CRISTIANE CASTILHO FERNANDES DA SILVA

**Busca por polipeptídeos bioativos derivados da
degradação do cininogênio, fibrinogênio e
fibronectina pela bothropasina e *Bothrops* protease A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2016

CRISTIANE CASTILHO FERNANDES DA SILVA

**Busca por polipeptídeos bioativos derivados da
degradação do cininogênio, fibrinogênio e
fibronectina pela bothropasina e *Bothrops* protease A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Fernanda Calheta Vieira Portaro

Versão original

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Castilho Fernandes da Silva, Cristiane
Busca por polipeptídeos bioativos derivados da
degradação do cininogênio, fibrinogênio e
fibronectina pela bothropasina e Bothrops protease
A / Cristiane Castilho Fernandes da Silva;
orientador Fernanda Calheta Vieira Portaro. -- São
Paulo, 2016.
91 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Peptídeos bioativos. 2. Fibrinogênio. 3.
Fibronectina. 4. Cininogênio. 5. Protease do
veneno. I. Calheta Vieira Portaro, Fernanda,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Cristiane Castilho Fernandes da Silva

Título da Dissertação: Busca por polipeptídeos bioativos derivados da
degradação do cininogênio, fibrinogênio e fibronectina pela bothropasina
e *Bothrops* protease A

Orientador(a): Dr^a Fernanda Calheta Vieira Portaro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)

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

São Paulo, 7 de maio de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Caracterização de polipeptídeos moduladores de angiogênese derivados da degradação de Cininogênio e Fibrinogênio pela Bothropasina", protocolo nº. **I-1232/14**, sob a responsabilidade de Marcella Faria de Almeida Prado e Cristiane Castilho Fernandes da Silva, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal "Characterization of polypeptide modulators of angiogenesis derived from the degradation of Kininogen and Fibrinogen by Bothropasin", protocol nº **I-1232/14**, under the responsibility of Marcella Faria de Almeida Prado and Cristiane Castilho Fernandes da Silva, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee, and that it does not involve breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Aos meus pais e irmão,
por todo apoio durante a vida.
À Fernanda, pela orientação.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível pela colaboração e ensinamento de diversas pessoas, às quais dirijo os meus mais sinceros agradecimentos.

À Dra Fernanda Portaro, sou imensamente grata por sua orientação, incentivo e confiança nos momentos mais necessários, e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, em especial a esse time de ótimos pesquisadores e amigos, Daniela Cajado Carvalho, Roberto Kodama, Alexandre Kuniyoshi e Bruno Duzzi. Agradeço por todo auxílio, pelas discussões científicas, pelo compartilhamento de séries, pelas excelentes viagens e saídas gastronômicas.

O primeiro ano deste trabalho foi realizado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), lugar onde também aprendi muito. Não poderia deixar de agradecer aos estudantes e funcionários, que fizeram ou fazem parte do LETA, por todo o auxílio e convivência durante esse período. À Marcella Faria, Myriam Palomino, Milene Menezes, Ana Karina, Ivan Novaski, Daiane Rocha, Ricardo Llanos, Leo Iwai, Maria Carolina Sabagga, Lídia, Eduardo Kitano, Solange Serrano, Ismael Feitosa e tantos outros.

À Dra Ana Moura, Dr. Geraldo Magalhães e Dra. Anita Mitiko pelas discussões, sugestões e contribuições significativas ao projeto, e de grande valia para minha formação.

Aos meus amores humanos. À minha mãe, Maria, ao meu pai, João e ao meu irmão João. Às minhas avós, Ana e Maria (*in memoriam*). Agradeço por absolutamente tudo! E aos felinos, Charlinho, Ju e Lina por trazerem mais alegria.

Aos amigos de longa data e os que encontrei neste período, Lê, Audrey, Marion, João, Manu, Daniel, Tabata, Tamires, Claudia, Andrea, Fabian, Ana Maria, Kamilla, Juliana, Simone e Mauricio, pela convivência, trilhas, pelas discussões acerca da vida, da pós-graduação, da vida na pós..., pelo compartilhamento de teto, comidas, bebidas, filmes e risadas.

Aos professores que com seu trabalho inspiram.

