) e no genoma de *Boaedon fuliginosus*, *Natrix natrix*, *Python bivittatus* e lagartos (~60%) como, por exemplo, *Anolis carolinensis* (Ciurazskiewicz *et al.*, 2007).

5.8.5 – Dipeptidilpeptidase-IV

Dipeptidilpeptidases-IV (DPP4) foram identificadas e descritas em venenos de serpentes e clonadas de suas glândulas de veneno (Ogawa *et al.*, 2006; St. Pierre *et al.*, 2007b; Faiz *et al.*, 1996; Gasparello-Clemente e Silveira, 2002). As DPP4, proteínas membranares do tipo II, são serinopeptidases S9 responsáveis pela remoção sequencial de dipeptídeos da extremidade N-terminal não substituída de polipeptídeos, na condição de o penúltimo aminoácido ser uma prolina (Ikehara *et al.*, 1994). Sua função no veneno ainda é desconhecida, mas foi sugerido que ela possa agir no envenenamento interferindo na homeostase, por inativar peptídeos como o glucagon, ou agir nos sistemas imune e neuroendócrino (Ogawa *et al.*, 2006). Ela poderia também participar do processamento de algumas pré-toxinas. O *isotig* 723 codifica um fragmento C-terminal, truncado em dois *frames*, de uma DPP4. Sua sequência é idêntica a parte do cDNA descrito em *P. textilis* (GenBank: ABQ63100) (St. Pierre *et al.*, 2007b). Alguns *singletons* também codificam fragmentos desta DPP4, alguns contendo mutações que inserem códons de parada e mudanças de *frame* de leitura. O *singleton* BC4UZ codifica um

fragmento de uma DPP 4 denominada de *dipeptidylpeptidase 8* cujo cDNA foi sequenciado de glândula de veneno de *Crotalus* (Rokyta *et al.*, 2012; Rokyta *et al.*, 2013). É importante ressaltar que a dipeptidase 2 indentificada no proteoma de *P. textilis* (spot 157) pertence a outra família de peptidase (M19), sem similaridade com a DPP4.

5.8.6 – Veficolin.

O *singleton* AUJZW foi identificado como contendo um fragmento de veficolin, similar aos ryncolins de *Cerberus rynchops* (Colubroidea). Outros *singletons* também foram identificados, porém com sequências truncadas e fora de *frame* de leitura. Os veficolins são ficolins de veneno, descritos no veneno da serpente *C. rynchops*, denominados ryncolin, que apresentam um domínio colágeno na região N-terminal e um domínio fibrinogênio na porção C-terminal (OmPraba *et al.*, 2010). A sequência de AUJZW, analisada no InterProScan, contém o domínio globular C-terminal das cadeias alpha, beta e gama do fibrinogênio, onde foi detectado o sítio conservado do fibrinogênio WWYGACHSSNLNG, de acordo com o padrão W-W-[LIVMFYW]-x(2)-C-x(2)-[GSA]-x(2)-N-G (Doolittle, 1984). Evidências de sua existência foram descritas por transcriptômica no duto venenífero do dragão de Komodo *Varanus komodoensis* e outros lagartos (Fry *et al.*, 2010; Fry *et al.*, 2013) e nas serpentes (Colubroidea) *Pseudoferania polypepis* e *Philodrias olfersii* (Fry *et al.*, 2012), sendo pela primeira vez descrita em Elapidae. A identificação de transcritos de veficolin em Elapidae é importante para futuras análises filogenéticas e compreensão da história evolutiva dos répteis. OmPraba e colaboradores (2010) identificaram os veficolins por MS usando na análise “prolina hidroxilada” como uma modificação variável. Este método foi aplicado na análise do proteoma de *P. textilis*, mas nenhuma veficolin foi identificada. Análises posteriores do veneno deverão elucidar se este tipo de toxina está presente no veneno de *P. textilis*, e qual sua função no envenenamento.

5.9 – Toxinas de lagartos do gênero *Heloderma*.

Foram identificados no proteoma do veneno de *P. textilis*, peptídeos de quatro toxinas presentes no veneno de lagartos do gênero *Heloderma*: *exendin-2 long* (EXE2_HELSU), *exendin-4* (EXE4_HELSU), *helokinstatin-1* (HKS_HELHO) e *kallikrein-toxin* (C6EVG4_HELSC) (Anexo 1). As *exendin* formam uma família de peptídeos similares e derivados dos hormônios secretina (Irwin, 2012). A *exendin-2 long* é um peptídeo vasoativo intestinal que induz hipotensão nas presas mediada pelo relaxamento do miocárdio (Tsueshita *et al.*, 2004), e a *exendin-4*, também hipotensiva, mimetiza o glucagon e permitiu o desenvolvimento do fármaco antidiabético Byetta® estimulador de produção de insulina (Furman, 2012). A *helokinstatin-1*, derivada de um decapeptídeo, antagoniza a ação vasodilatadora das bradicininas nos receptores B2 de bradicinina (Kwok *et al.*, 2008). E finalmente a *kallikrein-toxin*, descrita de cDNA (Fry *et al.*, 2010), é uma serino protease do tipo kalikreina de atividade desconhecida, cuja sequência é similar a *gilatoxin* (Utaisincharoen, 1993). A *gilatoxin*, similar a *batroxobin* (Itoh *et al.*, 1987) e *crotalase* (Henschen-Edman *et al.*, 1999), tem atividade de kalikreina e pode ser um potencializador do efeito hemorrágico das toxinas do veneno de *Heloderma* (Utaisincharoen, 1993).

Evidências da presença destas famílias de toxinas no veneno das serpentes são importantes, pois além de caracterizar todo um novo grupo de toxinas e possíveis sintomas em *Pseudonaja*, ainda reforçam a hipótese de que o sistema venenífero, restrito a algumas espécies de serpentes e lagartos atuais, tenha se originado na ordem Squamata durante o período Jurássico entre 200 e 150 milhões de anos atrás, no clado denominado Toxicofera, contendo Anguimorpha, Iguania e Serpentes (Vidal e Hedges, 2009). Evidências morfológicas e moleculares em serpentes e lagartos suportam a hipótese de o sistema venenífero ser um caráter primitivo de Toxicofera (Fry *et al.*, 2010; Fry *et al.*, 2006).

Os peptídeos foram detectados em spots que não apresentaram um padrão óbvio de migração e nem formação de *clusters*, como observado nas outras toxinas identificadas no veneno. Estes peptídeos sempre foram

identificados em spots contendo outras toxinas como VF5a, PLA2, VF5a+PLA2 e CRiSP (TAB. 8).

TABELA 8. Spots do 2D-PAGE contendo toxinas de *Heloderma* e VF5a, PLA2 e CRiSP.

Spot	<i>Exendin-2 long</i>	<i>Exendin-4</i>	<i>Helothermine-1</i>	<i>Kallikrein toxin</i>	VF5a	PLA2	CRiSP
98	X		X	X	X		
99	X		X	X			
130, 131	X				X	X	
114, 115	X						X
139	X					X	
112, 119, 121, 132- 134, 136	X				X		
126	X	X			X		

O peptídeo YLASILGSR foi o identificado pelo PEAKS em um total de 19 espectros de massas, reforçando a existência deste peptídeo no veneno. Um exemplo de espectro de massas identificando este peptídeo está apresentado na FIG. 37.

FIGURA 37. Espectro de massas relativo ao peptídeo (sequência no topo) identificado no spot 130 do gel 2D de *Pseudonaja textilis*, como parte da toxina *exendin-2-long* do lagarto *Heloderma suspectum*. (scan nº F74:50210, do spot 130, m/z=490,34, RT=12,85). m/z = massa sobre carga. Intensity = intensidade relativa dos íons. Ions da série y e de fragmentação estão em vermelho e íons da série b estão em azul.

A análise do transcriptoma não detectou sequências contendo esta informação e pesquisas complementares em nível genético e proteico poderão esclarecer este fato.

5.10 - Proteínas de veneno candidatas a novas toxinas.

5.10.1 – Calreticulin.

No spot 71 (FIG. 7) foi possível identificar com cinco peptídeos e 9% de cobertura a proteína *calreticulin*, também identificada no transcriptoma no isotig 391. O isotig 391 codifica uma *calreticulin* com peptídeo sinal, sem regiões transmembranares, cuja massa e *pI* teóricos da proteína madura são ~47 kDa e 4.39, respectivamente. Esta proteína já foi identificada em glândula de veneno de *Micrurus* e *Crotalus* (Margres et al., 2013; Rokyta et al., 2013) e é altamente conservada entre as espécies (82% de identidade com humanos). Sua função é auxiliar no enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático e armazenar cálcio e está presente nas regiões intracelular, extracelular e associada à membrana (Gold et al., 2010). Sua presença no veneno poderia ser explicada (1) pelo método e condições de coleta, que eventualmente poderiam promover a ruptura de células do sistema venenífero e (2) pelo fato de uma molécula que auxilia o enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático em um órgão secretório de alta eficácia estar presente em grande quantidade. Apesar de sua aparente função homeostática endógena, sua presença no veneno não pode ser totalmente ignorada, pois está envolvida em inúmeras vias de sinalização celular, inclusive no processo de cicatrização (Gold et al., 2010).

5.10.2 - Dipeptidase 2

Foi identificada no spot 157 (FIG. 7), com base em três peptídeos e com 8% de cobertura, a proteína dipeptidase 2, descrita em *Ophiophagus hannah* (V8NS94_OPHHA), cuja sequência foi derivada do estudo de seu

genoma (Vonk et al., 2013). Estas proteínas não são descritas em serpentes e lagartos, tendo apenas um registro adicional de transcriptoma de glândula de veneno de *Crotalus adamanteus* (J3SEA2_CROAD) (Rokyta et al., 2012). As dipeptidases 2 pertencem à família M19 de peptidases de membrana e contêm um sítio ativo de dipeptidase renal. Estas peptidases estão envolvidas no metabolismo renal da glutathione e seus conjugados (Adachi et al., 1993). Ao analisar esta dipeptidase 2 de *O. hannah*, identifica-se um peptídeo sinal na porção N-terminal indicando secreção, porém também há uma porção transmembranar na região C-terminal indicando uma provável função na membrana das células da glândula. Sua presença na glândula de veneno ou no veneno precisa ser elucidada. Em nenhum *isotig* ou *singleton* identificou-se este tipo de peptidase, que não deve ser confundida com a dipetidilpeptidase IV identificada no transcriptoma.

6 – Conclusões.

- A análise combinada do transcriptoma e do proteoma foi bem sucedida na identificação de toxinas do veneno de *Pseudonaja textilis*.
- A análise de 43032 sequências do transcriptoma normalizado de glândula de veneno de *Pseudonaja textilis* permitiu evidenciar:
 - 113 transcritos de toxinas ou proteínas de veneno identificadas como fosfolipases A2 (PLA2), fatores de coagulação de veneno 5 (VF5a) e 10 ativados (VF10a), inibidores tipo kunitz, *three-finger toxin* (3FTx), metaloproteinases (SVMP), lectinas tipo C (CLect), CRISP, hialuronidase, *cobra venom factor*, peptídeos natriuréticos (NP), wap, veficolin, transferrin, calreticulin e dipeptidilpeptidase-4;
 - Dentre os *isotigs*, 17 novas variantes que codificam as toxinas VF5a (1), VF10a (2), *short* 3FTx (8), *long* 3FTx (1), CLect ligantes de galactose (4) e NP (1);
 - A sequência nucleotídica do transcrito da subunidade B da neurotoxina *textilotoxin*, de uma nova 3FTx longa e de um novo NP.
 - Uma grande diversidade de transcritos, incluindo aqueles contendo mutações deletérias, nas famílias 3FTx, inibidores tipo Kunitz, CLect e SVMP.
- A análise proteômica de 120 spots do gel 2D do veneno de *P. textilis* permitiu identificar:
 - Em 85 spots (71%) analisados foram identificadas proteínas de interesse;
 - As toxinas de serpentes VF5a, VF10a, inibidores de protease textilinin, PLA2s, 3FTx, CLect, CRiSP;
 - Inesperadamente, as toxinas de veneno de lagartos *Heloderma exendin-2*, *exendin-4*, *helokinestatin* e *kallikrein-like*;
 - Proteínas candidatas a toxina: dipeptidase-2 e *calreticulin*;

- Em 67 dos 85 *spots* positivos (79%) pelo menos um *isotig*, totalizando 19 *isotigs* correspondentes a VF5a, VF10a, Acidic PLA2, PLA2 *textilotoxin* A, CRiSP, LNTX-1, SNTx, NXS7, *textilinin*, CLect e *calreticulin*;
 - A presença da nova 3FTx longa codificada no *isotig* 1238;
 - Pela primeira vez nesta espécie a presença de CLect e CRiSP, até então apenas descritas em nível de transcrito.
-
- Um transcrito de SVMP PIII foi clonado e sequenciado.
 - Metaloproteinases foram detectadas no veneno de *P. textilis* por imunoreatividade cruzada.
 - A análise combinada do transcriptoma e do proteoma de veneno de *P. textilis* gerou dados para pesquisas em biologia e evolução dos répteis e evolução molecular de toxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, M. A.; QUINTERO-HERNANDEZ, V.; POSSANI, L. D. Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 74, p. 193–207, nov. 2013.
- ADACHI, H. et al. Importance of Glu-125 in the catalytic activity of human renal dipeptidase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1163, n. 1, p. 42–8, 21 abr. 1993.
- ALAGON, A. et al. Helodermatine, a kallikrein-like, hypotensive enzyme from the venom of *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard). **The Journal of experimental medicine**, v. 164, n. 6, p. 1835–45, 1 dez. 1986.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4th. ed. New York: Garland Science, 2002.
- ALLEN, G. E. et al. Clinical effects and antivenom dosing in brown snake (*Pseudonaja* spp.) envenoming--Australian snakebite project (ASP-14). **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e53188, jan. 2012.
- AQUILINA, J. A. The major toxin from the Australian Common Brown Snake is a hexamer with unusual gas-phase dissociation properties. **Proteins**, v. 75, n. 2, p. 478–85, 1 maio 2009.
- ARMUGAM, A. et al. Group IB phospholipase A2 from *Pseudonaja textilis*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 421, n. 1, p. 10–20, 1 jan. 2004.
- BARBER, C. M.; ISBISTER, G. K.; HODGSON, W. C. Solving the “Brown snake paradox”: in vitro characterisation of Australasian snake presynaptic neurotoxin activity. **Toxicology letters**, v. 210, n. 3, p. 318–23, 5 maio 2012.
- BARLOW, A. et al. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences**, Series B (Biological Sciences). v. 276, n. 1666, p. 2443–2449, 2009.
- BARNWAL, B.; KINI, R. M. Characterization of inflamin, the first member of a new family of snake venom proteins that induces inflammation. **The Biochemical journal**, v. 455, n. 2, p. 239–50, 15 out. 2013.
- BINGLE, L.; SINGLETON, V.; BINGLE, C. D. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. **Oncogene**, v. 21, n. 17, p. 2768–73, 18 abr. 2002.
- BIRRELL, G. W. et al. Molecular diversity in venom from the Australian Brown snake, *Pseudonaja textilis*. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 5, n. 2, p. 379–89, fev. 2006.

- BOS, M. H. A. et al. Venom factor V from the common brown snake escapes hemostatic regulation through procoagulant adaptations. **Blood**, v. 114, n. 3, p. 686–92, 16 jul. 2009.
- BOS, M. H. A.; CAMIRE, R. M. Procoagulant adaptation of a blood coagulation prothrombinase-like enzyme complex in australian elapid venom. **Toxins**, v. 2, n. 6, p. 1554–67, jun. 2010.
- BROWN, R. L. et al. Pseudechetoxin: a peptide blocker of cyclic nucleotide-gated ion channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 2, p. 754–9, 19 jan. 1999.
- BRUST, A. et al. Differential evolution and neofunctionalization of snake venom metalloprotease domains. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 12, n. 3, p. 651–63, mar. 2013.
- CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 1063–74, 15 jun. 2005.
- CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest Neartic rattlesnake venom. Evolutionary Clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 2, p. 1382–90, 3 mar. 2012.
- CALVETE, J. J. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 75, p. 44–62, 1 dez. 2013.
- CAMIRE, R. M.; BOS, M. H. A. The molecular basis of factor V and VIII procofactor activation. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 7, n. 12, p. 1951–61, dez. 2009.
- CASEWELL, N. R. et al. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 9, p. 2637–49, set. 2011.
- CASEWELL, N. R. On the ancestral recruitment of metalloproteinases into the venom of snakes. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 4, p. 449–54, 15 set. 2012.
- CHATRATH, S. T. et al. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides* by a combined transcriptomics and proteomics approach. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 2, p. 739–50, 4 fev. 2011.
- CHEN, Z.-Y. et al. Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 17, p. 13813–21, 20 abr. 2012.

- CHENG, A.-C. et al. A novel heparin-dependent inhibitor of activated protein C that potentiates consumptive coagulopathy in Russell's viper envenomation. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 19, p. 15739–48, 4 maio 2012.
- CHESTER, A.; CRAWFORD, G. P. In vitro coagulant properties of venoms from Australian snakes. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 20, n. 2, p. 501–4, jan. 1982.
- CHING, A. T. C. et al. Venomics profiling of *Thamnodynastes strigatus* unveils matrix metalloproteinases and other novel proteins recruited to the toxin arsenal of rear-fanged snakes. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 2, p. 1152–62, 3 fev. 2012.
- CHUNG, E.-H. et al. Molecular Cloning of Two cDNAs Encoding an Insecticidal Toxin from the Spider, *Araneus ventricosus*, and Construction of a Recombinant Baculovirus Expressing a Spider Toxin. **International journal of industrial entomology**, v. 4, n. 1, p. 43–49, 2002.
- CIDADE, D. A. P. et al. Bothrops jararaca venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 48, n. 4, p. 437–61, 15 set. 2006.
- CIURASZKIEWICZ, J. et al. Reptilian transferrins: evolution of disulphide bridges and conservation of iron-binding center. **Gene**, v. 396, n. 1, p. 28–38, 1 jul. 2007.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 21, n. 18, p. 3674–6, 15 set. 2005.
- DAUPLAIS, M. et al. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4302–9, 14 fev. 1997.
- DAVID, L. et al. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. **Molecular biology and evolution**, v. 20, n. 9, p. 1425–34, 1 set. 2003. DIAS, G. S. et al. Individual variability in the venom proteome of juvenile *Bothrops jararaca* specimens. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 10, p. 4585–98, 4 out. 2013.
- DOLEY, R. et al. Unusual accelerated rate of deletions and insertions in toxin genes in the venom glands of the pygmy copperhead (*Austrelaps labialis*) from Kangaroo island. **BMC evolutionary biology**, v. 8, p. 70, jan. 2008.
- DOLEY, R.; MACKESSY, S. P.; KINI, R. M. Role of accelerated segment switch in exons to alter targeting (ASSET) in the molecular evolution of snake venom proteins. **BMC evolutionary biology**, v. 9, n. 1, p. 146, jan. 2009.
- DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and fibrin. **Annual review of biochemistry**, v. 53, p. 195–229, jan. 1984.

- DU, X.; CLEMETSON, K. J. Reptile C-Type Lectins. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 521
- EARL, S. T. H. et al. Characterisation of a mannose-binding C-type lectin from *Oxyuranus scutellatus* snake venom. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 519–27, mar. 2011.
- EARL, S. T. H. et al. Drug development from Australian elapid snake venoms and the Venomics pipeline of candidates for haemostasis: Textilinin-1 (Q8008), HaempatchTM (Q8009) and CoVaseTM (V0801). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 456–63, 15 mar. 2012.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–7, 1 jan. 2004.
- EDWARDS, C. E.; PARCHMAN, T. L.; WEEKLEY, C. W. Assembly, gene annotation and marker development using 454 floral transcriptome sequences in *Ziziphus celata* (Rhamnaceae), a highly endangered, Florida endemic plant. **DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 19, n. 1, p. 1–9, jan. 2012.
- FAIZ, M. A. et al. Comparison of protease and related enzyme activities in snake venoms. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 113, n. 1, p. 199–204, jan. 1996.
- FILIPPOVICH, I. et al. Cloning and functional expression of venom prothrombin activator protease from *Pseudonaja textilis* with whole blood procoagulant activity. **British journal of haematology**, v. 131, n. 2, p. 237–46, out. 2005.
- FRITZINGER, D. C. et al. Primary structure of cobra complement component C3. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 149, n. 11, p. 3554–62, 1 dez. 1992.
- FRITZINGER, D. C.; BREDEHORST, R.; VOGEL, C. W. Molecular cloning and derived primary structure of cobra venom factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12775–9, 20 dez. 1994.
- FRY, B. G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 584–8, 2 fev. 2006.
- FRY, B. G. et al. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 7, n. 2, p. 215–46, mar. 2008.
- FRY, B. G. et al. Functional and structural diversification of the Anguimorpha lizard venom system. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 9, n. 11, p. 2369–90, nov. 2010.
- FRY, B. G. et al. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **Journal of molecular evolution**, v. 57, n. 1, p. 110–29, jul. 2003.

- FRY, B. G. et al. Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 7-8, p. 696–708, 1 jun. 2012.
- FRY, B. G. et al. Squeezers and leaf-cutters: differential diversification and degeneration of the venom system in toxicoferan reptiles. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 12, n. 7, p. 1881–99, jul. 2013.
- FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, v. 15, n. 3, p. 403–20, mar. 2005.
- FURMAN, B. L. The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 464–71, 15 mar. 2012.
- GASPARELLO-CLEMENTE, E.; SILVEIRA, P. F. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 11, p. 1617–26, nov. 2002.
- GEORGIEVA, D. et al. Pseudechis australis venomomics: adaptation for a defense against microbial pathogens and recruitment of body transferrin. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 5, p. 2440–64, 6 maio 2011.
- GEORGIEVA, D.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. **Expert review of proteomics**, v. 5, n. 6, p. 787–97, dez. 2008.
- GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 5, p. 759–69, set. 2011.
- GOLD, L. I. et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 3, p. 665–83, 1 mar. 2010.
- GONG, N. et al. Cloning and characterization of the pseudonajatoxin b precursor. **The Biochemical journal**, v. 358, n. Pt 3, p. 647–56, 15 set. 2001.
- GONG, N.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Molecular cloning, characterization and evolution of the gene encoding a new group of short-chain α -neurotoxins in an Australian elapid, Pseudonaja textilis. **FEBS letters**, v. 473, n. 3, p. 303–10, 19 maio 2000.
- GONG, N.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Postsynaptic short-chain neurotoxins from Pseudonaja textilis. cDNA cloning, expression and protein characterization. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 265, n. 3, p. 982–9, nov. 1999.

- GÓNGORA-CASTILLO, E.; BUELL, C. R. Bioinformatics challenges in de novo transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence. **Natural product reports**, v. 30, n. 4, p. 490–500, abr. 2013.
- GÖTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 10, p. 3420–35, jun. 2008.
- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–4, 1 fev. 2010.
- GUAN, H.-H. et al. Structures of two elapid snake venom metalloproteases with distinct activities highlight the disulfide patterns in the D domain of ADAMalysin family proteins. **Journal of structural biology**, v. 169, n. 3, p. 294–303, mar. 2010.
- GUO, X.-X. et al. Isolation and cloning of a metalloproteinase from king cobra snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 7, p. 954–65, 1 jun. 2007.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T. Snake Venom Metalloproteinases: Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 521
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95 – 98, 1999.
- HARRIS, J. B.; MALTIN, C. A. The effects of the subcutaneous injection of the crude venom of the Australian common brown snake, *Pseudonaja textilis* on the skeletal neuromuscular system. **British journal of pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 157–63, maio 1981.
- HARRISON, N.; KIDNER, C. A. Next-generation sequencing and systematics: What can a billion base pairs of DNA sequence data do for you? **Taxon**, v. 60, n. 6, p. 1552–1566, 2011.
- HARRISON, R. A. et al. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts. **Gene**, v. 392, n. 1-2, p. 22–33, 1 maio 2007.
- HEAD, S. R. et al. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. **BioTechniques**, v. 56, n. 2, p. 61–77, jan. 2014.
- HEGDE, R. P. et al. Snake Venom Three-Finger Toxins. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 521
- HENNIGHAUSEN, L. G.; SIPPEL, A. E. Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of “four-disulfide core” proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 10, n. 8, p. 2677–2684, 1 abr. 1982.

- HENSCHEN-EDMAN, A. H. et al. Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. **Thrombosis and haemostasis**, v. 81, n. 1, p. 81–6, jan. 1999.
- HEYBORNE, W. H.; MACKESSY, S. P. Cystein-Rich Secretory Proteins in Reptile Venoms. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 521
- HISADA, M. et al. Molecular components and toxicity of the venom of the solitary wasp, *Anoplius samariensis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 330, n. 4, p. 1048–54, 20 maio 2005.
- IKEHARA, Y.; OGATA, S.; MISUMI, Y. **Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases**. [s.l.] Elsevier, 1994. v. 244p. 215–27
- IRWIN, D. M. Origin and convergent evolution of exendin genes. **General and comparative endocrinology**, v. 175, n. 1, p. 27–33, 1 jan. 2012.
- ITOH, N. et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 7, p. 3132–5, 5 mar. 1987.
- JACKSON, T. N. W. et al. Venom down under: dynamic evolution of Australian elapid snake toxins. **Toxins**, v. 5, n. 12, p. 2621–55, dez. 2013.
- JONES, P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics (Oxford, England)**, 29 jan. 2014.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. et al. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. **Genetics**, v. 173, n. 2, p. 877–89, jun. 2006.
- KAMEI, S. et al. Amino acid sequence and inhibitory activity of rhesus monkey tissue factor pathway inhibitor (TFPI): comparison with human TFPI. **Journal of biochemistry**, v. 115, n. 4, p. 708–14, abr. 1994.
- KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS medicine**, v. 5, n. 11, p. e218, 4 nov. 2008.
- KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S.; NAGARAJU, S. Hyaluronidases, a Neglected Class of Glycosidases from Snake Venom: Beyond a Spreading Factor. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 521
- KIM, K. M. et al. Applications of next-generation sequencing to unravelling the evolutionary history of algae. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 64, n. Pt 2, p. 333–345, 6 fev. 2014.

- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 827–40, 15 dez. 2003.
- KINI, R. M.; DOLEY, R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 6, p. 855–67, nov. 2010.
- KINI, R.; MORITA, T.; ROSING, J. Classification and nomenclature of prothrombin activators isolated from snake venoms. **Thrombosis and haemostasis**, v. 86, n. 2, p. 710–1, ago. 2001.
- KITA, M. et al. Blarina toxin, a mammalian lethal venom from the short-tailed shrew *Blarina brevicauda*: Isolation and characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7542–7, 18 maio 2004.
- KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65–106, jan. 1987.
- KOCK, M. A. et al. Structure and function of recombinant cobra venom factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30836–43, 16 jul. 2004.
- KOHLHOFF, M. et al. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2181–95, 3 abr. 2012.
- KRISTIANSSON, E. et al. Characterization of the *Zoarces viviparus* liver transcriptome using massively parallel pyrosequencing. **BMC genomics**, v. 10, p. 345, jan. 2009.
- KURTOVIĆ, T. et al. VaSP1, catalytically active serine proteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with unconventional active site triad. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 77, p. 93–104, jan. 2014.
- KWOK, H. F. et al. Helokinestatin: a new bradykinin B2 receptor antagonist decapeptide from lizard venom. **Peptides**, v. 29, n. 1, p. 65–72, jan. 2008.
- LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 987–96, 15 jun. 2005.
- LASSMANN, T.; FRINGS, O.; SONNHAMMER, E. L. L. Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 3, p. 858–65, 1 fev. 2009.
- 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. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 4, p. 934–41, abr. 2005.

- LIAO, G. S. et al. Pharmacological actions of nerve growth factor-transferrin conjugate on the central nervous system. **Journal of natural toxins**, v. 10, n. 4, p. 291–7, nov. 2001.
- LOMONTE, B. et al. Venomics of New World pit vipers: Genus-wide comparisons of venom proteomes across Agkistrodon. **Journal of proteomics**, v. 96C, p. 103–116, 7 nov. 2013.
- MACEDO-RIBEIRO, S. et al. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1624, jan. 2008.
- MACKESSY, S. P. The field of reptile toxinology: snakes, lizards, and their venoms. In: MACKESSY, S. P. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 521
- MADARAS, F.; MIRTSCHEIN, P. J.; KUCHEL, T. ANTIVENOM DEVELOPMENT IN AUSTRALIA. **Toxin Reviews**, v. 24, n. 1, p. 79–94, 10 jan. 2005.
- MADRIGAL, M. et al. Snake venomics across genus Lachesis. Ontogenetic changes in the venom composition of Lachesis stenophrys and comparative proteomics of the venoms of adult Lachesis melanocephala and Lachesis acrochorda. **Journal of proteomics**, v. 77, p. 280–97, 21 dez. 2012.
- MANN, K. G. et al. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. **Blood**, v. 76, n. 1, p. 1–16, 1 jul. 1990.
- MARGRES, M. J. et al. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. **BMC genomics**, v. 14, p. 531, jan. 2013.
- MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 62, p. 3–18, mar. 2013.
- MASCI, P. P. et al. Textilins from *Pseudonaja textilis textilis*. Characterization of two plasmin inhibitors that reduce bleeding in an animal model. **Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis**, v. 11, n. 4, p. 385–93, jun. 2000.
- MASCI, P. P.; WHITAKER, A. N.; DE JERSEY, J. Purification and characterization of a prothrombin activator from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis textilis*. **Biochemistry international**, v. 17, n. 5, p. 825–35, nov. 1988.
- MCCLEARY, R. J. R.; KINI, R. M. Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, p. 1–19, 8 out. 2012.
- MCCLEARY, R. J. R.; KINI, R. M. Snake bites and hemostasis/thrombosis. **Thrombosis research**, v. 132, n. 6, p. 642–6, dez. 2013.

- MCWILLIAM, H. et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W597–600, 1 jul. 2013.
- MEBS, D. [Isolation and properties of a kallikrein from the venom of the Gila monster, *Heloderma suspectum*]. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 350, n. 7, p. 821–6, jul. 1969.
- MILNE, I. et al. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. **Briefings in bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 193–202, 24 mar. 2013.
- MINH LE, T. N. et al. Gene duplication of coagulation factor V and origin of venom prothrombin activator in *Pseudonaja textilis* snake. **Thrombosis and haemostasis**, v. 93, n. 3, p. 420–9, mar. 2005.
- MIWA, J. M. et al. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. **Neuron**, v. 23, n. 1, p. 105–14, maio 1999.
- MIWA, J. M. et al. The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. **Neuron**, v. 51, n. 5, p. 587–600, 7 set. 2006.
- MOCHCA-MORALES, J.; MARTIN, B. M.; POSSANI, L. D. Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 28, n. 3, p. 299–309, jan. 1990.
- MORA-OBANDO, D. et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. **Journal of proteomics**, v. 96C, p. 159–172, 11 nov. 2013.
- MORGANTE, M. et al. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. **Nature genetics**, v. 37, n. 9, p. 997–1002, set. 2005.
- MORRISSETTE, J. et al. Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. **Biophysical journal**, v. 68, n. 6, p. 2280–8, jun. 1995.
- MUNAWAR, A. **Analysis of the low molecular weight peptides of selected snake venoms**. 2012. Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg. Tese, p. 131, 2012.
- MUNAWAR, A. et al. Elapid snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera *Naja* and *Notechis*. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 850–68, mar. 2014.
- MURAYAMA, N. 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1189–93, 18 fev. 1997.
- MURPHY, K. P. et al. **Janeway's immunobiology**. 7th. ed. Michigan: Garland Science, 2008. p. 887
- NAIR, D. G. et al. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. **The Biochemical journal**, v. 402, n. 1, p. 93–104, 15 fev. 2007.
- NAKASHIMA, K. et al. Accelerated evolution of Trimeresurus flavoviridis venom gland phospholipase A2 isozymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 13, p. 5964–8, 1 jul. 1993.
- OGAWA, T. et al. Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for Trimeresurus flavoviridis phospholipase A2 isozymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 18, p. 8557–61, 15 set. 1992.
- OGAWA, Y. et al. Characterization and cDNA cloning of dipeptidyl peptidase IV from the venom of Gloydus blomhoffi brevicaudus. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 145, n. 1, p. 35–42, set. 2006.
- OHNO, M. et al. Molecular Evolution of Snake Toxins: Is the Functional Diversity of Snake Toxins Associated with a Mechanism of Accelerated Evolution? **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 59, p. 307–364, jan. 1998.
- OMPRAHA, G. et al. Identification of a novel family of snake venom proteins Veficolins from Cerberus rynchops using a venom gland transcriptomics and proteomics approach. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 4, p. 1882–93, 5 abr. 2010.
- 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 molecular biology**, v. 8, p. 115, jan. 2007.
- PALM, N. W. et al. Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 976–85, 14 nov. 2013.
- PARCHMAN, T. L. et al. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 180, jan. 2010.
- PEARSON, J. A. et al. Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake (Pseudonaja textilis). 3. The complete amino-acid sequences of all the subunits. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1161, n. 2-3, p. 223–9, 13 fev. 1993.

- PEIGNEUR, S. et al. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. **Biochemical pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 81–90, 1 jul. 2011.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, v. 8, n. 10, p. 785–6, jan. 2011.
- RAO, V. S.; KINI, R. M. Pseutarin C, a prothrombin activator from *Pseudonaja textilis* venom: its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa-Va complex. **Thrombosis and haemostasis**, v. 88, n. 4, p. 611–9, out. 2002.
- RAO, V. S.; SWARUP, S.; KINI, R. M. The nonenzymatic subunit of pseutarin C, a prothrombin activator from eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*) venom, shows structural similarity to mammalian coagulation factor V. **Blood**, v. 102, n. 4, p. 1347–54, 15 ago. 2003.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Database issue, p. D343–50, jan. 2012.
- REHANA, S.; KINI, R. Molecular isoforms of cobra venom factor-like proteins in the venom of *Austrelaps superbus*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 50, n. 1, p. 32–52, jul. 2007.
- REZA, M. A. et al. Molecular evolution caught in action: gene duplication and evolution of molecular isoforms of prothrombin activators in *Pseudonaja textilis* (brown snake). **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 4, n. 6, p. 1346–53, jun. 2006.
- RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2707–20, 17 maio 2012.
- ROKYTA, D. R. et al. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 312, jan. 2012.
- ROKYTA, D. R.; WRAY, K. P.; MARGRES, M. J. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. **BMC genomics**, v. 14, p. 394, jan. 2013.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1**. 3rd. ed. New York: CSHL Press, 2001. p. 2344
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, dez. 1977.
- SCHAPPEL, G. J.; UTLEY, D.; WILSON, G. C. Envenomation by the Australian common brown snake--*Pseudonaja* (*Demansia*) *textilis* *textilis*. **The Medical journal of Australia**, v. 1, n. 3, p. 142–4, 16 jan. 1971.

- SCHWEITZ, H. et al. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 20, p. 13928–32, 15 jul. 1992.
- SCHWEITZ, H. et al. Kaliclutines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 42, p. 25121–6, 20 out. 1995.
- SERVENT, D. et al. Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 39, p. 24279–86, 26 set. 1997.
- SHIN, S.; PARK, J. Correction of sequence-dependent ambiguous bases (Ns) from the 454 pyrosequencing system. **Nucleic acids research**, 23 jan. 2014.
- SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1079, p. 105–16, jan. 2014.
- SIMAKOV, O. et al. Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 526–31, 24 jan. 2013.
- SIMPSON, R. J. **Proteins and proteomics: a laboratory manual**. New York: CSHL Press, 2002. p. 926
- SOARES, M. B. et al. Construction and characterization of a normalized cDNA library. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 20, p. 9228–32, 27 set. 1994.
- SOUSA, P. C. P. et al. Vasoconstrictor effect of Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on rat aorta. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, n. 1, p. 24, jan. 2013.
- ST PIERRE, L. et al. Cloning and characterisation of natriuretic peptides from the venom glands of Australian elapids. **Biochimie**, v. 88, n. 12, p. 1923–31, dez. 2006.
- ST PIERRE, L. et al. Common evolution of waprin and kunitz-like toxin families in Australian venomous snakes. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 24, p. 4039–54, dez. 2008.
- ST PIERRE, L. et al. Distinct activities of novel neurotoxins from Australian venomous snakes for nicotinic acetylcholine receptors. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 64, n. 21, p. 2829–40, nov. 2007a.
- ST PIERRE, L. et al. Diversity of toxic components from the venom of the evolutionarily distinct black whip snake, *Demansia vestigiata*. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 8, p. 3093–107, ago. 2007b.

- ST PIERRE, L. et al. Identification and analysis of venom gland-specific genes from the coastal taipan (*Oxyuranus scutellatus*) and related species. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 62, n. 22, p. 2679–93, nov. 2005.
- STOCKER, K. F. **Medical Use of Snake Venom Proteins**. [s.l.] CRC Press, 1990. p. 280
- SU, M. J. et al. The presynaptic neuromuscular blocking effect and phospholipase A2 activity of textilotoxin, a potent toxin isolated from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 21, n. 1, p. 143–51, jan. 1983.
- SUNAGAR, K. et al. Three-fingered RAVeRs: Rapid Accumulation of Variations in Exposed Residues of snake venom toxins. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2172–208, nov. 2013.
- SUTHERLAND, S. K.; LEONARD, R. L. Snakebite deaths in Australia 1992-1994 and a management update. **The Medical journal of Australia**, v. 163, n. 11-12, p. 616–8, 1995.
- THAYER, A. M. IMPROVING PEPTIDES. **Chem. Eng. News Archive**, v. 89, n. 22, p. 13–20, 2011.
- TORRES, A. M. et al. Identification of a novel family of proteins in snake venoms. Purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 41, p. 40097–104, 10 out. 2003.
- TSUESHITA, T. et al. Helospectin I and II evoke vasodilation in the intact peripheral microcirculation. **Peptides**, v. 25, n. 1, p. 65–9, jan. 2004.
- TYLER, M. I. et al. Pseudonajatoxin b: unusual amino acid sequence of a lethal neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake, *Pseudonaja textilis*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 166, n. 1, p. 139–43, 1 jul. 1987.
- UTAISINCHAROEN, P. et al. Complete primary structure and biochemical properties of gilatoxin, a serine protease with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 29, p. 21975–83, 15 out. 1993.
- UTKIN, Y. N. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom--milestones of discovery. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 62, p. 50–5, fev. 2013.
- VIDAL, N.; HEDGES, S. B. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. **Comptes rendus biologies**, v. 332, n. 2-3, p. 129–39, 2009.
- VILLALTA, M. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Protobothrops mucrosquamatus* and *Viridovipera stejnegeri* from Taiwan: keys to understand the

- variable immune response in horses. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 18, p. 5628–45, 22 out. 2012.
- VINK, S. et al. Natriuretic peptide drug leads from snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 434–45, 15 mar. 2012.
- VOGEL, C.-W.; FRITZINGER, D. C. Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 7, p. 1198–222, 15 dez. 2010.
- VON HEIJNE, G. The signal peptide. **The Journal of membrane biology**, v. 115, n. 3, p. 195–201, maio 1990.
- VONK, F. J. et al. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 51, p. 20651–6, 17 dez. 2013.
- WAGSTAFF, S. C. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of the ocellated carpet viper, *Echis ocellatus*. **Journal of proteomics**, v. 71, n. 6, p. 609–23, 30 jan. 2009.
- WANG, Z. et al. Eppin: a molecular strategy for male contraception. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 65, p. 535–42, jan. 2007.
- WESSELSCHMIDT, R. L.; GIRARD, T. J.; BROZE, G. J. cDNA sequence of rabbit lipoprotein-associated coagulation inhibitor. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 21, p. 6440, 11 nov. 1990.
- WESTERMEIER, R.; NAVEN, T.; HÖPKER, H.-R. **Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design (e-Livro Google)**. [s.l.: s.n.].
- WILLIAMS, D. J. et al. Origin of the eastern brownsake, *Pseudonaja textilis* (Duméril, Bibron and Duméril) (Serpentes: Elapidae: Hydrophiinae) in New Guinea: evidence of multiple dispersals from Australia, and comments on the status of *Pseudonaja textilis pughii* Hoser 2003. **Zootaxa**, n. 1703, p. 47–61, 2008.
- WINKEL, K. D.; MIRTSCHIN, P.; PEARN, J. Twentieth century toxinology and antivenom development in Australia. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 48, n. 7, p. 738–54, 1 dez. 2006.
- WU, J. et al. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 9, p. 4230–40, 2 set. 2011.
- YANG, W. et al. BF9, the First Functionally Characterized Snake Toxin Peptide with Kunitz-Type Protease and Potassium Channel Inhibiting Properties. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 28, n. 2, p. 76–83, fev. 2014.