À Dra Johanna Joyce por ter concedido o Carl Storm International Diversity Award, que possibilitou a apresentação deste trabalho na Gordon Conference.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo N ° 2014/02788-7) pelo apoio financeiro.

RESUMO

SILVA, C.C.F. **Busca por polipeptídeos bioativos derivados da degradação do cininogênio, fibrinogênio e fibronectina pela bothropasina e *Bothrops* protease A.** 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da ação da metaloprotease bothropasina e da serino protease, *Bothrops* protease A (BPA) purificadas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* sobre proteínas plasmáticas humanas (fibrinogênio, fibronectina e cininogênio de alta massa molecular), como ferramenta para geração de novos peptídeos bioativos. Focamos nossas buscas por peptídeos em comum provenientes de degradação proteica, gerados tanto pela bothropasina quanto pela BPA. Estes peptídeos foram estudados *in silico* para a predição de suas possíveis atividades antiangiogênicas e também foram analisados como moduladores da atividade de proteases humanas envolvidas na angiogênese, como a trombina e a elastase. Os produtos das digestões foram analisados por espectrometria de massas e identificados utilizando o programa Peaks Studio 7.0. A hidrólise do fibrinogênio gerou 83 sequências no total, e a da fibronectina, 100. Foram encontradas sequências em comum liberadas simultaneamente por ambas as proteases, sendo oito peptídeos provenientes do fibrinogênio e 11, da fibronectina. Estes peptídeos possuem preferencialmente o resíduo de aminoácido Arg na posição P1. Embora o cininogênio seja um substrato conhecido de serino proteases, apenas a bothropasina foi capaz de clivá-lo. A bothropasina exibiu maior atividade hidrolítica na condição testada sobre os substratos utilizados em comparação à BPA, sendo responsável pela liberação de mais de 80 % das sequências de oligopeptídeos obtidos. Dentre os peptídeos em comum provenientes do fibrinogênio, foram encontradas sequências similares aos fibrinopeptídeos A e B, produtos do processamento endógeno, liberados pela trombina durante a coagulação sanguínea. Outro peptídeo derivado da cadeia α do fibrinogênio, liberado pela bothropasina e BPA, SQLQKVPPEWK, foi descrito como vasoativo por aumentar a permeabilidade microvascular. Selecionamos para síntese química dez peptídeos em comum liberados pelas duas proteases do veneno, sendo seis do fibrinogênio (FBG1-FBG6) e quatro da fibronectina (FN1-FN4), além do des-Arg⁹-BK, que foi produto de hidrólise do cininogênio pela bothropasina. Oito dos onze peptídeos apresentam potencial antiangiogênico predito pela plataforma AntiAngioPred. Observamos a predominante inibição da elastase (28-20%) causada pelos peptídeos derivados do fibrinogênio, enquanto foi observada a maior ativação da elastase, de 19%, por FN1. Em relação à trombina, a melhor inibição encontrada foi de 17%, causada por FBG1. Entretanto, a maioria dos peptídeos sintéticos intensificou a atividade da trombina, sendo o peptídeo FBG4 o mais potente, com 46%. Des-Arg⁹-BK mostrou ser um fraco ativador da elastase (7%) e da trombina (15%). Por fim, este trabalho sugere que as metalo e serino proteases de veneno de serpentes podem ser usadas como ferramentas bioquímicas para processar componentes macromoleculares de plasma e/ ou matriz extracelular, visando à busca por novos peptídeos bioativos.

Palavras-chave: Peptídeos bioativos. Fibrinogênio. Fibronectina. Cininogênio. Protease do veneno.