YENUGU, S. et al. Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1484–90, nov. 2004.

ZENG, L. et al. Molecular cloning and characterization of a complement-depleting factor from king cobra, *Ophiophagus hannah*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 3, p. 290–301, 1 set. 2012.

ZHANG, J. et al. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 11, n. 4, p. M111.010587, abr. 2012.

Apêndice 1: Identificação pelo PEAKS (+MASCOT) de proteínas e toxinas do veneno de *Pseudonaja textilis* por análise de dados de espectrometria de massas MS/MS. Spot: número do spot coletado no gel 2D; Accession: Código dos hits; Cov.: porcentagem de cobertura na proteína hit; m/z: massa sobre carga em Da; z: carga do íon; ppm: erro em partes por milhão; #Spec.: número de espectros; [P]EAKS: Score do PEAKS; [M]ascot: Score do Mascot.

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
41	FA5V_PSETE	99.19	17	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.88	1515.7358	6.3	1	99.94	86.34	93.25
					K.WSEGSSYSYSDGTSQVER.L	881.36	1760.7124	-4	1	99.94	71.07	90.93
					K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.8	1589.7144	-81.1	2	99.94	80.08	87.47
					R.GEVGDSLIIYFK.N	670.89	1339.7021	47.3	1	99.94	66.7	79.2
					R.EYVLMFVSFDESK.N	797.4	1592.7432	26.6	1	99.94	78.73	73.48
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.82	1253.6292	-2.9	1	99.94	75.78	68.55
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.4	1402.698	62.4	1	99.93	57.53	67.13
					K.ADVEQHAFVAFDENK.S	607.01	1817.8584	82.4	1	99.93	62.18	59.47
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.87	1211.6873	31.5	2	99.93	55.73	57.72
					R.LSESDLTFFK.I	584.3	1166.6182	-28.1	1	99.92	51.54	50.56
					K.ELGLIDDEGNPIIQPR.R	890	1777.9209	36.3	1	99.91	66.31	48.97
					K.AQYLDNFSNFIGKK.Y	548.99	1643.8308	71.4	1	99.9	50.81	47.13
					K.NFATQPVSIIHPQSAVYNK.W	667.72	2000.0115	63.3	2	99.9	50.33	45.88
					R.LDDAVPPGQSFYK.Y	637.31	1272.635	-23.2	2	99.88	42.06	43.81
					K.WLISSLVAK.H	508.84	1015.6066	57.9	1	99.86	38.52	46.91
					R.EYHIAAQLEDWDYNFQPEELSR.L	901.76	2702.2246	12.4	1	99.84	48.59	39.97
					K.SWYLEDNIKK.Y	648.38	1294.6558	69.3	1	99.73	42.79	35.2
					K.DAEGAIYPSDPK.E	631.84	1261.5825	65.8	1	99.39	40.08	30.01
					K.LYHSAVDMTR.D	398.2	1191.5706	6.4	1	99.35	50.48	26.6
					K.SWYLEDNIK.K	584.34	1166.5608	89.8	1	99.02	41.92	22.82
					R.GILGPVIK.A	398.8	795.5218	80	1	97.43	33.45	30.29
					K.LYHSAVDM(+15.99)TR.D	403.56	1207.5654	76.8	2	96.76	30.3	29.95

R.LSESDLTFK.K	520.29	1038.5233	40.5	1	89.63	20.38	39.09
R.DTVTIVFK.N	461.78	921.5172	30.7	1	17.38	20.67	29.19

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
42	FA5V_PSETE	99.19	21	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.VSTINLVGGASVTADMSVSR.T	982.52	1963.0044	10.7	7	99.94	78.79	115.25
					K.WSEGSSYSDGTS DVER.L	881.35	1760.7124	-15.3	1	99.94	67.36	107.88
					K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.87	1589.7144	7	4	99.94	80.19	96.05
					K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.87	1515.7358	-6.9	2	99.94	76.98	93.3
					K.ADVEQHAFVAVFDENK.S	909.97	1817.8584	36.9	9	99.94	73.27	88.19
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.82	1253.6292	-2.9	1	99.94	68.17	77.11
					K.NFATQPVSIIHPQSAVYNK.W	1001	2000.0115	-13	1	99.94	73.64	76.66
					R.GEVGDSLIIYFK.N	670.88	1339.7021	32.3	10	99.94	61.27	74.7
					R.EYVLMFSVFDESK.N	797.4	1592.7432	26.6	2	99.94	68.31	71.06
					K.EEVPVNFVPDPESDALAK.E	978.47	1954.9524	-13.8	1	99.94	62.14	66.87
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.38	1402.698	33.8	1	99.94	56.24	66.94
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.89	1211.6873	64.6	1	99.94	52.42	66.98
					K.AQYLDNFSNFIGKK.Y	822.93	1643.8308	8.9	2	99.94	50.46	65.01
					K.ELGLIDDEGNPIIQPR.R	889.98	1777.9209	13.8	1	99.94	61.07	62.34
					K.DAEGAIYPSDPK.E	631.82	1261.5825	34	1	99.93	54.1	53.5
					R.LSESDLTFKK.I	584.32	1166.6182	6.3	2	99.93	43.01	59.25
					R.LDDAVPPGQSFK.Y	637.31	1272.635	-23.2	3	99.92	39.88	50.25
					K.LYHSAVDMTR.D	596.81	1191.5706	29.3	2	99.91	52.7	45.36
					K.WLISSLVAK.H	508.86	1015.6066	97.3	2	99.9	36.5	49.47
					K.SNVMYTLNGYASDRTEVLR.F	730.38	2188.0581	27.5	1	99.9	26.73	70.69
					K.VRDTVTIVFK.N	589.39	1176.6865	67.1	1	99.89	40.81	42.93
					K.SWYLEDNIK.K	584.34	1166.5608	89.8	1	99.89	51.78	40.66
					K.NLASRPYSIYVHGVSVSK.D	659.71	1976.0479	30.6	2	99.71	57.71	31.42
					R.GILGPVIK.A	398.8	795.5218	80	1	99.7	36.53	33.33
					K.WSEGSSYSDGTS DVERLDDAVPPGQSFK.Y	1006.11	3015.3367	-9.5	1	99.66	32.29	35.52
					K.SWYLEDNIKK.Y	648.39	1294.6558	84.7	2	99.64	46.51	29.9

					R.DTIVTIVFK.N	461.77	921.5172	9	1	99.45	32.05	31.48
					K.HLQAGMYGYLNIK.D	503.37	1506.7654	214.2	1	99.33	44.04	24.79
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
43	isotig 00199F1-1426	99.19	31	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WSEGSSYSDDGTSDVER.L	881.36	1760.7124	-4	1	99.94	64.15	110.97
	isotig 00200F1-1449	99.19	19	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.88	1515.7358	6.3	1	99.94	77.56	88.87
	FA5V_OXYMI	99.19	16	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	R.EYVLMFSVDFDESK.N	797.4	1592.7432	26.6	2	99.94	71.47	84.55
	FA5_PSETE	99.19	14	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	K.NFATQPVSIHPQSAVYNK.W	1000.97	2000.0115	-43	1	99.94	91.97	81.45
					K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.86	1589.7144	-5.6	1	99.94	81.81	80.83
					R.GEVGDSLIIYFK.N	670.91	1339.7021	77.1	11	99.94	69.76	79.84
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.39	1402.698	48.1	1	99.94	63.43	80.09
					K.AVEPGQVITYK.W	627.82	1253.6292	-2.9	1	99.94	62.98	68.83
					K.GVQNSADVEQHAFVAFVDENK.S	768.73	2303.0815	37.6	4	99.94	57.22	68.23
					K.AQYLDNFSNFIGKK.Y	822.93	1643.8308	8.9	2	99.94	59.22	65
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.87	1211.6873	31.5	1	99.94	47.21	72.16
					K.EEVPVNFVPDPESDALAK.E	978.47	1954.9524	-13.8	1	99.93	54.88	61.84
					K.DAEGAIYPSDPK.E	631.83	1261.5825	49.9	1	99.93	48.52	55.93
					R.LSESDLTFFK.I	584.32	1166.6182	6.3	1	99.93	45.46	55.15
					R.LSESDLTFFK.K	520.31	1038.5233	79.1	1	99.92	47.04	51.15
					R.LDDAVPPGQSFK.Y	637.31	1272.635	-23.2	3	99.91	38.6	50.31
					K.LYHSAVDMTR.D	596.79	1191.5706	-4.3	2	99.91	57.51	44.06
					K.WLISSLVAK.H	508.87	1015.6066	117	2	99.91	38.19	49.56
					K.SWYLEDNIK.K	584.35	1166.5608	106.8	1	99.88	50.59	39.84
					K.VRDTVTIVFK.N	589.42	1176.6865	118	1	99.87	43.88	40.04
					K.WSEGSSYSDDGTSDVERLDDAVPPGQSFK.Y	1006.13	3015.3367	10.5	1	99.81	32.21	40.22
					K.LYHSAVDM(+15.99)TR.D	604.85	1207.5654	99.3	2	99.73	44.62	32.86
					K.SWYLEDNIKK.Y	648.41	1294.6558	115.6	1	99.72	48.41	32.38
					K.NLASRPYSIYVHGVSYSK.D	659.7	1976.0479	15.4	2	99.7	39.87	32.31
					R.GILGPVIK.A	398.78	795.5218	29.7	1	99.09	32.74	26.18

					R.TEVLR.F	309.23	616.3544	147.7	1	6.73	19.23	26.61
					R.EYELDFKQEKPR.D	527.93	1580.7834	-9.7	1	2.63	11.92	25.52
					K.KEEVPVNFVDPDPESDALAK.E	695.38	2083.0471	34.1	1	1.65	24.1	-
					R.EYELDFK.Q	472.25	942.4334	55.2	1	1.28	22.42	-
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
44	FA5V_PSETE	99.01	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.89	1339.7021	47.3	1	99.94	69.24	78.87
					K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.93	1515.7358	72.3	1	99.93	63.41	70.81
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.38	1402.698	33.8	1	99.9	48.63	57.25
					K.ADVEQHAVFAVFDENK.S	607	1817.8584	65.9	1	99.82	57.59	46.25
					K.VSTINLVGGASVTADMSVSR.T	982.58	1963.0044	71.9	1	80.48	32.59	-
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
45	FA5V_PSETE	99.15	6	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.9	1515.7358	32.8	1	99.94	95.49	84.84
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.8	1253.6292	-34.9	1	99.94	70.33	73.8
					K.ADVEQHAVFAVFDENK.S	606.98	1817.8584	32.8	1	99.93	55.25	63.18
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.42	1402.698	90.8	1	99.88	62.99	50.27
					K.WLISSLVAK.H	508.87	1015.6066	117	1	99.82	43.41	49.61
					K.VSTINLVGGASVTADMSVSR.T	982.38	1963.0044	- 131.9	1	99.57	58.1	35.77
					K.LYHSAVDM(+15.99)TR.D	403.58	1207.5654	126.5	1	89.47	32.69	21.37
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
46	isotig 00199F1-1426	98.83	7	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.4	1402.698	62.4	1	99.93	61.32	74.16
	FA5V_OXYMI	98.83	5	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.9	1515.7358	32.8	1	99.93	90.3	72.5
	FA5V_PSETE	98.83	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AVEPGQVYTYK.W	627.85	1253.6292	44.9	1	99.93	71.3	65.98
	isotig 00200F1-1449	98.83	5	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.KKEEVPVNFVDPDPESDALAK.E	738.06	2211.1421	7.3	1	85.22	33.38	-
					K.LYHSAVDM(+15.99)TR.D	403.55	1207.5654	51.9	1	11.15	23.9	22.12
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
47	FA5V_OXYSU	99.15	5	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.9	1515.7358	32.8	1	99.94	70.26	93.41

	FA5V_OXYMI	99.15	5	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.ADVEQHAFVAVFDENK.S	607	1817.8584	65.9	1	99.93	54.24	69.73
	FA5V_PSETE	99.15	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AVEPGQVYTYK.W	627.82	1253.6292	-2.9	1	99.93	74.71	68.59
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.4	1402.698	62.4	1	99.93	60.69	67.16
					K.LYHSAVDMTR.D	596.82	1191.5706	46.1	1	99.18	53.3	32.95
					K.SWYLEDNIKK.Y	648.41	1294.6558	115.6	1	98.15	39.07	31.67
					R.GILGPVIK.A	398.78	795.5218	29.7	1	97.08	37.77	25.98
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
48	isotig 00199F1-1426	99.02	10	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AVEPGQVYTYK.W	627.8	1253.6292	-34.9	1	99.93	71.61	70.94
	FA5V_PSETE	99.02	6	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.39	1402.698	48.1	1	99.92	56.86	62.31
	isotig 00200F1-1449	99.02	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.LYHSAVDMTR.D	596.81	1191.5706	29.3	2	99.3	56.77	32.7
					R.FHQSEVVQWHLTSVGTVD EIVPVHLSGHTFLSK.G	743.57	3712.8994	-23.1	1	96.1	31.41	30.02
					K.KKEEVPVNFVPDPESDALAK.E	738.06	2211.1421	7.3	1	95.85	37.3	27.45
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
50	FA5V_OXYMI	98.3	3	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.ADVEQHAFVAVFDENK.S	606.99	1817.8584	49.4	2	99.92	56.87	56.33
	FA5V_PSETE	98.3	3	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.SWYLEDNIKK.Y	648.4	1294.6558	100.2	1	99.7	50.32	35.41
					K.KKEEVPVNFVPDPESDALAK.E	738.08	2211.1421	34.4	1	97.25	33.62	26.23
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
56	isotig 00264F3-1903	84.29	16	PLA2 OS=Pseudonaja textilis	R.FSGPYWNPYSYK.C	754.83	1507.677	-20.9	1	99.92	63.78	56.77
	PA2A2_PSETE	84.29	16	Acidic phospholipase A2 2 OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.GSGSTPVDDELDR.C	601.79	1201.5574	6.7	1	99.9	49.37	53.18
	isotig 00263F3-1896	84.29	16	PLA2 OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
58	FA102_PSETE	87.24	5	Coagulation factor X isoform 2 OS=Pseudonaja textilis GN=F10 PE=2 SV=1	K.QDPGIVSGFGR.I	591.83	1181.583	52.9	1	99.93	62.47	71.62
	Q6IT10_PSETT	84.33	5	Factor X-like protease OS=Pseudonaja textilis textilis PE=1 SV=1	R.IETGPLLSVDK.I	586.37	1170.6497	64.7	1	99.9	64.21	57.45
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
60	71725671	97.24	9	Pseudonaja textilis pseudechetoxin- like protein precursor mRNA complete cds	A.TVDFASESSNK.A	59.08	1183.5356	59	592.81	2	1	N

isotig 97.24 4 pseudechetoxin-like precursor

A.TVDFASESSNKNDYQK.G

53.43 1831.8224 1.7 916.92 2 1 N

G.NMLQMK.T

34.31 763.3721 -8.7 382.69 2 1 N

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
61	isotig 00200F1-1449	99.03	4	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.DALSGLLGPTLR.G	606.94	1211.6873	147.1	1	99.92	49.44	58.02
					K.NSEITASSYK.K	550.29	1098.5193	42	1	99.89	40.17	56.45
					K.TWSSWEFPLAR.L	783.39	1564.7463	12.2	1	99.76	49.44	36.38
					K.TWNQYIALR.I	582.86	1163.6086	83.2	2	99.73	43.7	38.18
					K.ENHIDPPIIAR.Y	425.63	1273.6777	149.5	1	99.58	38.96	34.31
					K.NSEITASSYKK.T	614.33	1226.6143	25.5	1	3.13	22.37	23.04

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
62	FA5V_OXYSU	61.56	1	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.HLGILGPIIR.A	544.84	1087.6865	-19.3	1	99.9	71.57	51.79
	FA5_PSETE	61.56	1	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1								
	FA5V_OXYMI	61.56	1	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1								
	FA5V_PSETE	61.56	1	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1								
	isotig 00200F1-1449	61.56	1	VF5a OS=Pseudonaja textilis								
	V8P243_OPHHA	61.54	1	Coagulation factor V OS=Ophiophagus hannah GN=F5 PE=4 SV=1								

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
63	FA5_PSETE	99.11	5	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	K.SWAYYSGVNPEK.D	700.85	1399.6409	31.8	1	99.93	76.98	72.5
	FA5V_OXYMI	99.11	5	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.NSEITASSYK.K	550.3	1098.5193	60.2	1	99.9	41.36	58.93
	FA5V_PSETE	99.11	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.TWNQYIALR.I	582.86	1163.6086	83.2	1	99.57	40.91	38.06
					K.ENHIDPPIIAR.Y	425.59	1273.6777	55.3	2	99.47	41.79	35.97
					K.VFTGNINSBGHVK.H	463.26	1386.6892	49.8	1	98.94	46.18	27.84
					R.EDNQLGVLPLLPPTFASIK.M	1006.56	2011.0989	3.3	2	97.77	41.51	-
					K.NSEITASSYKK.T	614.33	1226.6143	25.5	1	2.78	19.62	22.84

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
64	isotig 00200F1-1449	99.19	11	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.SYLDDTFQTPSTGGEYK.H	1019.45	2036.8853	0.1	1	99.94	106.46	91.45

R.AEVDDVIEIQFR.N	717.38	1432.7197	18	3	99.94	85.94	86.66
K.SWAYYSGVNPEK.D	700.86	1399.6409	46.1	1	99.94	87.56	86.41
R.GMQALFTVIDK.D	611.89	1221.6428	100.4	1	99.93	72.48	65.65
K.NSEITASSYK.K	550.31	1098.5193	78.4	1	99.93	47.74	65.09
K.IGTWLLETEVGENQER.G	625.33	1872.9216	24.9	1	99.92	75.19	57.34
K.HLGILGPIIR.A	544.89	1087.6865	72.6	1	99.92	85.4	56.95
R.SYDDKSPELFK.K	664.8	1327.6296	-33.3	1	99.9	73.63	49.97
K.TWNQYIALR.I	582.86	1163.6086	83.2	1	99.85	42.5	45.47
K.TWSSWEFFLAR.L	783.39	1564.7463	12.2	1	99.78	68.06	40.54
K.DQWLQIDLQHLTK.I	546.66	1636.8574	61.5	1	98.94	42.87	26.67
K.ENHIDPPIAR.Y	637.86	1273.6777	21.7	1	98.55	42.48	21.73
R.HSETQM(+15.99) HFEGNSDGTTVK.E	674.34	2019.8594	68.8	1	98.02	54.78	-
R.SYDDKSPELFKK.D	486.23	1455.7246	-38.7	1	97.24	40.3	-
K.NSEITASSYKK.T	614.31	1226.6143	-7.2	1	78.88	26.51	28.4
K.SPELFK.K	360.72	719.3854	55.7	1	75.65	26.16	28.26

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
65	isotig 00199F1-1426	99.19	15	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.91	1589.7144	57.3	1	99.94	67.81	74.69
	FA5V_PSETE	99.19	9	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.86	1515.7358	-20.1	1	99.94	75.5	72.47
	isotig 00200F1-1449	99.19	9	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AVEPGQVYTYK.W	627.82	1253.6292	-2.9	1	99.94	67.62	71.88
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.38	1402.698	33.8	1	99.93	59.43	64.47
					K.SNVM(+15.99) YTLNGYASDR.T	803.84	1605.7092	-27.2	1	99.9	51.37	46.25
					K.AQYLDNFSNFIGKK.Y	822.96	1643.8308	45.4	1	99.88	41.42	46.56
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.89	1211.6873	64.6	1	99.81	55.41	37.83
					K.WLISSLVAK.H	508.83	1015.6066	38.2	1	99.79	45.58	38.56
					K.LYHSAVDMTR.D	596.74	1191.5706	-88.2	1	98.78	40.79	22.11
					K.SWYLEDNIK.K	584.3	1166.5608	21.1	1	98.65	40.99	20.54
					K.KKEEVPVNFVPDPESDALAK.E	738.05	2211.1421	-6.3	1	97.95	37.62	25.14
					K.WSEGSSYSDDGTSDVER.L	881.34	1760.7124	-26.6	1	96.95	35.07	26.6
					R.GILGPVIK.A	398.82	795.5218	130.3	1	73.64	31.98	26.52

					K.SWYLEDNIKK.Y	648.37	1294.6558	53.8	1	11.28	28.81	32.63
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
66	isotig 00199F1-1426	99.19	15	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.88	1515.7358	6.3	1	99.94	70.01	84.34
	FA5V_OXYMI	99.19	9	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.AVEPGQVYTYK.W	627.87	1253.6292	76.8	1	99.94	68.04	68.15
	FA5V_PSETE	99.19	9	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.88	1589.7144	19.6	1	99.93	69.61	57.9
	isotig 00200F1-1449	99.19	9	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.38	1402.698	33.8	1	99.92	55.01	50.45
					K.WLISSLVAK.H	508.83	1015.6066	38.2	1	99.85	36.13	42.58
					R.GILGPVIK.A	398.81	795.5218	105.2	1	99.39	34.41	30.21
					K.NLASRPYSIYVHGVSVSK.D	659.73	1976.0479	60.9	1	99.01	49.95	20.13
					K.AQYLDNFSNFIGKK.Y	822.9	1643.8308	-27.6	2	98.74	36.29	21.22
					K.LYHSAVDMTR.D	398.17	1191.5706	-69.1	1	97.71	44	-
					K.KKEEVPVNFVDPDPESDALAK.E	738.06	2211.1421	7.3	1	97.2	37.19	-
					K.SWYLEDNIK.K	584.34	1166.5608	89.8	1	95.84	34.11	-
					R.DTVTIVFK.N	461.81	921.5172	95.8	1	17.21	28.46	-
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
67	isotig 00199F1-1426	99.17	13	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.85	1589.7144	-18.2	1	99.94	70.6	85.91
	FA5V_OXYMI	99.17	8	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.86	1515.7358	-20.1	1	99.94	78.74	84.3
	FA5V_PSETE	99.17	8	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AVEPGQVYTYK.W	627.84	1253.6292	29	1	99.93	65.68	64
	isotig 00200F1-1449	99.17	8	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.38	1402.698	33.8	1	99.93	54.29	61.9
					K.AQYLDNFSNFIGKK.Y	822.89	1643.8308	-39.7	1	99.56	45.34	31.63
					K.NLASRPYSIYVHGVSVSK.D	659.71	1976.0479	30.6	1	99.48	49.53	29.75
					K.VRDTVTIVFK.N	589.39	1176.6865	67.1	1	99.26	36.88	31.53
					K.KKEEVPVNFVDPDPESDALAK.E	553.82	2211.1421	49.2	2	95.04	28.49	34.25
					K.SWYLEDNIK.K	584.3	1166.5608	21.1	1	67.71	29.54	-
					R.GILGPVIK.A	398.81	795.5218	105.2	1	34.78	25.44	30.11
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot

68	FA5V_OXYSU	99.15	6	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.AVEPGQVYTYK.W	627.83	1253.6292	13	1	99.94	61.77	71.08
	FA5V_OXYMI	99.15	6	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.SNVM(+15.99)YTLNGYASDR.T	803.83	1605.7092	-39.7	1	99.94	56.19	69.88
	FA5V_PSETE	99.15	6	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.85	1589.7144	-18.2	1	99.93	73.86	62.02
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.38	1402.698	33.8	1	99.9	48.26	46.2
					K.ADVEQHAFVAFVDENK.S	607.03	1817.8584	115.4	1	98.4	31.49	31.28
					K.VRDTVTIVFK.N	589.4	1176.6865	84.1	1	96.22	28.76	27.78
					R.GILGPVIK.A	398.83	795.5218	155.4	1	93.49	29.31	22.11
					K.SWYLEDNIK.K	584.34	1166.5608	89.8	1	87	31.56	-
					K.SWYLEDNIKK.Y	648.35	1294.6558	22.9	1	86.75	24.1	32.18
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
69	isotig 00199F1-1426	81.21	3	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AVEPGQVYTYK.W	627.83	1253.6292	13	1	99.88	66.64	46.79
	FA5V_OXYSU	81.21	2	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.37	1402.698	19.6	1	81.15	35.65	28.88
	FA5V_OXYMI	81.21	2	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1								
	FA5V_PSETE	81.21	2	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1								
	FA5_PSETE	81.21	2	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1								
	isotig 00200F1-1449	81.21	2	VF5a OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
71	V8PGR3_OPHHA	98.72	9	Calreticulin OS=Ophiophagus hannah GN=CALR PE=3 SV=1	K.TLVVQFTVK.H	517.87	1033.6172	104.7	1	99.69	44.22	32.15
	U3F2P8_MICFL	98.72	9	Calreticulin OS=Micrurus fulvius PE=2 SV=1	K.VHVIFNYK.G	510.34	1018.56	103.5	1	99.5	63.38	24.28
	isotig 00391F3-2444	98.72	9	Calreticulin OS=Pseudonaja textilis	K.KPDDWDER.A	530.78	1059.4622	78.7	2	98.24	36.29	36.06
	G1KTK9_ANOCA	98.72	9	Uncharacterized protein OS=Anolis carolinensis GN=CALR PE=3 SV=1	R.QIDNPNYK.G	496.26	990.477	28.8	2	82.88	30.54	30.7
					K.NVLINK.D	350.78	699.4279	168	1	0.04	18.15	21.5
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
73	isotig 00199F1-1426	98.11	5	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.89	1589.7144	32.2	1	99.94	75.35	75.91
	FA5V_PSETE	98.1	3	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.SNVM(+15.99)YTLNGYASDR.T	803.85	1605.7092	-14.8	1	99.94	59.98	75.16

isotig 00200F1-1449	98.1	3	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.KKEEVPVNFVDPDPESDALAK.E	553.8	2211.1421	13	2	98.94	44.86	29.45
FA5V_OXYMI	98.1	3	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.SWYLEDNIKK.Y	648.38	1294.6558	69.3	1	92.41	38.22	-

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
75	PA2NB_NAJSP	61.57	18	Neutral phospholipase A2 B OS=Naja sputatrix PE=2 SV=1	R.SWWHFADYGCYCGRGGSGTFVDDLDL.R	974.11	2919.2124	32.8	8	99.84	46.16	36.59

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
77	NXS2_PSETE	61.63	18	Short neurotoxin 2 OS=Pseudonaja textilis GN=SNTX2 PE=2 SV=1	R.YLIPATHGNAIPAR.G	747.38	1492.8149	-46.5	4	99.94	56.02	87.43

NXS7_PSETE	61.63	18	Short neurotoxin 7 OS=Pseudonaja textilis GN=SNTX7 PE=2 SV=1	R.YIIPATHGNAITYR.G	530.65	1588.8362	57.9	2	99.94	56.3	71.73
------------	-------	----	--	--------------------	--------	-----------	------	---	-------	------	-------

isotig 00066F2-612	61.63	15	SNTx OS=Pseudonaja textilis									
-----------------------	-------	----	-----------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

isotig 00074F2-640	61.63	18	SNTx OS=Pseudonaja textilis									
-----------------------	-------	----	-----------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

NXS3_PSETE	61.63	18	Short neurotoxin 3 OS=Pseudonaja textilis GN=SNTX3 PE=2 SV=1	R.YLVPATHGNAIPAR.G	740.42	1478.7993	17.6	2	99.93	51.47	64.88
------------	-------	----	--	--------------------	--------	-----------	------	---	-------	-------	-------

isotig 00199F1-1426	60.85	1	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.NPDDIAGR.Y	429.17	856.4039	-91.5	1	99.63	31.11	52.68
------------------------	-------	---	-----------------------------	--------------	--------	----------	-------	---	-------	-------	-------

FA5_PSETE	60.55	1	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1									
-----------	-------	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

FA5V_PSETE	60.54	1	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1									
------------	-------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

isotig 00200F1-1449	60.54	1	VF5a OS=Pseudonaja textilis									
------------------------	-------	---	-----------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

V8P243_OPHHA	60.29	0	Coagulation factor V OS=Ophiophagus hannah GN=F5 PE=4 SV=1									
--------------	-------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

PA2NB_NAJSP	54.05	18	Neutral phospholipase A2 B OS=Naja sputatrix PE=2 SV=1	R.SWWHFADYGCYCGRGGSGTFVDDLDL.R	974.07	2919.2124	-8.3	1	92.01	33.55	36.18
-------------	-------	----	--	--------------------------------	--------	-----------	------	---	-------	-------	-------

PA2NA_NAJSP	54.05	18	Neutral phospholipase A2 muscarinic inhibitor OS=Naja sputatrix PE=1 SV=1									
-------------	-------	----	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
------	-----------	-----------	----------	-----------	----------	-----	-------	-----	-------	-----------	---------	----------

78	FAXC_PSETE	99.02	12	Venom prothrombin activator pseutarin-C catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=2	K.QDFGIVSGFGGIFER.G	814.92	1627.7996	15.9	1	99.94	81.8	85.58
----	------------	-------	----	--	---------------------	--------	-----------	------	---	-------	------	-------

isotig 00189F3-1385	99.02	12	VF10a OS=Pseudonaja textilis	K.LPSTESSTGRL	574.3	1146.5881	-2.4	1	99.93	48.71	68.31
------------------------	-------	----	------------------------------	---------------	-------	-----------	------	---	-------	-------	-------

isotig 00188F3-1369	99.02	12	VF10a OS=Pseudonaja textilis	K.LPSTESSTGR.L	517.79	1033.5039	59.5	1	99.86	42.17	51.45
------------------------	-------	----	------------------------------	----------------	--------	-----------	------	---	-------	-------	-------

FAXC_OXYSU	98.56	6	Oscutarin-C catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	R.AETGPLLSVDK.V	565.3	1128.6025	-15.2	1	99.68	52.47	39.09
------------	-------	---	---	-----------------	-------	-----------	-------	---	-------	-------	-------

FAXD2_DEMVE	57.95	2	Venom prothrombin activator vestarin-D2 OS=Demansia vestigiata PE=1 SV=1	K.VLKVPIYVDR.H	363.61	1087.6389	155.6	2	99.41	44.87	34.22
-------------	-------	---	--	----------------	--------	-----------	-------	---	-------	-------	-------

				R.QKLPSTESSTGRL	702.39	1402.7417	17	1	98.52	36.49	37.56
--	--	--	--	-----------------	--------	-----------	----	---	-------	-------	-------

				R.QKLPSTESSTGR.L	645.83	1289.6575	-9.3	2	83.61	30.54	33.29
--	--	--	--	------------------	--------	-----------	------	---	-------	-------	-------

				K.VPIYVDR.H	374.73	747.3915	72.2	2	4.61	22.39	21.89
--	--	--	--	-------------	--------	----------	------	---	------	-------	-------

					K.FIPWIKR.I	320.58	958.5753	149.1	1	0.03	18.3	28.25
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
80	isotig 00199F1-1426	99.15	10	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WSEGSSYSDDGTSQVER.L	881.35	1760.7124	-15.3	1	99.94	59.16	112.8
	FA5V_PSETE	99.15	6	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.86	1339.7021	2.4	1	99.93	53.85	79.73
	isotig 00200F1-1449	99.15	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.DALSGLLGPTLR.G	606.86	1211.6873	15	2	99.9	45.13	58.09
					R.LDDAVPPGQSFK.Y	637.27	1272.635	-86.1	3	99.84	40.04	50.52
					K.WLISSLVAK.H	508.82	1015.6066	18.5	1	99.67	34.18	46.84
					K.IVYREYELDFK.Q	737.96	1473.7505	105.2	2	98.02	34.5	28.51
					K.HLQAGM(+15.99) YGYLNIK.D	508.63	1522.7605	70.7	1	96.58	33.23	23.36
					R.EYELDFKQEKPR.D	527.9	1580.7834	-66.5	1	0	-	25.85
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
81	isotig 00200F1-1449	99.17	8	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.IGTWLLETEVGENQER.G	937.48	1872.9216	12.7	3	99.94	92.63	107.08
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.39	1432.7197	31.9	1	99.94	75.57	82.94
					K.SWAYYSGVNPEK.D	700.86	1399.6409	46.1	1	99.94	69.53	73.45
					K.HLGILGPIIR.A	544.83	1087.6865	-37.7	1	99.93	80.62	57.36
					R.GEVGDSLIIYFK.N	670.87	1339.7021	17.4	1	99.93	59.32	56.93
					R.GMQALFTVIDK.D	611.83	1221.6428	2.2	1	99.84	47.21	43.04
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.69	1984.9392	54.9	1	98.77	44.15	23.6
					R.SYDDKSPFLFKK.D	486.27	1455.7246	43.6	1	73.27	34.95	26.73
					R.NLASRPYSLHAHGLLYEK.S	690.46	2068.0854	131.9	1	28.67	26.36	20.23
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
82	isotig 00200F1-1449	99.04	7	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.AEVDDVIEIQFR.N	717.37	1432.7197	4	1	99.94	76.38	107.97
					K.IGTWLLETEVGENQER.G	937.49	1872.9216	23.4	2	99.94	92.09	96.47
					K.SWAYYSGVNPEK.D	700.85	1399.6409	31.8	1	99.93	60.31	62.13
					K.HLGILGPIIR.A	544.85	1087.6865	-1	1	99.92	68.57	56.95
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.69	1984.9392	54.9	1	99.81	58.1	43.63
					K.SWYFPK.S	414.27	826.4013	150.2	1	0	13.86	25.57
					R.SYDDKSPFLFKK.D	486.29	1455.7246	84.9	1	0	24.78	-

					K.EHEHPWIQIDLQR.Q	567.68	1699.843	103	1	0	23.06	-
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
83	isotig 00200F1-1449	99.19	10	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.IGTWLLETEVGENQER.G	937.46	1872.9216	-8.6	2	99.94	97.46	105.73
					R.GMQALFTVIDK.D	611.86	1221.6428	51.2	1	99.94	68.12	68.81
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.39	1432.7197	31.9	1	99.93	55.79	60.83
					K.VFTGNINSDGHVK.H	694.38	1386.6892	40.6	1	99.92	65.51	49.66
					R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.87	1237.6377	70.9	1	99.92	58.34	47.15
					K.ITSIITQGATSMTSM(+15.99)YVK.T	1025.03	2048.0171	13.9	1	99.89	39.62	51.9
					K.NSEITASSYK.K	550.32	1098.5193	96.7	2	99.89	40.37	50.04
					K.TWNQYIALR.I	582.86	1163.6086	83.2	1	99.88	37.67	50.72
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.7	1984.9392	70	1	99.85	60.93	37.06
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSM(+15.99)YVK.T	689.04	2064.012	41.7	1	99.79	49.74	34.13
					K.HFFKPPILSR.F	414.64	1240.708	153.3	1	99.69	38.74	33.09
					K.ENHIDPPIIAR.Y	425.59	1273.6777	55.3	2	99.11	36.19	27.59
					R.INLEGGTNAWQPEVNNK.D	942.47	1882.9175	4.2	1	97.58	34.58	22.79
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
84	isotig 00199F1-1426	99.1	10	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WSEGSSSYSDGTS DVER.L	881.36	1760.7124	-4	1	99.94	66.64	100.75
	FA5V_PSETE	99.1	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.DALSGLLGPTLR.G	606.9	1211.6873	81.1	1	99.93	52.25	67.62
	isotig 00200F1-1449	99.1	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.9	1339.7021	62.2	1	99.92	50.29	59.97
					K.NFATQPVSIHPQSAVYNK.W	667.72	2000.0115	63.3	1	99.23	50.03	30.81
					R.LDDAVPPGQSFK.Y	637.36	1272.635	55.3	2	99.12	39.17	41.13
					K.WLISSLVAK.H	508.84	1015.6066	57.9	1	80.35	33.5	37.52
					R.EYELDFKQEKPR.D	527.94	1580.7834	9.3	1	0	-	23.34
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
85	isotig 00199F1-1426	99.16	13	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WSEGSSSYSDGTS DVER.L	881.33	1760.7124	-38	1	99.94	75.52	104.56
	FA5V_PSETE	99.16	8	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.89	1515.7358	19.6	1	99.94	76.69	84.3
	isotig 00200F1-1449	99.16	8	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.88	1339.7021	32.3	1	99.93	65.16	66.97
	FA5_PSETE	99.04	6	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	R.DALSGLLGPTLR.G	606.89	1211.6873	64.6	1	99.91	42.5	66.91

K.WLISSLVAK.H	508.83	1015.6066	38.2	1	98.99	37.63	36.4
K.AQYLDNFSNFIGKK.Y	822.99	1643.8308	81.9	2	98.84	42.32	29.45
R.LDDAVPPGQSF.K.Y	637.35	1272.635	39.6	2	96.22	32.3	41.66
R.GILGPVIK.A	398.83	795.5218	155.4	1	80.65	26.95	30.18
K.HLQAGM(+15.99) YGYLNIK.D	508.64	1522.7605	90.4	1	57.54	27.7	-
R.EYELDFK.Q	472.25	942.4334	55.2	1	56.08	26.87	-
R.DTVTIVFK.N	461.8	921.5172	74.1	1	24.91	25.07	34.52
K.VRDTVTIVFK.N	589.37	1176.6865	33.1	1	4.17	24.42	25.32

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
86	FA5V_PSETE	99.19	14	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.IGTWLLETEVGENQER.G	937.49	1872.9216	23.4	2	99.94	95.68	114.8
					K.SWAYYSGVNPEK.D	700.86	1399.6409	46.1	1	99.94	78.86	86.55
					R.GMQALFTVIDK.D	611.87	1221.6428	67.6	1	99.93	70.62	70.05
					K.TWNQYIALR.I	582.86	1163.6086	83.2	1	99.91	47.35	53.08
					K.VFTGNINSDGHVK.H	694.39	1386.6892	55	3	99.88	51.28	47.22
					R.GM(+15.99) QALFTVIDK.D	619.84	1237.6377	22.5	1	99.88	50.07	47.2
					R.SYDDKSPELFK.K	664.79	1327.6296	-48.4	1	99.87	51.96	44.79
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.7	1984.9392	70	1	99.72	64.25	36.47
					K.NSEITASSYK.K	550.31	1098.5193	78.4	1	99.71	42.12	38.72
					K.ENHIDPPIAR.Y	637.86	1273.6777	21.7	1	99.6	46.88	33.74
					K.EHEHPWIQIDLQR.Q	567.66	1699.843	67.7	1	99.52	44.46	33.06
					R.HSETQMHFEGNSDGTTVK.E	669.01	2003.8645	71.7	1	99.45	48.96	30.47
					R.LNLEGGTNAWQPEVNNK.D	942.44	1882.9175	-27.6	1	99.27	61.15	27.12
					R.EDNQLGVLPLLPGTFAIK.M	1006.58	2011.0989	23.2	1	99.13	36.96	32.93
					K.ITSIITQGATSM(+15.99) TTSM(+15.99) YVK.T	689.05	2064.012	56.3	1	98.41	35.18	27.42
					K.NSEITASSYKK.T	614.36	1226.6143	74.3	4	73.13	29.1	28.22
					K.SWYFPK.S	414.25	826.4013	101.8	1	40.43	29.51	-
					K.ITSIITQGATSMTTSM(+15.99) YVK.T	683.69	2048.0171	15.2	1	28.68	26.73	-
					R.SYDDKSPELFKK.D	486.26	1455.7246	23.1	1	14.42	25.97	-