ABSTRACT

SILVA, C.C.F. **Search for bioactive derived degradation polypeptides of kininogen, fibrinogen and fibronectin by bothropasin and *Bothrops* protease A.** 2016. 90 p. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

This work aimed to the study the action of the metalloprotease bothropasin and serine protease, *Bothrops* protease A (BPA) purified from the venom of snake *Bothrops jararaca* upon human plasma proteins (fibrinogen, fibronectin and high molecular weight kininogen) as a tool to generate new bioactive peptides. We focus our search for common peptides from protein degradation, generated both by bothropasin as the BPA. These peptides were studied for *in silico* prediction of their possible anti-angiogenic activities and also analyzed as modulators of the activity of human proteases involved in angiogenesis, such as thrombin and elastase. The products of digestion were analyzed by mass spectrometry and identified using Peaks Studio 7.0 software. Hydrolysis of the fibrinogen generated 83 sequences in total, and the fibronectin, 100. Sequences in common released simultaneously by both proteases were found, eight peptides from fibrinogen, and 11 from fibronectin. These peptides preferably have the Arg amino acid residue in the P1 position. Although the kininogen is a known substrate of serine proteases, only bothropasin was able to cleave it. Bothropasin exhibited higher hydrolytic activity in the condition tested on substrates compared to BPA, and is responsible for the release of more than 80% of oligopeptide sequences obtained. Among the peptides in common derived from fibrinogen, similar sequences were found to fibrinopeptides A and B, endogenous peptides products released by thrombin during blood clotting. Another peptide derived from fibrinogen α chain, released by bothropasin and BPA, SQLQKVPPEWK, was described as vasoactive to increase microvascular permeability. We selected ten peptides in common released by two venom proteases for chemical synthesis, six from fibrinogen (FBG1-FBG6) and four from fibronectin (FN1, FN4), as well as the des-Arg⁹-BK, which was kininogen hydrolysis product by bothropasin. Eight of the eleven peptides have potential antiangiogenic predicted by AntiAngioPred platform. Functional analysis of its properties were evaluated, demonstrating the predominant inhibition of elastase (28-20%) caused by fibrinogen-derived peptides, while increased activation of elastase of 19% by FN1 peptide derived from fibronectin, was observed. Regarding the thrombin activity, the better inhibition found was 17% caused by FBG1. However, most of synthetic peptides showed to be able to intensify the thrombin activity, while the FBG4, was the highest activator found (46%). des-Arg⁹-BK showed to be a weak elastase (7%) and thrombin (15%) activator. Finally, this work suggests that the snake venom metallo and serine proteases can be used as biochemical tools to process macromolecular components of plasma and / or extracellular matrix, in order to search for new bioactive peptides.

Keywords: Peptides Bioactive. Fibrinogen. Fibronectin. Kininogen. Venom Protease.

ABREVIATURA DOS AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
E	Glu	Glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise da composição proteica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> .	19
Figura 2 - Estrutura cristalográfica da bothropasina.	20
Figura 3 - Modelo da estrutura tridimensional da <i>Bothrops</i> protease A.	21
Figura 4 - Estrutura esquemática do fibrinogênio humano.	23
Figura 5 - Estrutura esquemática da fibronectina.	24
Figura 6 - Estrutura esquemática do cininogênio de alta massa molecular.	25
Figura 7 - Ilustração da estratégia utilizada para obtenção e identificação dos peptídeos derivados do fibrinogênio, fibronectina e cininogênio.	33
Figura 8 - Atividade hidrolítica das proteases sobre substratos de fluorescência apagada.	38
Figura 9 - Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10%. Atividade fibrinogenolítica das enzimas bothropasina e <i>Bothrops</i> protease A.	39
Figura 10 - Sequência de aminoácidos das cadeias α , β e γ do fibrinogênio humano.	40
Figura 11 - Diagramas de Venn representando o número de peptídeos derivados das cadeias α e β do fibrinogênio liberados pelas proteases utilizadas.	42
Figura 12 - Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 7,5%. Atividade das enzimas bothropasina e <i>Bothrops</i> protease A sobre a fibronectina.	44
Figura 13 - Sequência da fibronectina do plasma humano.	44
Figura 14 - Diagrama de Venn representando o número de sequências derivadas da fibronectina identificadas em cada digestão.	47
Figura 15 - Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10%. Atividade das enzimas bothropasina e BPA sobre o cininogênio de alta massa molecular.	48
Figura 16 - Perfil cromatográfico em coluna C18 dos produtos de digestão do cininogênio pela bothropasina, BPA e condição controle, sem protease.	49
Figura 17 - Sequência do cininogênio de alta massa molecular de plasma humano.	50

Figura 18 - Sítios de clivagem preferenciais das proteases bothropasina e BPA frente aos substratos fibrinogênio, fibronectina e cininogênio.