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
87	isotig 00200F1-1449	99.18	22	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.QVVITGIQTQGTVQLLK.H	913.53	1825.0674	-12	3	99.94	96.71	113.68
	FA5V_PSETE	99.18	19	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.IGTWLLETEVGENQER.G	937.49	1872.9216	23.4	3	99.94	79.83	109.8
	FA5V_OXYMI	99.18	20	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.ITSIITQGATSMTTSMYVK.T	1017.04	2032.0222	21.3	7	99.94	78.13	104.41
	FA5V_OXYSU	99.18	15	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	R.SYLDDTFQTPSTGGEYK.H	1019.42	2036.8853	-29.4	2	99.94	81.16	97.36
					R.AEVDVIEIQFR.N	717.43	1432.7197	87.7	4	99.94	66.64	91.15
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSMYVK.T	1025.01	2048.0171	-5.7	3	99.94	74.92	89.09
					K.SWAYYSGVNEPK.D	700.82	1399.6409	-11	1	99.94	71.36	86.58
					R.GMQALFTVIDK.D	611.87	1221.6428	67.6	1	99.94	64.26	74.93
					K.HLGILGPIIR.A	544.87	1087.6865	35.8	3	99.94	68.77	65.9
					R.LNLEGGTNAWQPEVNNK.D	942.45	1882.9175	-17	1	99.93	69.86	60.38
					K.NSEITASSYK.K	550.27	1098.5193	5.6	3	99.93	46.1	62.86
					K.TWSSWEFPLAR.L	783.4	1564.7463	25	1	99.93	65.85	57.86
					K.VFTGNINSDGHVK.H	694.34	1386.6892	-17.1	5	99.93	65.26	56.95
					K.DIHVVNFHGQTFTEGR.E	662.69	1984.9392	54.9	2	99.93	59.64	53.58
					R.EDYQLGVLPPLPGTFASIK.M	1031.05	2060.1194	-16.4	2	99.93	55.76	53.29
					R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.78	1237.6377	-74.5	1	99.92	60.03	50.09
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.82	1253.6292	-2.9	1	99.92	44.72	48.93
					R.SYDDKSPFLFK.K	664.78	1327.6296	-63.4	3	99.92	72.94	46.72
					K.TWNQYIALR.I	582.81	1163.6086	-2.7	3	99.91	46.52	45.63
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSM(+15.99)YVK.T	688.99	2064.012	-30.9	1	99.91	57.6	43.47
					R.NLASRPYSLHAHGLLYEK.S	690.34	2068.0854	-42.2	2	99.89	58.82	40.4
					K.ENHIDPPIAR.Y	425.56	1273.6777	-15.4	1	99.75	43.29	32.09
					R.SGPTDNTEK.C	474.69	947.4196	-57.2	3	99.72	41.34	31.28
					K.KEHEHPWQIDLQR.Q	458.02	1827.9382	61.6	1	99.55	26.74	39.4
					K.NSEITASSYKK.T	409.86	1226.6143	-45.8	6	99.48	28.93	36.16
					R.SYDDKSPFLFKK.D	486.25	1455.7246	2.4	2	99.2	39.05	21.62

K.EHEHPWIQIDLQR.Q	567.65	1699.843	50.1	1	98.74	27.33	28.7
K.FYNRPTR.I	550.8	1099.5562	26.6	3	98.69	32.23	22.45
R.HSETQM(+15.99)HFEGNSDGTTVK.E	674.28	2019.8594	-20.4	2	97.89	39.96	-
K.SWYFPK.S	414.19	826.4013	-43.4	1	96.8	25.81	25.54
R.HSETQMHFEGNSDGTTVK.E	1002.91	2003.8645	-29.5	1	92.08	27.14	-
K.SPELTK.K	360.72	719.3854	55.7	1	6.97	22.98	28.95

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
88	isotig 00200F1-1449	99.17	21	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSMYVK.T	1025.01	2048.0171	-5.7	1	99.94	87.19	107.91
					K.IGTWLLETEVGENQER.G	937.49	1872.9216	23.4	2	99.94	86.52	105.9
					K.ITSIITQGATSMTSM(+15.99)YVK.T	1024.99	2048.0171	-25.2	2	99.94	76	94.13
					R.SYDDTFQTPSTGGEYK.H	1019.44	2036.8853	-9.7	1	99.94	77.91	92.52
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.4	1432.7197	45.9	4	99.94	76.65	91.04
					K.DIHVVNFHGQTFTEGR.E	662.69	1984.9392	54.9	1	99.94	82.85	77.61
					K.SWAYYSGVNPEK.D	700.85	1399.6409	31.8	1	99.94	76.56	77.31
					R.GMQALFTVIDK.D	611.84	1221.6428	18.6	1	99.94	69.2	75.04
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.83	1253.6292	13	1	99.94	64.33	70.87
					R.QVVITGIQTQGTVQLLK.H	913.53	1825.0674	-12	2	99.94	66.71	67.19
					R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.84	1237.6377	22.5	1	99.93	64.8	62.56
					R.SYDDKSPELTK.K	664.78	1327.6296	-63.4	2	99.93	77.26	61.15
					K.VFTGNINSDGHVK.H	694.37	1386.6892	26.1	2	99.93	59.96	60.31
					K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.84	1515.7358	-46.4	1	99.93	68.81	58.31
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.89	1211.6873	64.6	1	99.92	42.94	57.11
					K.HLGILGPIIR.A	544.84	1087.6865	-19.3	2	99.92	72.38	47.83
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.38	1402.698	33.8	1	99.89	39.86	44.52
					K.TWNQYIALR.I	582.87	1163.6086	100.4	1	99.88	47.33	41.41
					K.HFFKPPILSR.F	414.59	1240.708	32.4	1	99.83	44.99	36.75
					K.NSEITASSYK.K	550.3	1098.5193	60.2	1	99.77	36.27	42.5
					K.ENHIDPPIAR.Y	425.59	1273.6777	55.3	2	99.49	46.04	27.22
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSM(+15.99)YVK.T	689.03	2064.012	27.3	1	99.44	40.2	27.1

K.NFATQPVSIHPQSAVYNK.W	667.71	2000.0115	48.4	1	99.4	40.31	26.47
R.SYDDKSPFLFKK.D	486.25	1455.7246	2.4	1	99.25	34.78	30.54
R.NPDDIAGR.Y	429.25	856.4039	95.3	2	98.8	25.64	42.18
K.SWYFPK.S	414.22	826.4013	29.2	1	81.9	29.43	30.01
K.NSEITASSYKK.T	614.34	1226.6143	41.8	3	68.18	23.78	29.39
K.FYNRPFTFR.I	367.58	1099.5562	147.3	2	41.97	30.13	-
R.NLASRPYSLHAHGLLYEK.S	690.4	2068.0854	44.9	1	0.01	11.94	20.69
R.GILGPVIK.A	398.79	795.5218	54.9	1	0.01	-	24.46

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
89	isotig 00199F1-1426	98.4	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.9	1515.7358	32.8	1	99.93	83.14	90.68
	FA5V_OXYMI	98.4	4	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.AVEPGQVYTYK.W	627.86	1253.6292	60.8	1	99.91	69.89	53.13
	FA5V_PSETE	98.4	4	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.41	1402.698	76.6	1	99.84	56.28	43.84
	isotig 00200F1-1449	98.4	4	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.NLASRPYSIYVHGVSVSK.D	659.72	1976.0479	45.7	1	0.34	12.55	22.53
	FA5V_OXYSU	98.35	4	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1								
	FA5_PSETE	98.35	4	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1								

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
90	isotig 00199F1-1426	97.66	4	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.92	1515.7358	59.1	1	99.93	106.3	97.29
	FA5V_OXYSU	97.66	2	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.AVEPGQVYTYK.W	627.87	1253.6292	76.8	1	99.75	73.07	40
	FA5V_OXYMI	97.66	2	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.39	1402.698	48.1	1	83.42	30.49	-
	FA5V_PSETE	97.66	2	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1								
	FA5_PSETE	97.66	2	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1								
	isotig 00200F1-1449	97.66	2	VF5a OS=Pseudonaja textilis								

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
91	isotig 00199F1-1426	99.01	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.92	1515.7358	59.1	1	99.93	89.71	71.73
	FA5V_OXYMI	99.01	4	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2	K.SNVM(+15.99) YTLNGYASDR.T	803.89	1605.7092	35	1	99.93	60.61	72.27

SV=1

FA5V_PSETE	99.01	4	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AVEPGGVYTYK.W	627.89	1253.6292	108.7	1	99.93	61.68	59.38
isotig 00200F1-1449	99.01	4	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.4	1402.698	62.4	1	99.73	47.9	38.9
FA5V_OXYSU	99.01	4	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	R.DTVTIVFK.N	461.78	921.5172	30.7	1	96.95	37.78	24.07

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
92	isotig 00199F1-1426	98.71	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.94	1515.7358	85.5	1	99.93	95.29	72.54
	FA5V_OXYMI	98.71	4	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.AVEPGGVYTYK.W	627.86	1253.6292	60.8	1	99.76	71.2	39.75
	FA5V_PSETE	98.71	4	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.38	1402.698	33.8	1	98.83	36.7	34.45
	isotig 00200F1-1449	98.71	4	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.KKEEVPVNFVDPEDSALAK.E	553.83	2211.1421	67.3	2	75.38	26.69	23.23
	FA5V_OXYSU	98.33	2	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1								
	FA5_PSETE	98.33	2	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1								

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
93	FA5V_OXYMI	99.08	5	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.92	1515.7358	59.1	1	99.93	97.21	98.04
	FA5V_PSETE	99.08	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.AVEPGGVYTYK.W	627.85	1253.6292	44.9	1	99.93	69.54	74.27
	FA5V_OXYSU	99.06	5	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.WTVLDTDEPTVK.D	702.39	1402.698	48.1	1	99.93	54.2	69.93
	FA5_PSETE	99.05	5	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	K.SNVM(+15.99)YTLNGYASDR.T	803.88	1605.7092	22.6	1	99.92	61.3	57.41
					K.ADVEQHAFVAFDENK.S	607.02	1817.8584	98.9	1	98.8	49.95	31.01

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
98	isotig 00199F1-1426	98.36	5	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.SNVMYTLNGYASDR.T	795.73	1589.7144	- 169.2	1	99.94	99.38	91.76
	FA5V_OXYMI	98.36	3	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.SWYLEDNIKK.Y	648.22	1294.6558	- 177.9	1	99.9	54.23	47.38
	FA5V_PSETE	98.36	3	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.KKEEVPVNFVDPEDSALAK.E	737.92	2211.1421	- 182.7	1	99.28	44.74	27.32
	isotig 00200F1-1449	98.36	3	VF5a OS=Pseudonaja textilis								
	EXE2_HELSC	61.31	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.1	978.5499	- 372.4	1	99.93	59.62	67.36

	EXE2_HEL SU	61.31	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3									
	HKS_HEL SS	61.27	100	Helokinetastin-1 OS=Heloderma suspectum suspectum PE=1 SV=1	GPPYQPLVPR	562.17	1122.6184	-261	1	99.87	63.86	41.88	
	HKS_HEL HO	61.27	100	Helokinetastin-1 OS=Heloderma horridum horridum PE=1 SV=1									
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot	
99	EXE2_HEL SC	61.61	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.11	978.5499	-352	1	99.93	63.26	74.19	
	EXE2_HEL SU	61.61	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3									
	HKS_HEL SS	61.51	100	Helokinetastin-1 OS=Heloderma suspectum suspectum PE=1 SV=1	GPPYQPLVPR	562.17	1122.6184	-261	1	99.81	64.66	46.22	
	HKS_HEL HO	61.51	100	Helokinetastin-1 OS=Heloderma horridum horridum PE=1 SV=1									
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot	
112	isotig 00199F2-1431	99.09	14	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.HFFKPPILSR.F	414.51	1240.708	-161	1	99.93	69.18	58.58	
	FA5V_PSETE	99.09	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.ENHIDPPIIAR.Y	425.51	1273.6777	-133.1	2	99.93	51.73	60.88	
	FA5_PSETE	99.09	5	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	K.ITSIITQGATSMTTSMYVK.T	678.31	2032.0222	-56.1	1	99.92	69.06	48.79	
	isotig 00200F1-1449	99.09	5	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.NSEITASSYK.K	550.22	1098.5193	-85.5	1	99.91	38.51	53.72	
	FA5V_OXYSU	99	4	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.VFTGNINS DGHVK.H	463.17	1386.6892	-144.9	1	99.89	46.62	40.34	
					K.TWNQYIALR.I	582.79	1163.6086	-37.2	1	99.86	34.93	46.58	
					K.ITSIITQGATSM TSM(+15.99) YVK.T	683.65	2048.0171	-43.4	1	99.8	58.07	32.33	
					K.ITSIITQGATSM(+15.99) TTSM(+15.99) YVK.T	688.98	2064.012	-45.5	1	99.47	42.89	26	
					K.NSEITASSYKK.T	614.26	1226.6143	-88.7	2	99.09	38.39	23.56	
					K.ITSIITQGATSM(+15.99) TTSMYVK.T	683.63	2048.0171	-72.7	1	97.82	43.28	-	
	EXE2_HEL SC	60.9	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.19	978.5499	-188.5	1	99.92	50.3	46.65	
	EXE2_HEL SU	60.9	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3									
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot	
114	R4G7K2_9SAUR	67.68	10	Pseudonaja modesta CRISP-Pse-11 mRNA sequence	A.TVDFASESSNK.A	43.26	1183.5356	-143.8	592.69	2	1	N	
					G.NMLQMK.T	36.98	763.3721	-192.1	382.62	2	1	N	
					A.DLCIVR.C	17.77	717.3843	-58	718.35	1	1	N	
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot	
115	CRVP_PSETE	71.05	9	Pseudonaja textilis pseudochetoxin-like protein precursor mRNA complete cds	A.TVDFASESSNK.A	42.74	1183.5356	-59.3	592.74	2	2	N	

isotig 00418	71.05	4	pseudechetoxin-like precursor	A.TVDFASESSNKNDYQK.G	34.58	1831.8224	-89.6	611.56	3	2	N
				G.NMLQMK.T	33.04	763.3721	-218.3	382.61	2	1	N
				G.NMLQM(+15.99)K.T	24.78	779.367	-207.3	390.61	2	1	Y
isotig 00814	25.86	5	a2	C.PSTWLPR.C	17.46	855.4603	-181	428.66	2	1	N
				A.YHWQR.T	16.81	788.3718	-62.3	789.33	1	1	N

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
116	FA5V_PSETE	99.06	4	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.VFTGNINSDGHVK.H	463.18	1386.6892	-123.4	1	99.92	61.58	47.15
	FA5_PSETE	99.06	4	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	K.HLGILGPIIR.A	544.83	1087.6865	-37.7	1	99.91	65.92	40.97
	isotig 00200F1-1449	99.06	4	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.82	1237.6377	-9.9	1	99.82	43.6	33.5
	FA5V_OXYMI	99.05	4	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	K.ENHIDPPIIAR.Y	425.52	1273.6777	-109.6	2	99.77	37.59	33.04
					K.NSEITASSYK.K	550.21	1098.5193	-103.6	1	99.66	30.92	41.49
					K.NSEITASSYKK.T	614.27	1226.6143	-72.4	1	99.51	34.46	26.89

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
117	isotig 00199F1-1426	99.08	9	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AVEPGQVYTYK.W	627.79	1253.6292	-50.8	1	99.93	76.08	64.36
	FA5V_PSETE	99.08	6	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.79	1339.7021	-102.1	1	99.93	62.59	64.7
	isotig 00200F1-1449	99.08	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.DALSGLLGPTLR.G	606.84	1211.6873	-18	1	99.93	59.38	60.99
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.32	1402.698	-51.7	1	99.93	54.92	57.47
					K.NFATQPVSIHPQSAVYNK.W	667.65	2000.0115	-41.6	1	99.76	38.9	37.34
					K.VRDITVIVFK.N	589.31	1176.6865	-68.9	1	99.68	37.91	35
					K.LYHSAVDM(+15.99)TR.D	403.47	1207.5654	-146.8	1	22.09	27.54	20.79

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
118	isotig 00200F1-1449	99.15	12	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.AEVDDVIEIQFR.N	717.34	1432.7197	-37.8	1	99.93	71.18	58.68
	isotig 00199F1-1426	98.99	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.81	1237.6377	-26.1	1	99.93	49.26	61.83
					K.ENHIDPPIIAR.Y	425.51	1273.6777	-133.1	2	99.93	43.75	53.72
					K.HLGILGPIIR.A	544.83	1087.6865	-37.7	1	99.93	65.05	45.27
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.79	1253.6292	-50.8	1	99.92	48.72	46.09
					K.HFFKPPILSR.F	414.51	1240.708	-161	1	99.92	57.18	41.24

K.ITSIITQGATSM(+15.99) TTSM(+15.99) YVK.T	688.98	2064.012	-45.5	1	99.92	57.81	39.84
R.DALSGLLGPTLR.G	606.81	1211.6873	-67.5	1	99.91	42.39	39.83
R.NPDDIAGR.Y	429.12	856.4039	-208.3	1	99.89	32.03	48.88
K.NSEITASSYK.K	550.2	1098.5193	-121.8	1	99.89	34.36	47.31
K.NSEITASSYKK.T	614.27	1226.6143	-72.4	1	99.81	31.4	36.29
K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.61	1984.9392	-66	1	99.77	42.09	28.19
K.VFTGNINSDGHVK.H	463.17	1386.6892	-144.9	1	99.76	30.23	33.56
R.SYDDKSPLEFKK.D	486.15	1455.7246	-203.6	1	99.38	37.36	24.81
K.IGTWLLETEVGENQER.G	625.3	1872.9216	-23.2	1	97.92	41.98	-

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
119	isotig 00200F1-1449	99.2	13	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.84	1339.7021	-27.4	1	99.93	74.87	92.94
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.8	1253.6292	-34.9	1	99.93	79.57	72.76
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.36	1432.7197	-10	1	99.93	79.59	71.61
					K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.83	1515.7358	-59.6	1	99.93	74.07	70.23
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.34	1402.698	-23.2	1	99.92	64.78	63.04
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.86	1211.6873	15	1	99.92	53.77	58.13
					K.WSEGSSYSDGTS DVER.L	881.33	1760.7124	-38	1	99.9	55.72	47.18
					R.EYVLMFSVFDESK.N	797.35	1592.7432	-36.3	1	99.89	53.1	45.84
					K.IGTWLLETEVGENQER.G	625.3	1872.9216	-23.2	1	99.85	52.6	41.09
					K.TWNQYIALR.I	582.79	1163.6086	-37.2	1	99.75	33.27	39.68
					K.NSEITASSYK.K	550.22	1098.5193	-85.5	1	98.69	35.39	24.4
					K.HLGILGPIIR.A	544.84	1087.6865	-19.3	1	97.73	45.82	-
					K.VRDTVTVIVFK.N	589.32	1176.6865	-51.9	1	97.65	30.14	23.04
					K.SWYLEDNIK.K	584.28	1166.5608	-13.1	1	96.99	36.89	-
					K.VFTGNINSDGHVK.H	463.19	1386.6892	-101.7	1	94.68	28.82	-
					R.GILGPVIK.A	398.72	795.5218	-121.1	1	94.51	28.14	-
					R.DTVTVIVFK.N	461.73	921.5172	-77.8	1	86.25	24.97	-
					K.SWYLEDNIKK.Y	648.28	1294.6558	-85.2	1	70.28	21.07	25.03
	HKS_HELSS	60.99	100	Helokinestatin-1 OS=Heloderma suspectum suspectum PE=1 SV=1	GPPYQPLVPR	562.31	1122.6184	-11.5	1	99.21	34.31	29.32

HKS_HELHO		60.99	100	Helokinestatin-1 OS=Heloderma horridum horridum PE=1 SV=1								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
120	isotig 00200F1-1449	99.15	15	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.SWAYYSGVNPKEK.D	700.81	1399.6409	-25.3	1	99.93	83.05	86.29
	FA5V_OXYSU	99.14	10	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	R.GMQALFTVIDK.D	611.82	1221.6428	-14.2	1	99.93	66.46	87.08
					R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.83	1237.6377	6.3	1	99.93	64.52	78.58
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.35	1432.7197	-24	1	99.93	76.07	75.8
					K.ENHIDPPIIAR.Y	425.53	1273.6777	-86	2	99.91	48.59	54.27
					K.TWNQYIALR.I	582.8	1163.6086	-20	1	99.89	45.1	48.97
					K.HLGILGPIIR.A	544.83	1087.6865	-37.7	2	99.89	77.63	48.43
					R.NPDDIAGR.Y	429.13	856.4039	-185	2	99.89	37.74	54.65
					K.NSEITASSYK.K	550.23	1098.5193	-67.3	1	99.89	41.6	49.18
					K.IGTWLLETEVGENQER.G	625.32	1872.9216	8.8	1	99.87	71.14	44.99
					K.VFTGNINSDGHVK.H	463.18	1386.6892	-	1	99.53	41.85	32.75
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.65	1984.9392	-5.5	1	99.41	45.41	30.32
					R.SYDDKSPELFK.K	443.42	1327.6296	-	1	99.37	47.71	29.7
					R.SYLDDTFQTPSTGGEYK.H	679.94	2036.8853	-42.7	1	99.26	46.56	28.18
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.87	1211.6873	31.5	1	98.77	36.59	24.96
					K.NSEITASSYKK.T	614.28	1226.6143	-56	2	98.4	30.09	30.03
					K.SPELFK.K	360.63	719.3854	-	1	98.17	31.23	25.01
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSM(+15.99)YVK.T	689	2064.012	-16.4	1	97.98	31.23	23.69
					R.HSETQMHFEGNSDGTTVK.E	668.94	2003.8645	-33.1	1	97.33	35.97	-
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.82	1253.6292	-2.9	1	89.98	23.18	33.09
					K.ITSIITQGATSMTTSM(+15.99)YVK.T	683.65	2048.0171	-43.4	1	85.61	27.69	-
					R.SYDDKSPELFKK.D	486.18	1455.7246	-	1	84.57	26.52	-
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSMYVK.T	683.66	2048.0171	-28.8	1	82.8	24.68	-
					R.HSETQM(+15.99)HFEGNSDGTTVK.E	674.26	2019.8594	-50.1	1	82.41	24.31	-
					R.TIDIR.E	309.14	616.3544	-	1	17.32	20.26	20.48
								144.3				
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot

121	isotig 00200F1-1449	99.17	10	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.SWAYYSGVNPEK.D	700.8	1399.6409	-39.6	1	99.93	55.24	70.2
					R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.82	1237.6377	-9.9	1	99.93	54.03	61.56
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.35	1432.7197	-24	1	99.92	58.31	49.08
					R.NPDDIAGR.Y	429.15	856.4039	-138.3	1	99.91	36.38	49.65
					K.ENHIDPPIAR.Y	425.53	1273.6777	-86	2	99.91	38.43	48.24
					K.HLGILGPIIR.A	544.82	1087.6865	-56.1	1	99.89	53.69	40.4
					K.HFFKPPILSR.F	414.53	1240.708	-112.7	1	99.83	43.75	35.61
					K.NSEITASSYK.K	550.23	1098.5193	-67.3	1	99.83	34.31	44.29
					K.VFTGNINSDGHVK.H	463.2	1386.6892	-80	1	99.7	39.84	30.26
					K.TWNQYIALR.I	582.8	1163.6086	-20	1	99.67	29.91	46.22
					K.IGTWLLETEVGENQER.G	625.31	1872.9216	-7.2	1	99.62	38.29	28.59
					K.NSEITASSYKK.T	614.3	1226.6143	-23.5	2	99.49	22.37	44.77
					R.SYDDKSPELFKK.D	486.2	1455.7246	-100.6	1	66.57	24.23	-
					R.HSETQMHEFGNSDGTTVK.E	668.95	2003.8645	-18.1	1	66.07	24.07	-
	EXE2_HELSC	60.63	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.25	978.5499	-65.8	1	99.59	37.01	27.98
	EXE2_HEL SU	60.63	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
122	isotig 00200F1-1449	99.19	16	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.82	1237.6377	-9.9	1	99.93	64.35	75.55
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.35	1432.7197	-24	1	99.93	80.35	70.01
					K.SWAYYSGVNPEK.D	700.81	1399.6409	-25.3	1	99.93	77.33	62.56
					K.ENHIDPPIAR.Y	425.52	1273.6777	-109.6	2	99.92	45.79	57.4
					K.TWNQYIALR.I	582.79	1163.6086	-37.2	1	99.91	46.06	50.31
					K.IGTWLLETEVGENQER.G	625.3	1872.9216	-23.2	1	99.91	67.37	49.33
					K.HLGILGPIIR.A	544.83	1087.6865	-37.7	1	99.9	84.47	47.41
					K.HFFKPPILSR.F	414.52	1240.708	-136.9	1	99.9	64.13	45.95
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.82	1253.6292	-2.9	1	99.87	63.87	42.36
					K.VFTGNINSDGHVK.H	463.17	1386.6892	-144.9	2	99.64	38.63	33.36
					R.SYLDDTFQTPSTGGEYEH	679.95	2036.8853	-28	1	99.59	43.61	31.12
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSM(+15.99)YVK.T	688.99	2064.012	-30.9	1	99.55	44.91	30.45

					R.GMQALFTVIDK.D	611.78	1221.6428	-79.7	1	99.08	45.02	23.94
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.65	1984.9392	-5.5	1	97.92	47.27	-
					R.SYDDKSPELFKK.D	486.2	1455.7246	-100.6	1	97.56	38.22	-
					K.NSEITASSYK.K	550.23	1098.5193	-67.3	1	97.53	30.95	31.56
					R.HSETQM(+15.99)HFEGNSDGTTVK.E	674.27	2019.8594	-35.2	1	92.71	33.89	-
					K.FYNRPTR.F	367.45	1099.5562	-207.3	1	63.92	25.42	25.73
					K.SWYFPK.S	414.15	826.4013	-140.2	1	26.67	23.41	-
					K.NSEITASSYK.T	614.28	1226.6143	-56	2	22.58	21.32	-
					R.TIDIR.E	309.15	616.3544	-111.9	1	13.06	19.05	24.79

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
123	isotig 00200F1-1449	99.17	16	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.SWAYYSGVNPEK.D	700.8	1399.6409	-39.6	1	99.93	47.03	85.98
	FA5V_OXYMI	99.17	13	Venom prothrombin activator omicarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1	R.AEVDDVIEIQFR.N	717.34	1432.7197	-37.8	2	99.93	52.66	70.55
					R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.83	1237.6377	6.3	1	99.93	45.33	76.15
					R.GMQALFTVIDK.D	611.81	1221.6428	-30.6	1	99.93	46.53	65.06
					K.IGTWLLETEVGENQER.G	625.29	1872.9216	-39.3	1	99.93	45.47	59.95
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.62	1984.9392	-50.9	1	99.93	49.99	54.25
					K.HLGILGPIIR.A	544.82	1087.6865	-56.1	1	99.92	49.73	47.88
					R.NPDDIAGR.Y	429.14	856.4039	-161.6	2	99.91	30.48	55.22
					K.ENHIDPPIAR.Y	425.52	1273.6777	-109.6	2	99.9	30.59	51.54
					K.HFFKPPILSR.F	414.53	1240.708	-112.7	1	99.9	40.87	43.81
					K.VFTGNINSDGHVK.H	463.18	1386.6892	-123.4	1	99.89	30.24	46.38
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.85	1211.6873	-1.5	1	99.88	32.5	42.06
					R.SYLDDTFQTPSTGGYEK.H	679.94	2036.8853	-42.7	2	99.87	37.24	38.56
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.81	1253.6292	-18.9	1	99.86	33.6	38.83
					K.TWNQYIALR.I	582.81	1163.6086	-2.7	1	99.8	27.95	44.95
					K.NSEITASSYK.K	550.23	1098.5193	-67.3	1	99.79	28.23	42.79
					R.HSETQMHEGNSDGTTVK.E	668.94	2003.8645	-33.1	1	99.55	33.88	26.62
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSM(+15.99)YVK.T	688.98	2064.012	-45.5	1	99.29	30.71	23.22

R.HSETQM(+15.99)HFEGNSDGTTVK.E	674.26	2019.8594	-50.1	1	99	30.56	20.12
R.SYDDKSPELFKK.D	486.18	1455.7246	-	1	97.46	25.8	21.06
K.NSEITASSYKK.T	614.28	1226.6143	-56	1	95.83	21.27	34.29
K.ITSIIITQGATSMTTSM(+15.99)YVK.T	683.64	2048.0171	-58	1	94.68	27.51	-
K.SPELTK.K	360.63	719.3854	-	1	66.58	21.93	24.96
K.SWYFPK.S	414.16	826.4013	-116	1	16.85	21.01	-
K.ITSIIITQGATSMTTSMYVK.T	678.27	2032.0222	-	1	14.75	19.48	-

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
124	FA5V_PSETE	99.16	19	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.82	1237.6377	-9.9	1	99.93	68.04	97.83
		99.16	18	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.SWAYYSGVNPKEK.D	700.79	1399.6409	-53.9	1	99.93	80.78	86.44
	isotig 00200F1-1449	99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	R.GMQALFTVIDK.D	611.82	1221.6428	-14.2	1	99.93	67.99	81.22
	FA5V_OXYSU	99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	R.SYLDLDTFTPTSTGGYEYK.H	1019.4	2036.8853	-49	2	99.93	77.31	74.66
		99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.ITSIIITQGATSMTTSM(+15.99)YVK.T	683.64	2048.0171	-58	1	99.93	61.75	66.55
	FA5V_OXYSU	99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.VFTGNINSDGHVK.H	694.24	1386.6892	-	2	99.93	75.76	66.26
		99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.IGTWLLETEVGENQER.G	625.31	1872.9216	-7.2	1	99.93	73.79	65.51
	FA5V_OXYSU	99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.ITSIIITQGATSM(+15.99)TTSM(+15.99)YVK.T	1032.98	2064.012	-32.2	2	99.93	60.59	64.66
		99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.DIHVVNFHGGQTFTEEGR.E	662.66	1984.9392	9.5	1	99.93	75.54	63.04
	FA5V_OXYSU	99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	R.SYDDKSPELFKK.K	664.8	1327.6296	-33.3	2	99.93	80.19	57.47
		99.16	14	Venom prothrombin activator oscutarin-C non-catalytic subunit OS=Oxyuranus scutellatus PE=1 SV=1	K.HLGILGPIIR.A	363.53	1087.6865	-	3	99.93	50.41	56.79

R.HSETQMHEGNSDGTTVK.E	668.93	2003.8645	-48.1	1	99.84	55.61	34.81
K.EHEHPWIQIDLQR.Q	567.6	1699.843	-38.2	1	99.84	32.53	40.09
K.SPELFK.K	360.64	719.3854	-	1	99.59	32.16	30.28
K.NLASRPYSLHAHGLLYEK.S	690.34	2068.0854	-42.2	1	99.44	52.02	24.45
K.SWYFPK.S	414.15	826.4013	-	1	98.86	31.07	22.11
K.FYNRPTRF.I	367.44	1099.5562	-	1	98.79	31.23	21.5
R.TIDIR.E	309.14	616.3544	-	1	79.52	20.91	25.71
R.EFVLFFMVFDDEKSWYFPK.S	830.04	2487.186	-35.4	1	0.34	-	26.45

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
125	isotig 00200F1-1449	99.19	15	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.85	1515.7358	-33.3	1	99.93	72.24	85.61
					R.GEVGDSLIIYFK.N	670.83	1339.7021	-42.3	1	99.93	67.84	73.55
					K.AVEPGQVYTYK.W	627.81	1253.6292	-18.9	1	99.93	62.91	69.55
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.34	1432.7197	-37.8	1	99.93	60.95	68.31
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.84	1211.6873	-18	1	99.93	52.15	65.22
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.35	1402.698	-9	1	99.92	45.72	55.9
					K.HLQAGM(+15.99) YGYLNIK.D	508.55	1522.7605	-86.9	1	99.87	48.43	44.43
					K.NSEITASSYK.K	550.23	1098.5193	-67.3	1	99.85	35.15	48.31
					K.ENHIDPPIAR.Y	425.53	1273.6777	-86	2	99.75	34.67	40.79
					K.NFATQPVSIHPQSAVYNK.W	667.67	2000.0115	-11.7	1	99.66	45.13	34.29
					K.HLGILGPIIR.A	544.81	1087.6865	-74.5	1	99.56	56.75	31.87
					K.LYHSAVDM(+15.99) TR.D	403.46	1207.5654	-	1	99.44	34.63	32.91
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.65	1984.9392	-5.5	1	98.94	44.52	23.09
					K.ITSIITQGATSM(+15.99) TTSM(+15.99) YVK.T	688.99	2064.012	-30.9	1	98.75	35.79	24.86
					K.ITSIITQGATSMTTSMYVK.T	678.32	2032.0222	-41.3	1	98.34	32.49	23.31
					K.HFFKPPILSR.F	414.54	1240.708	-88.5	1	98.12	31.64	22.34
					R.GILGPVIK.A	398.72	795.5218	-	1	96.45	32.04	-
					R.EYELDFK.Q	472.17	942.4334	114.5	1	96.42	27.08	26.84
					K.TWNQYIALR.I	582.8	1163.6086	-20	1	1.26	22.77	29.29
					K.NSEITASSYKK.T	614.27	1226.6143	-72.4	1	0.39	18.41	24.23

					K.AQYLDNFSNFIGKK.Y	548.94	1643.8308	-19.9	1	0.18	13.73	21.15
					K.VRDTVTIVFK.N	589.3	1176.6865	-85.9	1	0	-	22.34
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
126	isotig 00199F1-1426	99.2	14	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.EYVLMFSVFDESK.N	797.48	1592.7432	127	1	99.93	76.31	79.13
	FA5V_PSETE	99.2	9	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.93	1339.7021	107	1	99.93	76.79	74.77
	isotig 00200F1-1449	99.2	9	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AVEPGQVYTYK.W	627.87	1253.6292	76.8	1	99.93	71.52	68.54
					K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.93	1515.7358	72.3	1	99.93	80.22	67.8
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.42	1402.698	90.8	1	99.92	39.59	62.34
					K.WSEGSSYSDGTS DVER.L	881.41	1760.7124	52.8	1	99.63	48.3	32.08
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.92	1211.6873	114	1	99.54	34.05	32.88
					K.NFATQPVSIIHPQSAVYNK.W	667.76	2000.0115	123.4	1	98.83	34.42	25.64
					K.NLASRPYSIYVHGVSVSK.D	659.76	1976.0479	106.5	1	98.28	35.51	21.02
	EXE4_HEL SU	61.65	14	Exendin-4 OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=2	R.HGEGTFTSDLSK.Q	639.85	1277.5889	75.6	1	99.92	62.53	52.86
	EXE4_HEL SC	61.65	14	Exendin-4 OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1								
	EXE2_HEL SC	61.52	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.33	978.5499	97.7	1	99.79	54.8	36.04
	EXE2_HEL SU	61.52	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
127	isotig 00199F1-1426	99.16	15	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.92	1515.7358	59.1	1	99.93	81.75	83.26
	FA5V_PSETE	99.16	10	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.91	1339.7021	77.1	1	99.93	68.28	76.58
	isotig 00200F1-1449	99.16	10	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.AVEPGQVYTYK.W	627.89	1253.6292	108.7	1	99.93	65.71	67.31
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.95	1211.6873	163.6	1	99.93	56.53	66.94
					K.WTVLDTDEPTVK.D	702.42	1402.698	90.8	1	99.92	55.08	58.31
					K.WSEGSSYSDGTS DVER.L	881.4	1760.7124	41.5	1	99.8	38.76	46.38
					K.NLASRPYSIYVHGVSVSK.D	659.76	1976.0479	106.5	1	98.44	47.6	22.67
					K.NFATQPVSIIHPQSAVYNK.W	667.74	2000.0115	93.3	1	94.46	33.71	25.12
					K.VRDTVTIVFK.N	589.39	1176.6865	67.1	1	73.19	28.03	-
					K.LYHSAVDM (+15.99) TR.D	403.55	1207.5654	51.9	1	71.74	26.62	-
					R.EYELDFK.Q	472.26	942.4334	76.5	1	36.34	21.8	25.94

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
130	FA5V_PSETE	99.2	12	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1 Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	K.IGTWLLETEVGQNQR.G	937.52	1872.9216	55.5	1	99.93	95.53	92.08
	FA5_PSETE	99.2	12		R.GM(+15.99)QALFTVIDK.D	619.92	1237.6377	151.7	1	99.93	80.16	74.81
					R.GMQALFTVIDK.D	611.93	1221.6428	165.9	1	99.92	57.77	67.62
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.74	1984.9392	130.4	1	99.92	88.52	61.31
					K.ITSIITQGATSM(+15.99)TTSM(+15.99)YVK.T	1033.1	2064.012	84	2	99.92	72.69	54.74
					K.TWNQYIALR.I	582.9	1163.6086	152	1	99.89	49.43	44.5
					K.VFTGNINSDGHVK.H	694.37	1386.6892	26.1	2	99.88	60.66	43.09
					K.TWSSWEPSLAR.L	753.42	1504.71	76.7	1	99.84	43.53	39.06
					K.HFFKPPILSR.F	414.62	1240.708	104.9	1	99.81	68.25	37.02
					K.NSEITASSYKK.T	614.38	1226.6143	107	1	99.7	25.58	47.72
					K.NSEITASSYK.K	550.31	1098.5193	78.4	1	99.45	41.11	28.4
					K.EHEHPWIIQIDLQR.Q	567.71	1699.843	156	1	98.95	38.82	23.31
					R.HSETQM(+15.99)HFEGNSDGTTVK.E	674.35	2019.8594	83.5	1	97.75	43.08	-
					R.SYDDKSPELFKK.D	486.3	1455.7246	105.5	1	89.62	28.32	-
					K.ENHIDPPIIAR.Y	637.87	1273.6777	37.5	1	88.56	26.69	-
	PA2B2_NAJMO	61.66	9	Basic phospholipase A2 CM-II OS=Naja mossambica PE=1 SV=1	R.YIDANYNINLK.E	670.93	1339.6772	125.5	1	99.92	68.21	73.37
	EXE2_HELSC	61.65	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.34	978.5499	118.1	1	99.92	64.41	70.9
	EXE2_HEL SU	61.65	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
131	isotig 00200F1-1449	99.12	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.AEVDDVIEIQFR.N	717.46	1432.7197	129.7	1	99.94	81.14	79.09
					K.HLGILGPIIR.A	544.93	1087.6865	146.1	1	99.88	88.51	45.9
					R.SYLDDTFTPTSTGGYEYK.H	1019.51	2036.8853	59	1	99.58	71.39	34.91
					K.ENHIDPPIIAR.Y	637.9	1273.6777	84.6	1	97.62	37.99	-
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.75	1984.9392	145.6	1	97.56	35.52	-
					R.NLASRPYSLHAHGLLYEK.S	690.44	2068.0854	102.9	1	95.13	30.98	-
	PA2B2_NAJMO	60.98	9	Basic phospholipase A2 CM-II OS=Naja mossambica PE=1 SV=1	R.YIDANYNINLK.E	670.92	1339.6772	110.6	1	99.19	60.77	28.75
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot

132	isotig 00199F1-1426	99.12	8	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.95	1339.7021	136.8	1	99.94	94.91	93.29
	FA5V_PSETE	99.12	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.DALSGLLGPTLR.G	606.89	1211.6873	64.6	3	99.93	68.03	56.81
	isotig 00200F1-1449	99.12	5	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.HLQAGM(+15.99) YGYLNIK.D	762.47	1522.7605	108.3	2	99.81	58.41	37.74
					R.LDDAVPPGQSFY.Y	637.39	1272.635	102.5	1	98.96	34.15	24.22
					R.EYVLM(+15.99) FSVFDESK.N	805.44	1608.738	79.2	1	98.02	27.54	24.71
					R.EYELDFK.Q	472.25	942.4334	55.2	1	97.84	23.54	27.4
					R.EYELDFKQEKPR.D	527.94	1580.7834	9.3	1	54.11	18.91	24.96
	EXE2_HELSC	61.6	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.33	978.5499	97.7	1	99.87	43.68	43.34
	EXE2_HELSE	61.6	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
133	isotig 00200F1-1449	99.13	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.SYLDFTFQTPSTGGEYK.H	1019.51	2036.8853	59	1	99.94	73.97	57.29
					K.HLGILGPIIR.A	544.92	1087.6865	127.7	1	99.93	82.73	52.31
					R.AEVDDVIEIQFR.N	717.46	1432.7197	129.7	1	99.93	76.6	49.04
					R.GEVGDSLIIYFK.N	670.94	1339.7021	121.9	1	99.78	59.38	30.53
					R.DALSGLLGPTLR.G	606.91	1211.6873	97.5	1	98.96	36.93	21.04
					R.NLASRPYSLHAHGLLYEK.S	690.43	2068.0854	88.3	1	94.11	24.82	-
	PA2B2_NAJMO	61.62	9	Basic phospholipase A2 CM-II OS=Naja mossambica PE=1 SV=1	R.YIDANYNINLK.E	670.91	1339.6772	95.7	1	99.89	45.99	37.83
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
134	FA5V_PSETE	99.15	6	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.91	1339.7021	77.1	1	99.93	70.73	53.95
	isotig 00200F1-1449	99.15	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.DALSGLLGPTLR.G	606.93	1211.6873	130.5	1	99.93	60.4	48.09
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.72	1984.9392	100.2	1	99.9	60.9	39
					K.HFFKPPILSR.F	414.61	1240.708	80.7	1	99.87	48.33	35.27
					K.AQYLDNFSNFIGK.K	758.92	1515.7358	59.1	1	99.46	49.48	25.12
					K.ITSIITQGATSM(+15.99) TTSM(+15.99) YVK.T	1033.09	2064.012	74.3	2	97.33	34.56	-
	EXE2_HELSC	61.65	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.32	978.5499	77.3	1	99.93	59.3	49.68
	EXE2_HELSE	61.65	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
135	isotig 00199F2-1431	99.14	21	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GM(+15.99) QALFTVIDK.D	619.91	1237.6377	135.5	1	99.79	76.53	40.72