52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista das proteínas e número de acesso no UniProt.	36
Tabela 2 - As oito sequências em comum encontradas como produto da hidrólise do fibrinogênio pela bothropasina e BPA, e não exibidas na condição controle.	43
Tabela 3 - Sequências em comum encontradas na hidrólise da fibronectina.	47
Tabela 4 - Sequências obtidas na hidrólise do cininogênio pela bothropasina.	50
Tabela 5 - Propriedades preditas das sequências selecionadas para síntese química.	53
Tabela 6 - Porcentagem de inibição ou ativação da elastase e trombina após incubação com os peptídeos derivados do fibrinogênio, fibronectina e cininogênio.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-10lgP	Valor de score do peptídeo utilizado no programa PEAKS. O score é derivado do valor de p, indica a significância estatística do espectro associado ao peptídeo.
°C	graus Célsius
Abz	Radical fluorescente ácido orto-aminobenzóico
ACN	Acetonitrila
BK	Bradicinina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPA	<i>Bothrops</i> protease A
C-terminal	Carboxi-terminal
Da	Dalton
EDDnp	Grupo apagador de fluorescência N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System - Bioinformatics Resource Portal</i>
FBG	Fibrinogênio
FDR	Taxa de falso positivo, do inglês <i>False Discovery Rate</i>
FGF2 ou bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto - tipo 2 ou básico
FN	Fibronectina
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência, do inglês <i>Free Resonance Energy Transfer</i>
<i>g</i>	gravidade
h	hora
HK	Cininogênio de alta massa molecular
HKa	Cininogênio após clivagem pela caliceína, com a liberação da bradicinina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HUVEC	Célula endotelial do cordão umbilical humano, do inglês <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
kDa	quilodalton
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i>

M	Molar
MMP	Metaloprotease de matriz
m/z	razão massa sobre carga
N-terminal	Amino-terminal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i>
ppm	Taxa de tolerância de erro do peptídeo precursor
RT	Tempo de retenção, do inglês <i>Retention Time</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SVMP	Metaloprotease de veneno de serpente, do inglês <i>Snake Venom Metalloprotease</i>
SVSP	Serino protease de veneno de serpente, do inglês <i>Snake Venom Serine Protease</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
TGF- β 1	Fator transformante do crescimento beta 1, do inglês <i>Transforming growth factor beta 1</i>
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
UF	Unidade de fluorescência
V	Volts
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
μ	micro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Proteases presentes no veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	18
1.1.1 <i>Bothropasina e Bothrops protease A</i>	19
1.2 Proteínas plasmáticas humanas	22
1.3 Angiogênese	25
1.4 Inibidores de proteases envolvidas em processos angiogênicos	27
1.5 Justificativa	29
2 OBJETIVO GERAL	30
2.1 Objetivos específicos	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Substratos, enzimas e peptídeos	31
3.2 Análise da atividade hidrolítica das proteases	32
3.3 Digestões	32
3.4 Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida	34
3.5 Dessalinização das amostras	34
3.6 Cromatografia por HPLC	35
3.7 Análise dos peptídeos por espectrometria de massas	35
3.8 Identificação e parâmetros de análise dos peptídeos	36
3.9 Análise <i>in silico</i> dos peptídeos	36
3.10 Testes enzimáticos	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Atividade hidrolítica da bothropasina e BPA	38
4.2 Hidrólise do fibrinogênio pela bothropasina e BPA	39
4.3 Hidrólise da fibronectina pela bothropasina e BPA	44
4.4 Hidrólise do cininogênio pela bothropasina e BPA	48
4.5 Análise dos pontos de clivagem preferenciais	51
4.7 Testes de modulação das atividades da elastase e trombina pelos peptídeos sintéticos	54
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66

APÊNDICE A - Fragmentos peptídicos derivados do fibrinogênio sequenciados por espectrometria de massas.	74
APÊNDICE B - Fragmentos peptídicos derivados da fibronectina sequenciados por espectrometria de massas.	82
APÊNDICE C - Fragmentos peptídicos derivados do cininogênio sequenciados por espectrometria de massas.	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteases presentes no veneno de *Bothrops jararaca*