FA5V_PSETE	99.14	8	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.72	1984.9392	100.2	1	99.49	70.52	33.29
FA5_PSETE	99.14	8	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	K.NSEITASSYKK.T	614.36	1226.6143	74.3	1	98.52	29.85	21.5
isotig 00200F1-1449	99.14	8	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.HFFKPPILSR.F	414.61	1240.708	80.7	1	98.1	58.14	-
				K.ENHIDPPIIAR.Y	425.6	1273.6777	78.9	2	98.1	55.69	-
				K.ITSIITQGATSM(+15.99) TTSM(+15.99) YVK.T	1033.08	2064.012	64.6	1	97.95	39.4	-
				R.HSETQM(+15.99) HFEGNSDGTTVK.E	674.33	2019.8594	53.9	1	95.93	21.84	-
				K.VFTGNINSDDGHVK.H	463.26	1386.6892	49.8	1	92.48	17.74	-

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
136	isotig 00199F2-1431	99.12	15	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GM(+15.99) QALFTVIDK.D	619.89	1237.6377	103.2	1	99.93	81.73	58.9
	FA5V_PSETE	99.11	5	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	K.ENHIDPPIIAR.Y	425.61	1273.6777	102.4	2	99.57	50.71	34.72
	isotig 00200F1-1449	99.11	5	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.HFFKPPILSR.F	414.61	1240.708	80.7	1	98.67	42.59	21.32
	FA5_PSETE	99.11	5	Coagulation factor V OS=Pseudonaja textilis GN=F5 PE=1 SV=1	K.ITSIITQGATSM(+15.99) TTSM(+15.99) YVK.T	1033.08	2064.012	64.6	2	98.03	41.11	-
					K.DIHVVNFHGQTFTEEGR.E	662.73	1984.9392	115.3	1	96.29	31.19	-
					K.NSEITASSYKK.T	614.35	1226.6143	58	1	92.6	27.27	-
					K.NSEITASSYK.K	550.31	1098.5193	78.4	1	90.18	21.05	-

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
137	IVBI2_PSETT	60.81	17	Protease inhibitor textilinin-2 OS=Pseudonaja textilis textilis PE=1 SV=1	R.FPSFYYPNDEQK.C	767.92	1533.6775	96.5	1	99.93	57.94	60.54
					R.VRFPSFYYPNDEQK.C	597.37	1788.8472	134.7	1	98.51	32.44	25.25
	isotig 00172F1-1312	60.71	20	textilinin OS=Pseudonaja textilis	R.FPSFYYPNDEK.S	703.91	1405.6189	132.7	1	99.81	43.87	34.56
	IVBI1_PSETT	60.71	13	Protease inhibitor textilinin-1 OS=Pseudonaja textilis textilis PE=1 SV=1								

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
138	isotig 00172F1-1312	61.51	23	textilinin OS=Pseudonaja textilis	R.FPSFYYPNDEK.S	703.88	1405.6189	90	1	99.93	54.94	73.69
	IVBI1_PSETT	61.51	16	Protease inhibitor textilinin-1 OS=Pseudonaja textilis textilis PE=1 SV=1	R.VRFPSFYYPNDEK.S	554.65	1660.7886	84.1	1	99.82	39.84	37.43
	IVBI2_PSETT	61.51	17	Protease inhibitor textilinin-2 OS=Pseudonaja textilis textilis PE=1 SV=1	R.FPSFYYPNDEQK.C	512.29	1533.6775	111.2	3	99.93	45.53	62.56
					R.VRFPSFYYPNDEQK.C	597.38	1788.8472	151.5	1	99.92	46.4	57.13

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
------	-----------	-----------	----------	-----------	----------	-----	-------	-----	-------	-----------	---------	----------

139	PA2B2_NAJMO	61.65	9	Basic phospholipase A2 CM-II OS=Naja mossambica PE=1 SV=1	R.YIDANYNINLK.E	670.91	1339.6772	95.7	1	99.92	66.62	57
	EXE2_HELSC	61.36	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum cinctum PE=2 SV=1	K.YLASILGSR.T	490.34	978.5499	118.1	1	99.61	38.56	29.95
	EXE2_HELSE	61.36	11	Exendin-2-long OS=Heloderma suspectum PE=1 SV=3								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
141	isotig 00263F3-1896	61.56	8	PLA2 OS=Pseudonaja textilis	K.GSGTPVDELDR.C	601.82	1201.5574	56.7	2	99.91	59.82	56.72
	isotig 00264F3-1903	61.56	8	PLA2 OS=Pseudonaja textilis								
	PA2SC_AUSSU	61.56	26	Phospholipase A2 superbin c (Fragment) OS=Austrelaps superbus PE=1 SV=1								
	PA2AE_NOTSC	61.56	10	Acidic phospholipase A2 HTe OS=Notechis scutatus scutatus PE=1 SV=1								
	PA226_MICAT	61.56	9	Phospholipase A2 OS=Micrurus altirostris PE=2 SV=1								
	PA2B_BUNCE	61.56	8	Basic phospholipase A2 KPA2 OS=Bungarus caeruleus PE=1 SV=1								
	PA2PA_OXYMI	61.56	8	Basic phospholipase A2 paradoxin- like alpha chain OS=Oxyuranus microlepidotus PE=1 SV=1								
	Q45Z41_OXYMI	61.56	8	PLA-5 OS=Oxyuranus microlepidotus PE=2 SV=1								
	Q4VRI3_OXYSC	61.56	8	OS7 OS=Oxyuranus scutellatus scutellatus PE=2 SV=1								
	PA2A2_PSETE	61.56	8	Acidic phospholipase A2 2 OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
142	R4G2J2_9SAUR	84.33	11	LP-Pse-1 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	K.YM(+15.99)WEWTD.R.S	601.84	1201.4861	149.3	1	99.9	65.11	56.18
	R4G7K1_9SAUR	84.33	11	LP-Pse-2 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	R.SRTDFLLWR.K	597.4	1192.6353	126	1	99.84	60.19	45.61
	R4FK55_9SAUR	84.33	11	LP-Pse-5 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	K.YMWEWTD.R.S	593.81	1185.4912	96.4	1	99.83	80.79	45.15
	isotig 00145F1-1184	84.33	11	CLect OS=Pseudonaja textilis	R.TDFLLWR.K	475.79	949.502	66.8	1	99.72	41.51	42.45
	isotig 00146F1-1190	84.33	11	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00147F1-1196	84.33	11	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00148F2-1204	84.32	10	CLect OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
143	LECG1_BUNFA	83.98	11	C-type lectin BfL-1 OS=Bungarus fasciatus PE=2 SV=1	K.YIWEWTD.R.S	584.83	1167.5349	94.7	2	99.88	62.81	46.9
	LECG_PSEPO	83.98	11	C-type lectin galactose-binding isoform OS=Pseudechis porphyriacus PE=2 SV=1	R.TDFLPWR.K	467.77	933.4708	58.6	1	99.79	48.87	38.88
	LECG_PSEAU	83.98	11	C-type lectin galactose-binding isoform OS=Pseudechis australis PE=1 SV=1	K.KYIWEWTD.R.S	648.87	1295.6299	73.8	1	95.21	31.01	-
	LECG1_BUNMU	83.98	11	C-type lectin BML-1 OS=Bungarus multicinctus PE=2 SV=1	R.TDFLPWR.K	354.89	1061.5657	77.8	2	94.94	29.57	-

R4FIR9_9SAUR	83.93	10	LP-Pse-3 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	K.YIWEWTD.R.S	584.83	1167.5349	94.7	2	99.88	62.81	46.9
R4G314_9SAUR	83.93	10	LP-Pse-6 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	R.TDFLLWR.K	475.78	949.502	45.7	1	99.46	30.88	35.95
				K.KYIWEWTD.R.S	648.87	1295.6299	73.8	1	95.21	31.01	-

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
144	isotig 01328F3-6629	55.68	6	LNTx1328 OS=Pseudonaja textilis	K.TPYVK.S	304.18	606.3377	12.7	3	98.48	28.49	25.61
	NXLL_LATLA	55.74	6	Long neurotoxin L1Long (Fragment) OS=Laticauda laticaudata PE=3 SV=1								
	NXL20_DRYCN	55.68	6	Long neurotoxin 20 OS=Drysdalia coronoides PE=1 SV=1								
	NXL31_DRYCN	55.68	6	Long neurotoxin 31 OS=Drysdalia coronoides PE=1 SV=1								
	R4FI75_9SAUR	55.68	6	3FTx-Aca-53 OS=Acanthophis wellsi PE=3 SV=1								
	F8J2E3_DRYCN	55.68	6	Putative long chain neurotoxin 291 OS=Drysdalia coronoides PE=3 SV=1								
	F8J2F1_DRYCN	55.68	6	Putative long chain neurotoxin 178R OS=Drysdalia coronoides PE=3 SV=1								
	F8J2E8_DRYCN	55.68	6	Putative long chain neurotoxin 472 OS=Drysdalia coronoides PE=4 SV=1								
	R4G319_9SAUR	55.68	6	3FTx-Pse-78 OS=Pseudonaja modesta PE=3 SV=1								
	R4G2P6_9SAUR	55.68	6	3FTx-Aca-18 OS=Acanthophis wellsi PE=3 SV=1								

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
145	NXS2_PSETE	61.47	18	Short neurotoxin 2 OS=Pseudonaja textilis GN=SNTX2 PE=2 SV=1	R.YLIPATHGNAIPAR.G	498.65	1492.8149	75.8	1	99.9	51.28	56.9

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
146	NXS7_PSETE	61.51	18	Short neurotoxin 7 OS=Pseudonaja textilis GN=SNTX7 PE=2 SV=1	R.YIIPATHGNAITYR.G	530.66	1588.8362	76.7	1	99.93	50.78	71.01
	isotig 00066F2-612	61.51	15	SNTx OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00074F2-640	61.51	18	NXS7 OS=Pseudonaja textilis								
	NXS3_PSETE	61.5	18	Short neurotoxin 3 OS=Pseudonaja textilis GN=SNTX3 PE=2 SV=1	R.YLVPATHGNAIPAR.G	493.94	1478.7993	-0.8	1	99.92	49.03	69.34
	NXS2_PSETE	61.5	18	Short neurotoxin 2 OS=Pseudonaja textilis GN=SNTX2 PE=2 SV=1	R.YLIPATHGNAIPAR.G	747.46	1492.8149	60.7	2	99.92	58.44	58.95
	IVBI3_PSETT	59.15	7	Protease inhibitor textilinin-3 OS=Pseudonaja textilis textilis PE=2 SV=1	R.FYYNPR.Q	430.24	858.4024	73.4	1	98.38	36.5	28.92
	R4G317_9SAUR	59.15	7	KP-Pse-7 OS=Pseudonaja modesta PE=4 SV=1								
	R4FK61_9SAUR	59.15	7	KP-Pse-5 OS=Pseudonaja modesta PE=4 SV=1								

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
147	PA2BB_PSETE	98.41	27	Basic phospholipase A2 homolog textilotoxin B chain OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=2	R.YNSANYNIDIK.T	657.86	1313.6252	61	1	99.91	80.28	76.87
					DLVEFGFM(+15.99) IR.C	621.91	1241.6113	156.3	1	99.9	69.81	53.84

					R.GSGTFVDDVDR.C	559.29	1116.5046	54.4	1	99.85	38.47	57.15
					K.RGSGTFVDDVDR.C	425.26	1272.6057	119.8	2	99.82	59.08	39.36
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
148	PA2BB_PSETE	98.42	27	Basic phospholipase A2 homolog textilotoxin B chain OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=2	R.YNSANYNIDIK.T	657.86	1313.6252	61	1	99.92	56.1	90.11
					DLVEFGFM(+15.99) IR.C	621.91	1241.6113	156.3	1	99.91	48.37	58.93
					K.RGSGTFVDDVDR.C	637.36	1272.6057	78.3	2	99.9	41.58	66.36
					R.GSGTFVDDVDR.C	559.27	1116.5046	18.7	1	99.86	33.33	75.26
					DLVEFGFMIR.C	613.89	1225.6165	121.6	1	99.83	47.91	43.06
	PA2BA_PSETE	61.62	6	Basic phospholipase A2 textilotoxin A chain OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=3	R.GTPVDDVDR.C	487.27	972.4512	76.3	1	99.9	46.92	54.16
	isotig 00814F1-4734	61.62	6	textilotoxinA OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
149	PA2BA_PSETE	55.63	6	Basic phospholipase A2 textilotoxin A chain OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=3	R.GTPVDDVDR.C	487.25	972.4512	35.2	1	93.59	33.11	32.65
	isotig 00814F1-4734	55.63	6	textilotoxinA OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
150	PA2A2_PSETE	84.18	16	Acidic phospholipase A2 2 OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.FSGPYWNPYSYK.C	754.89	1507.677	58.7	2	99.91	56.55	52.4
	isotig 00263F3-1896	84.18	16	Acidic PLA2 OS=Pseudonaja textilis	K.GGSGTPVDELDR.C	601.87	1201.5574	139.9	1	99.88	46.28	46.5
	isotig 00264F3-1903	84.18	16	Acidic PLA2 OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
151	R4G2J2_9SAUR	83.02	9	LP-Pse-1 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	K.YM(+15.99)WEWTD.R.S	601.8	1201.4861	82.7	1	99.05	41.23	27.87
	R4G7K1_9SAUR	83.02	9	LP-Pse-2 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	R.TDFLLWR.K	475.81	949.502	108.9	1	95.4	31.66	27.44
	R4FK55_9SAUR	83.02	9	LP-Pse-5 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1								
	isotig 00145F1-1184	83.02	9	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00146F1-1190	83.02	9	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00147F1-1196	83.02	9	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00148F2-1204	83.01	9	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00263F3-1896	61.29	8	Acidic PLA2 OS=Pseudonaja textilis	K.GGSGTPVDELDR.C	601.85	1201.5574	106.6	1	99.71	43.96	38.72
	isotig 00264F3-1903	61.29	8	Acidic PLA2 OS=Pseudonaja textilis								

PA226_MICAT 61.29 9 Phospholipase A2 OS=Micrurus
altirostris PE=2 SV=1

PA2A1_AUSSU 61.29 8 Acidic phospholipase A2 S1-11
OS=Austrelaps superbus PE=2 SV=1

PA2A2_PSETE 61.29 8 Acidic phospholipase A2 2
OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1

R4FIQ4_9SAUR 61.29 8 PLA2-Pse-8 OS=Pseudonaja modesta
PE=2 SV=1

PA2B_BUNCE 61.29 8 Basic phospholipase A2 KPA2
OS=Bungarus caeruleus PE=1 SV=1

PA2PA_OXYMI 61.29 8 Basic phospholipase A2 paradoxin-
like alpha chain OS=Oxyuranus
microlepidotus PE=1 SV=1

Q4VRI4_OXYSC 61.29 8 OS6 OS=Oxyuranus scutellatus
scutellatus PE=2 SV=1

B2BRS6_AUSLA 61.29 8 Putative phospholipase A2
OS=Austrelaps labialis PE=2 SV=1

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
152	R4G2J2_9SAUR	84.12	9	LP-Pse-1 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	K.YM(+15.99)WEWTD.R.S	601.84	1201.4861	149.3	1	99.91	53.17	49.27
	R4G7K1_9SAUR	84.12	9	LP-Pse-2 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	K.YMWEWTD.R.S	593.8	1185.4912	79.5	1	99.87	64.22	40
	R4FK55_9SAUR	84.12	9	LP-Pse-5 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	R.TDFLLWR.K	475.78	949.502	45.7	1	99.67	36.57	39.5
	isotig 00145F1-1184	84.12	9	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00146F1-1190	84.12	9	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00147F1-1196	84.12	9	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00148F2-1204	84.11	9	CLect OS=Pseudonaja textilis								
	isotig 00199F1-1426	61.51	1	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.DALSGLLGPTLR.G	606.95	1211.6873	163.6	1	99.91	54.6	49.75
	FA5V_PSETE	61.51	1	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1								
	isotig 00200F1-1449	61.51	1	VF5a OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
153	FAXC_PSETE	83.44	4	Venom prothrombin activator pseutarin-C catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=2	R.AETGPLLVSVDK.V	565.38	1128.6025	126.6	1	99.89	54.22	47.86
	isotig 00189F3-1385	83.44	4	VF10a OS=Pseudonaja textilis	K.VPYVDR.H	374.71	747.3915	18.6	1	99.51	39.71	35.74
	isotig 00188F3-1369	83.44	4	VF10a OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
154	R4G2J2_9SAUR	63.66	9	LP-Pse-1 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	R.TDFLLWR.K	475.79	949.502	66.8	1	84	32.28	-
	R4G7K1_9SAUR	63.66	9	LP-Pse-2 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1	K.YM(+15.99)WEWTD.R.S	601.82	1201.4861	116	1	56.06	27.63	-
	R4FK55_9SAUR	63.66	9	LP-Pse-5 OS=Pseudonaja modesta PE=2 SV=1								

isotig
00145F1-1184 63.66 9 CLect OS=Pseudonaja textilis
isotig
00146F1-1190 63.66 9 CLect OS=Pseudonaja textilis
isotig
00147F1-1196 63.66 9 CLect OS=Pseudonaja textilis
isotig
00148F2-1204 63.63 9 CLect OS=Pseudonaja textilis

spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
155	FAXC_PSETE	98.15	7	Venom prothrombin activator pseutarin-C catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=2	K.QDFGIVSGFGGIFER.G	814.98	1627.7996	89.6	1	99.92	94.9	88.41
	isotig 00189F3-1385	98.15	7	VF10a OS=Pseudonaja textilis	R.AETGPLLSVVK.V	565.37	1128.6025	108.9	1	99.87	54.14	49.43
	isotig 00188F3-1369	98.15	7	VF10a OS=Pseudonaja textilis	K.VPYVDR.H	374.73	747.3915	72.2	1	98.35	31.09	31.14
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
156	FAXC_PSETE	83.36	4	Venom prothrombin activator pseutarin-C catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=2	R.AETGPLLSVVK.V	565.36	1128.6025	91.2	1	99.88	52.09	51.36
	isotig 00189F3-1385	83.36	4	VF10a OS=Pseudonaja textilis	K.VPYVDR.H	374.69	747.3915	-34.9	1	98.97	34.22	38.61
	isotig 00188F3-1369	83.36	4	VF10a OS=Pseudonaja textilis								
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
157	V8NS94_OPHHA	98.59	11	Dipeptidase OS=Ophiophagus hannah GN=Dpep2 PE=3 SV=1	R.TEVLELMAASR.L	610.38	1218.6277	96.6	1	99.94	75.88	82.51
	H9GFI1_ANOCA	84.35	5	Dipeptidase (Fragment) OS=Anolis carolinensis GN=LOC100567007 PE=3 SV=1	R.TEVLELM(+15.99)AASR.L	618.41	1234.6228	147.9	1	99.94	63.02	71.19
					K.LSNTNTNIEK.L	567.36	1132.5723	117.6	1	99.94	57.84	55.18
					R.M(+15.99)FYDLGVR.Y	508.81	1015.4797	123.9	1	99.92	42.69	48.11
					R.MFYDLGVR.Y	500.82	999.4848	140.7	1	99.89	38.84	38.56
					K.LSTIDLKK.L	459.33	916.5593	94	1	34.91	18.79	24.79
spot	Accession	Score (%)	Cov. (%)	Descrição	Peptideo	m/z	Massa	ppm	#Spec	Score (%)	[P]EAKS	[M]ascot
160	isotig 00199F1-1426	99.15	10	VF5a OS=Pseudonaja textilis	R.GEVGDSLIIYFK.N	670.94	1339.7021	121.9	1	99.91	77.27	92.87
	FA5V_PSETE	99.15	6	Venom prothrombin activator pseutarin-C non-catalytic subunit OS=Pseudonaja textilis PE=1 SV=1	R.DALSGLLGPTLR.G	606.93	1211.6873	130.5	2	99.9	55.46	61.49
	isotig 00200F1-1449	99.15	6	VF5a OS=Pseudonaja textilis	K.WSEGSSYSDGTS DVER.L	881.39	1760.7124	30.1	1	99.85	60.69	50.52
					K.NFATQPVSIIHPQSAVYNK.W	667.77	2000.0115	138.4	2	99.78	51.46	45.08
					K.WLISSLVAK.H	508.87	1015.6066	117	1	98.25	39.74	25.87
					K.HLQAGM(+15.99)YGYLNIK.D	508.65	1522.7605	110.1	1	97.41	34.56	22.14
					R.EYELDFK.Q	472.28	942.4334	118.9	1	60.5	24.13	26.22

Apêndice 2: Alinhamento CLUSTAL da sequência nucleotídica consenso de uma metaloproteinase da *Pseudonaja textilis* com a textilease-1 de *P. textilis* (GenBank: EF199640) e a PIII de *Bothrops jararaca* HF3 (GenBank: AF149788.5). O transcrito foi clonado de uma biblioteca de cDNA de glândula de veneno de *Pseudonaja textilis*.