A glândula de veneno de serpentes e a glândula salivar de mamíferos são estruturas evolutivamente recentes, derivadas de outra glândula exócrina mais antiga, o pâncreas, como sugere a homologia encontrada na sequência de aminoácidos de enzimas pancreáticas, como a fosfolipase A₂ e outras enzimas proteolíticas compartilhadas por estas glândulas (KOCHVA, 1987). É proposto que as toxinas do veneno evoluíram por um processo de duplicação gênica de proteínas de outros tecidos, sendo a cópia expressa em glândulas de veneno (FRY, 2005). O veneno tem função na defesa, captura, imobilização e digestão da presa, sendo composto, principalmente, por uma rica fonte de proteínas que apresentam ou não ação enzimática e peptídeos. Cada qual apresenta ação seletiva contra moléculas alvos diferentes, capazes de afetar o sistema nervoso, sistema cardiovascular, rins e músculos (EBLE, 2010).

Dentre as serpentes responsáveis pelos acidentes ofídicos no Brasil, o gênero *Bothrops* corresponde a maioria dos envenenamentos. *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) é uma das espécies mais bem estudadas do gênero e endêmica das regiões sudeste e sul do Brasil, nordeste do Paraguai e norte da Argentina, onde ocorre em florestas tropicais decíduas e em remanescentes florestais (GONÇALVEZ-MACHADO et al., 2015; SAZIMA, 1992). O envenenamento por *B. jararaca* inclui severos distúrbios homeostáticos, com a ocorrência de hemorragia local e sistêmica, edema e necrose.

As análises proteômica do veneno (FOX; SERRANO, 2008) e transcriptômica da glândula do veneno de *Bothrops jararaca* (CIDADE et al., 2006) revelaram sua complexa composição. Dentre as proteínas mais abundantes, estão as metaloproteases compreendendo mais de 50% do conteúdo proteico, seguida da presença de lectinas tipo-C e serino proteases. Adicionalmente, são encontradas proteínas ricas em cisteínas, peptídeos potenciadores de bradicinina, fosfolipases A₂, fatores de crescimento do endotélio vascular e L-aminoácidos oxidases (Figura 1). Vale ressaltar a ocorrência da variabilidade ontogenética e sexual do veneno relatada para *B. jararaca* (MENEZES et al., 2006; ZELANIS et al., 2010). Algumas das metalo e serino proteases já caracterizadas são capazes de afetar a homeostase, com ação em substratos importantes na coagulação, fibrinólise e no sistema calicreína-cinina (PAES LEME et al., 2008).

Entre as metaloproteases já isoladas do veneno de *B. jararaca*, encontram-se a bothropasina, jararhagina, fator hemorrágico 3 (HF3), bothrostatina, botrolisina, jararafibrase II, III e IV, bothrojaractivase, BJ-PI e BJ-PI2 (SERRANO et al., 2014). E as serino proteases isoladas do veneno de *B. jararaca* descritas são *Bothrops* protease A, bothrombina, PA-BJ, KN-BJ-1 e 2, TL-BJ 1, 2 e 3 (SERRANO et al., 2014).

Figura 1- Análise da composição proteica do veneno de *Bothrops jararaca* por abordagens proteômica (A) e transcriptômica (B). LAO, L-aminoácido oxidase; svVEGF, fator de crescimento do endotélio vascular de veneno de serpente; PLA2, fosfolipase A2; BPP, peptídeo potenciador de bradicinina. Fonte: Adaptado de Fox e Serrano (2008); Cidade et al. (2006).

1.1.1 Bothropasina e Bothrops protease A

Duas enzimas proteolíticas, uma metalo e uma serino protease presentes no veneno de *Bothrops jararaca*, foram utilizadas como ferramenta para geração de novos peptídeos bioativos a partir da hidrólise do fibrinogênio, fibronectina e cininogênio de alta massa molecular. Desta maneira, ambas as proteases serão melhores descritas a seguir.