						
	5	15	25	35	45	55
textilease1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PtSVMPConsens	-----	-----	-----TT	GGAAGCAGAA	AGAGATTCCT	ATCCACCAGT
BjararacaHF3	GTCAACAGAG	GAAGAGCTCA	GGTTGGCTTG	AAAGAAGGAA	GAGATTGCCT	GTCTTCCAGC
						
	65	75	85	95	105	115
textilease1	-----	-----ATG	ATCCAAGCTC	TCTTGGTAAC	TATATGCTTC	GCGGTTTTTC
PtSVMPConsens	CCAATCCAGG	CTCCAAAATG	ATCCAAGCTC	TCTTGGTAAC	TATATGCTTC	GCGGTTTTTC
BjararacaHF3	CAAATCCAGC	CTCCAAAATG	ATCCAAGTTC	TCTTGGTAAC	TATATGCTTA	GCAGCTTTTC

						
	125	135	145	155	165	175
textilease1	CATATCAAGG	GAGCTCTATA	ATCCTGGAAT	CTGGGAATGT	TAATGATTAT	GAAGTAGTGT
PtSVMpconsens	CATATCAAGG	GAGCTCTATA	ATCCTGGAAT	CCGGGAATGT	TAATGATTAT	GAAGTAGTGT
BjararacaHF3	CTTATCAAGG	GAGCTCTATA	ATCCTGGAAT	CTGGGAACGT	GAATGATTAT	GAAGTAGTGT
						
	185	195	205	215	225	235
textilease1	ATCCACAAAA	AGTGCCTGCA	TTGCCCAAAG	GAGGAGTTCA	GAATCCTCAG	CCAGAGACCA
PtSVMpconsens	ATCCACAAAA	AATGCCTGCA	TTGCCCAAAG	GAGGAGTTCTG	GAATCCTCAG	CCAGAGACCA
BjararacaHF3	ATGCACGAAA	AGTCACTGCA	TTGCCCAAAG	GAGCAGTTCA	GC-----	-----CAA
						
	245	255	265	275	285	295
textilease1	AGTATGAAGA	TACAATGCAA	TATGAATTTT	AGGTGAATGG	AGAGCCAGTG	GTCCTTCACT
PtSVMpconsens	AGTATGAAGA	TACAATGCAA	TATGAATTTT	AAGTGAATGG	AGAGCCAGTG	GTCCTTCACT
BjararacaHF3	AGTATGAAGA	CACCATGCAA	TATGAACTTA	AGGTGAATGG	AGAGCCAGTG	GTCCTTCACC

						
	305	315	325	335	345	355
textilease1	TAGAAAGAAA	TAAAGAACTT	TTTTCAGAAG	ATTACACTGA	AATTCATTAT	TCCTCTGATG
PtSVMPconsens	TAGAAAGAAA	TAAAGAACTT	TTTTCAGAAG	ATTACACTGA	AATTCATTAT	TCCTCTGATG
BjararacaHF3	TGGAAAAAAA	TAAACAACCT	TTTTCAAAAG	ATTACAGCGA	GACTCATTAT	TCCCCTGATG
						
	365	375	385	395	405	415
textilease1	ACACAGAAAT	TATAACAAGC	CCTCTGGTTC	AAGATCACTG	CTATTATCAT	GGCTACATTC
PtSVMPconsens	ACACAGAAAT	TATAACAAGC	CCTCCGGTTC	AAGATCATTG	CTATTATCAT	GGCTACATTC
BjararacaHF3	GCAGAGAAAT	TACAACATAC	CCCCCGGTTC	AGGATCACTG	CTATTATCAT	GGACGCATCG
						
	425	435	445	455	465	475
textilease1	AGAATGAAGC	TAATTCAAGT	GCAGTCATCA	GTGCATGCGA	CGGCTTGAAA	GGACATTTCA
PtSVMPconsens	AGAATGAAGC	TAATTCAAGT	GCAGTCATCA	GTGCATGCGA	CGGCTTGAAA	GGACATTTCA
BjararacaHF3	AGAATGATGC	TGACTCAACT	GCAAGCATCA	GTGCATGCAA	CGGTTTGAAA	GGACATTTCA

						
	485	495	505	515	525	535
textilease1	AGCATCAAGG	GGAGACATAC	TTTATTGAGC	CCTTGAAGCT	TTCCGACAGT	AAATTCCATG
PtSVMpconsens	AGCATCAAGG	GGAGACATAC	TTTATTGAGC	CCTTGAAGCT	TTCCGACAGT	AAATCCCATG
BjararacaHF3	AGCTTCAAGG	GGAAACGTAC	TTTATTGAAC	CCTTGAAGCT	TCCCAACAGT	GAAGCCCATG
						
	545	555	565	575	585	595
textilease1	CAATCTACAA	AGATGAAAAT	GTAGAAGAAG	AGAAAGAGAC	CCC---CAAC	TGTGGGATAA
PtSVMpconsens	CAATCTACAA	AGATGAAAAT	GTAGAAGAAG	AGGAAAAGAC	CCC---CAAC	TGTGGGATAA
BjararacaHF3	CAGTCTTCAA	ATATGAAAAT	GTAGAAAAAG	AGGATGAGGT	CCCCAAAATG	TGCGGGGTAA
						
	605	615	625	635	645	655
textilease1	CCCAGACTAC	TTCGGAGTCA	GATGAGCCCA	TCGAAAAGAT	CTCTCAATTA	ACTAATATTT
PtSVMpconsens	CCCAGACTAC	TTCGGAGTCA	GATGAGCCCA	TCGAAAAGAT	CTCTCAATTA	ACTAATATTT
BjararacaHF3	CCCAGACTAA	TTGGGAATCA	GATGAGCCCA	TCAAAAAGGC	CTCTCAGTTA	GTTGTACTG

						
	665	675	685	695	705	715
textilease1	CTGAACAAGA	AAGGTACTTG	AAGGTCAAAA	AATACATTGA	GTTGTATGTA	GTTGTGGACA
PtSVMPconsens	CTGAACAAGA	AAGGTACTTG	AAGGTCAAAA	AATACATTGA	GTTGTATGTA	GTTGTGGACA
BjararacaHF3	CTGAACAGCA	AAGATATAAC	---CACTACA	AATACATTGA	GCTTGTTATA	CTTGCAGACT
						
	725	735	745	755	765	775
textilease1	ACAAAATGTA	CAAGAATTAC	GACAGCAACA	GACATGCTAT	AAAAAGAAAA	GTATATGAAA
PtSVMPconsens	ACAAAATGTA	CAAGAATTAC	GACAGCARCA	GACATGCTAT	AAAAAGAAAA	GTATATGAAA
BjararacaHF3	ACAGAATGGT	CACGAAAAAC	AATGGCGATT	TAGGTAAAAT	AAGAACAAAA	ATATATGAAA
						
	785	795	805	815	825	835
textilease1	CAATCAACCT	TTTAAACATG	ATGTACAGAC	CTTTGAATTT	TCTCATTGCA	CTGATTGGCC
PtSVMPconsens	CAATCAACCC	TTTAAACATG	ATGTACAGAC	CTTTGAATTT	TCTCATTGCA	CTGATTGGCC
BjararacaHF3	TTGTCAACAT	TTTAAACGAG	ATTTTCAGAT	ATTTGTACAT	TCGTATAGCA	CTGGTTGGCA

						
	845	855	865	875	885	895
textilease1	TAGAAATTTG	GTCCAACCGA	GATAAGATTA	ACATTGAACC	AGAGGTGGCT	GTCAC TTTGA
PtSVM Pconsens	TAGAAATTTG	GTCCAACCGA	GATAAGATTA	ACATTGAACC	AGAGGTGGCT	GTCAC TTTGA
BjararacaHF3	TAGAAATTTG	GTCCAATGCA	GATTTGAGTA	ATGTGACATT	ATCAGCAGAT	GATACTTTGG
						
	905	915	925	935	945	955
textilease1	AATCATTTTG	AAAATGGAGA	GAAACAGTTT	TACTGCCACG	CAAAAGGAAT	GATAATGCTC
PtSVM Pconsens	AATCATTTTG	AAAATGGAGA	GAAACAGTTT	TACTGCCACG	CAAAAGGAAT	GATAATGCTC
BjararacaHF3	CCTCATTTTG	AACCTGGAGA	GGGACAGTCT	TGCTGAAGCG	CAAAAGTCAC	GATAACGCTC
						
	965	975	985	995	1005	1015
textilease1	AGTTACTTAC	GCAGATTGAG	TTCAGCGGAA	CTACTGTAGG	ACTTGCTTAT	GTGGGCAGCA
PtSVM Pconsens	AGTTACTTAC	GCAGATTGAG	TTCAGCGGAA	CTACTGTAGG	ACTTGCTTAT	GTGGGCAGCA
BjararacaHF3	AGTTACTCAC	GGCCATTGAC	TTCGATGGAC	AAACAATAGG	AATAGCTAAC	ATAGCCAGCA

						
	1025	1035	1045	1055	1065	1075
textilease1	TCTGCAGTCC	GGAGGAATCT	GTAGCAGTTA	TGGAGGTTTA	TAGCAGAAGA	ACAAATATAA
PtSVMpconsens	TCTGCAGTCC	GGAGGAATCT	GTAGCAGTTA	TGGAGGTTTA	TAGCAGAAKA	WCAAATATAA
BjararacaHF3	TGTGCAACCA	GAACAAATCT	GTAGGAGTTG	TCATGGATTA	TAGCCCAATA	AATCTTGTGG
						
	1085	1095	1105	1115	1125	1135
textilease1	TGGCATCTGG	AATGGCCCAT	GAGTTGGGTC	ATAATCTGGG	CATTACTCAT	GACCACGCTT
PtSVMpconsens	TGGCATCTGG	AATGGCCCAT	GAGTTGGGTC	ATAATCTGGG	CATTACTCAT	GACCACGCTT
BjararacaHF3	TTGCAGTTAT	TATGGCCCAT	GAGATGGGTC	ATAATCTGGG	CATCAATCAT	GACACAGGTT
						
	1145	1155	1165	1175	1185	1195
textilease1	CCTGTAATTG	CAATGCTGAA	CTATGTATTA	TGTCTGCGAT	AATAAGTTTT	GAACCTCTCT
PtSVMpconsens	CCTGTAATTG	CAATGCTGAA	CTATGCATTA	TGTCTGCGAT	AATAAGTTTT	GAACCTCTCT
BjararacaHF3	CCTGTTCTTG	TGGTGGTTAC	TCATGTATTA	TGGCTCCTGA	GATAAGCGAT	CAACCTTCCA

						
	1205	1215	1225	1235	1245	1255
textilease1	CTGAGTTCAG	CTCTTG TAGT	ATCCAGGAAC	ATCAGAGGTA	TCTTCTTAGA	GAGAGACCAC
PtSVMpconsens	CTGAGTTCAG	CTCTTG TAGT	ATCCAGGAAC	ATCAGAGGTG	TCTTCTTAGA	GAGAGACCAC
BjararacaHF3	AACTATTTCAG	CAATTG TAGT	AAGCAGGCAT	ATCAGAGGTA	TATTAATTAT	TATAAACCCAC
						
	1265	1275	1285	1295	1305	1315
textilease1	AATGCATTCT	CAACAGACCC	TTGAGCACAG	ATATTGTTAC	ACCTCCAGTT	TGTGGAAATT
PtSVMpconsens	AATGCATTCT	CAACAGACCC	TTGAGCACAG	ATATTGTTAC	AMCTCCAGTT	TGTGGAAATT
BjararacaHF3	AATGCATTCT	CAATGAACCC	TTGAGAACAG	ATATTGTTTC	ACCTCCAGTT	TGTGGAAATG
						
	1325	1335	1345	1355	1365	1375
textilease1	ACTTAGTGGA	GGTGGGAGAA	GAATGTGACT	GTGGCTTTCC	TATGGATTGT	CAAAGTGCCT
PtSVMpconsens	ACTTAGTGGA	GGTGGGAGAA	GAATGTGACT	GTGGCTTTCC	TATGGATTGT	CAAAGTGCCT
BjararacaHF3	AACTTTTGGA	GATGGGAGAA	GAATGTGACT	GTGGCTCTCC	TAGAAATTGT	CGAGATCCGT

						
	1385	1395	1405	1415	1425	1435
textilease1	GCTGCAACGC	TACAACTTGT	AAACTGCAAC	ATGAGGCACA	GTGTGACTCT	GAAGAGTGTT
PtSVMPconsens	GCTGCAACGC	TACAACTTGT	AAACTGCAAC	ATGAGGCACA	GTGTGACTCT	GAAGAGTGTT
BjararacaHF3	GCTGTGATGC	TGCAACCTGT	AAACTACACT	CTTGGGTAGA	GTGTGAATCT	GGAGAGTGTT
						
	1445	1455	1465	1475	1485	1495
textilease1	GTGAGAAATG	CAAACCTTAAG	AAAGCAGGAG	CAGAATGCCG	GGCAGCAAAG	GATGACTGTG
PtSVMPconsens	GTGAGAAATG	CAAACCTTAAG	AAAGCAGGAG	CAGAATGCCG	GGCAGCAAAG	GATGACTGTG
BjararacaHF3	GTGACCAGTG	CAGATTTAAG	GGAGCAGGAA	CAGAATGCCG	GGCAGCAAGG	AGTGAGTGTG
						
	1505	1515	1525	1535	1545	1555
textilease1	ACTTGCCTGA	AATCTGCACT	GGCCAATCTG	CTGAGTGTCC	CATGGACAGC	TTCCAGAGGA
PtSVMPconsens	ACTTGCCTGA	AATCTGCACT	GGCCAATCTG	CTGAGTGTCC	CATGGACAGC	TTCCAGAGGA
BjararacaHF3	ACATTGCTGA	AAGCTGCACT	GGCCAATCTG	CTGACTGTCC	CACAGATGAC	TTCAAAAGGA

						
	1565	1575	1585	1595	1605	1615
textilease1	ATGGACATCC	ATGCCAAAAC	AACCAAGGTT	ACTGCTACAA	TGGGAAATGC	CCCATCATGA
PtSVMPConsens	ATGGACATCC	ATGCCAAAAC	AACCAAGGTT	ACTGCTACAA	TGGGAAATGC	CCCATCATGA
BjararacaHF3	ATGGACAACC	ATGCCTACAT	AACTACGGTT	ACTGCTACAA	TGGGAATTGC	CCCATCATGT
						
	1625	1635	1645	1655	1665	1675
textilease1	CAAACCAATG	TATCGATCTC	TGGGGGCCAG	GTGTAAATGT	GTCTCCAGAT	ATATGTTTTA
PtSVMPConsens	CAAACCAATG	TATCGATCTC	TGGGGGCCAG	GTGTAAATGT	GTCTCCAGAT	ATATGTTTTA
BjararacaHF3	ATCACCAATG	TTATGCTCTC	TTTGGTTCAA	ATGCAACTGT	GGCTGAAGAT	GGATGTTTTG
						
	1685	1695	1705	1715	1725	1735
textilease1	CGTTGAACCA	GTATAGCCAA	GGTTGTGGCT	TCTGCAGAAT	GGAAAATGGT	ACAAAGATTC
PtSVMPConsens	CGTTGAACCA	GTATAGCCAA	GGTTGTGGCT	TCTGCAGAAT	GGAAAATGAT	ACAAAGATTC
BjararacaHF3	AGTTTAATGA	AAACGGGGAT	AAATATTTCT	ACTGCAGAAA	GCAAAGTGGT	GTAAATATTC

						
	1745	1755	1765	1775	1785	1795
textilease1	CGTGTGCAGC	AAAGGATAAA	ATGTGTGGCA	AGTTAATATG	CGAAAAGGGA	AACTCGACAT
PtSVMPconsens	CGTGTGCAGC	AAAGGATAAA	ATGTGTGGCA	AGTTAATATG	CGAAAAGGGA	AACTCGACAT
BjararacaHF3	CGTGTGCACA	AGAGGATGTA	AAGTGTGGCA	GGTTATTCTG	TCATACTAAG	AAGCATCCAT
						
	1805	1815	1825	1835	1845	1855
textilease1	GCACCTGCTT	TCCTACAACA	GATGACCCAG	ATTATGGAAT	GGTTGAACCT	GGAACAAAAT
PtSVMPconsens	GCACCTGCTT	TCCTACAACA	GATGACCCAG	ATGATGGAAT	GGTTGAACCT	GGAACAAAAT
BjararacaHF3	GTGAT---TA	CAAATATTCA	GAAGACCCAG	ATTATGGAAT	GGTTGATAAT	GGAACAAAAT
						
	1865	1875	1885	1895	1905	1915
textilease1	GTGGAGATGG	AATGGTGTGC	AGCAACAGGC	AGTGTGTTGA	TGTGAAGACA	GCCTACTGA-
PtSVMPconsens	GTGGAGATGG	AATGGTGTGC	AGCAACAGGC	AGTGTGTTGA	TGTGCAGACA	GCCTACTGAT
BjararacaHF3	GTGCAGATGG	AAAGGTGTGC	AGCAACGGGC	ATTGTGTTGA	TGTGGCTACA	GCCTACTAGT

						
	1925	1935	1945	1955	1965	1975
textilease1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PtSVMpconsens	CAAGCACTGG	CTTCTCTCAA	TTTGATTTTG	AAGATCCTCA	TCCAGAAAGC	TTCCCTCAAG
BjararacaHF3	CAACCTCTGG	CTTTGATTTT	GGAGATCCTC	---CTTCCAG	AAGGTTTGGC	TTCTCTCAAG
						
	1985	1995	2005	2015	2025	2035
textilease1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PtSVMpconsens	TCCAAAGAGA	CCCATCTGTC	TTTATCCTAC	AATCACTAGT	GAATTC----	-----
BjararacaHF3	TCCAAAGAGA	TCCATCTGCC	TGCATCTTAC	TAGTAAATCA	CTCTTAGCTT	CCAGATGGCA
						
	2045	2055	2065	2075	2085	2095
textilease1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PtSVMpconsens	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BjararacaHF3	TCTAAATTCT	GCAATATTTT	TTCACCATAT	TTAATCTGTT	TACCTTTTGC	TGTAATCAAA

						
	2105	2115	2125	2135	2145	2155
textilease1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PtSVMPConsens	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BjararacaHF3	CCTTTTCCCC	ACCACAAAGC	TCCATGGGCA	TGTACAACAC	CAAAGGCTTA	TTTGCTGTCA
						
	2165	2175	2185	2195	2205	2215
textilease1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PtSVMPConsens	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BjararacaHF3	AGAAAAAAAA	TGGCCATTTT	ATACCGTTTG	CCAATTGCAG	AGCACATTTA	ATACAAGAAG
						
	2225	2235	2245	2255	2265	2275
textilease1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PtSVMPConsens	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BjararacaHF3	TTCTGCCTTT	TTGAGCTGGT	GTGTTCGAAG	TCAATGCTTC	CTCTCCCCAA	ATTTTGTGCT

					
	2285	2295	2305	2315	2325
textilease1	-----	-----	-----	-----	-----
PtSVMPconsens	-----	-----	-----	-----	-----
BjararacaHF3	GGCTTTCCAA	GATGTAGCTG	CTTCCATCAA	TAAACTATTT	TCATTCTGCC