A metaloprotease **bothropasina** (EC 3.4.24.49) é uma glicoproteína ácida (pI 4.8), possui 48 kDa e apresenta atividade fibrinogenolítica, caseinolítica e hemorrágica (MANDELBAUM et al., 1982; OLIVEIRA et al., 2009; RAWLINGS; SALVESEN, 2013). Além destas, foi reportada a atividade hidrolítica *in vitro* sobre as proteínas plasmáticas e/ou componentes da matriz extracelular, como plasminogênio, fibronectina, vitronectina e colágenos I e IV (HO et al., 2002;

OLIVEIRA et al., 2010). É classificada como uma metaloprotease dependente de zinco da classe PIII, composta pelos domínios catalítico, tipo disintegrina e rico em cisteína (FOX ; SERRANO, 2005). A estrutura cristalográfica da bothropasina realizada por Muniz et al., (2008) determinou o sítio para ligação do átomo de zinco no domínio catalítico e três sítios para ligação de cálcio, um no domínio catalítico e dois no domínio tipo disintegrina (Figura 2). A bothropasina tem a estrutura terciária estabilizada por íons Ca^{2+} , sendo essencial para sua atividade proteolítica (MANDELBAUM et al., 1982). A bothropasina e a jararhagina (EC 3.4.24.73), outra metaloprotease presente no veneno de *B. jararaca*, compartilham aproximadamente 95% de identidade, com apenas 19 resíduos de aminoácidos de diferença, sugerindo que ambas compartilhem as mesmas propriedades e atividades biológicas (MOURA-DA-SILVA; BALDO, 2012; MUNIZ et al., 2008). A bothropasina pode sofrer autoproteólise, com a clivagem do domínio catalítico em diferentes regiões, enquanto mantém os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína intactos, conhecido como proteína DC, de 28 kDa (ASSAKURA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010).

Figura 2 - Estrutura cristalográfica da bothropasina. Domínio catalítico representado em azul claro, domínio tipo-disintegrina em amarelo e domínio rico em cisteína em roxo. O átomo de zinco representado como a esfera vermelha e os átomos de cálcio, as esferas azuis. Fonte: Adaptado de Muniz et al. (2008).

***Bothrops* protease A (BPA)** é uma serino protease que foi isolada do veneno de *B. jararaca* pela primeira vez em 1958 por Henriques e colaboradores. É uma serino protease clássica, com sua tríade catalítica formada pelos resíduos His, Asp e Ser (Figura 3). Entre suas propriedades está a estabilidade estrutural em temperaturas altas, resistindo a 86°C por 10 minutos, e pH entre 3 e 9. Estruturalmente, 62% (40 kDa) de sua massa molecular correspondem à presença de carboidratos, e 25,4 kDa, aos 234 resíduos de aminoácidos, sendo visualizada em SDS-PAGE como uma banda de 67 kDa (HENRIQUES et al., 1958; PAES LEME et al., 2008). A incomum taxa de glicosilação encontrada nesta serino protease é responsável por sua estabilidade estrutural frente a altas temperaturas (PAES LEME et al., 2008). Possui atividade fibrinogenolítica e tem a capacidade de hidrolisar fibronectina e vitronectina *in vitro* quando em concentrações maiores que a requerida para degradar o fibrinogênio (PAES LEME et al., 2008).

Figura 3 - Modelo da estrutura tridimensional da *Bothrops* protease A (BPA). Os resíduos His, Asp e Ser que compõem a tríade catalítica estão representados em verde, os resíduos de Asn dos sítios putativos de *N*-glicosilação estão mostrados como esferas vermelhas. Fonte: Yamashiro (2014).

1.2 Proteínas plasmáticas humanas

Foram utilizadas como substratos para as proteases do veneno, as proteínas plasmáticas, fibrinogênio, cininogênio e fibronectina, candidatas a gerarem novos peptídeos bioativos.

O **fibrinogênio** (FBG) é uma glicoproteína composta por três pares de cadeias polipeptídicas denominadas cadeias α , β e γ , com massas moleculares de 66,5, 52 e 46,5 kDa, respectivamente (Figura 4). Na coagulação sanguínea, um conjunto de reações enzimáticas ocorre com a finalidade de limitar a perda de sangue em vasos sanguíneos danificados. Durante a cascata de coagulação, reações proteolíticas culminam na formação de trombina ativa, capaz de clivar o fibrinogênio em fibrina. Quando clivado pela trombina (EC. 3.4.21.5), há a formação do monômero de fibrina, com a liberação dos fibrinopeptídeos A e B, presentes na região N-terminal das cadeias α e β , respectivamente. O fragmento FngE do domínio central, de 50 kDa formado pelas regiões N-terminais das cadeias α , β e γ , ligadas por pontes dissulfeto, atua como um fator antiangiogênico, inibindo a migração induzida por VEGF e a formação de túbulos *in vitro* (STATON et al., 2004). Enquanto, o fragmento E da fibrina (FnE) atua como um fator pró-angiogênico, estimulando a migração e a formação tubular em células endoteliais *in vitro* (BOOTLE-WILBRAHAM et al., 2001).

Além de participar da coagulação e no reparo de tecidos, o fibrinogênio desempenha outras funções importantes. Entre elas, é um ligante da agregação plaquetária, participa de interações entre células e a matriz extracelular, processos inflamatórios e em neoplasias (KAMIGUTI et al., 1994; MOSESSON et al., 2001). Durante a agregação plaquetária, a porção C-terminal da cadeia γ do fibrinogênio se liga às integrinas $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ativadas em plaquetas, formando uma ponte entre plaquetas adjacentes (WEISEL, 2005). Em células endoteliais, $\alpha\text{v}\beta_3$ se liga à sequência RGD presente na região C-terminal da cadeia α , resultando em mudanças estruturais, reorganização do citoesqueleto e espalhamento celular (WEISEL, 2005).

Figura 4 - Estrutura esquemática do fibrinogênio humano. Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich (2008).

A **fibronectina** (FN) é uma glicoproteína presente no plasma sanguíneo, na matriz extracelular, na superfície celular e na membrana basal, composta por duas subunidades similares e unidas por ligações dissulfeto, com massas moleculares de 250 e 280 kDa. Estruturalmente é formada por três tipos de módulos, incluindo 12 módulos tipo I, 2 módulos tipo II e 15 módulos tipo III (PANKOV; YAMADA, 2002). Esses módulos representam domínios estruturais que possuem sítios de ligação para outras macromoléculas como fibrina, heparina e colágeno (Figura 5) (MOYANO et al., 1997).

A proteína fibronectina participa de interações mediando funções na adesão, migração, crescimento e diferenciação celular (MOSESSON; AMRANI, 1980). Sua forma plasmática circula no sangue em concentrações de aproximadamente 0,3 mg/mL, com a capacidade de se ligar à fibrina, formando uma matriz provisória durante a coagulação (LIVANT et al., 2000; PANKOV; YAMADA, 2002). Livant et al., (2000) ainda sugerem que a fibronectina plasmática e outras proteínas de matriz extracelular podem ser uma fonte de peptídeos com potenciais efeitos na adesão, motilidade e quimiotaxia.

Figura 5 - Estrutura esquemática da fibronectina. Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich (2008).

O **cininogênio de alta massa molecular** (HK) é uma glicoproteína abundante no plasma e componente do sistema caliceína-cinina. Possui 120 kDa, consistindo de seis domínios, D1 - D6, e divididos em 3 porções: a cadeia pesada, a bradicinina (BK) e a cadeia leve (Figura 6) (GUO et al., 2002). No início da via intrínseca da coagulação sanguínea, o cininogênio é clivado pela caliceína plasmática, liberando a bradicinina e exibindo duas cadeias polipeptídicas que permanecem interligadas por ponte dissulfeto, a cadeia pesada composta pelos domínios D1- D3 e a cadeia leve, por D5 e D6. O domínio 1 possui uma alta afinidade com sítios de ligação de cálcio (ISHIGURO et al., 1987). Os domínios 2 e 3 contêm uma sequência de aminoácido altamente conservada, QVVAG, presente em inibidores de cisteíno-peptidase.

Uma vez clivado pela caliceína, o cininogênio (denominado HKa) exibe atividade antiadesiva e anti-inflamatória (COLMAN, 1996). O cininogênio é também conhecido como precursor de cininas. As cininas fazem parte de um grupo de peptídeos que incluem o nonapeptídeo bradicinina (BK), o decapeptídeo Lys-BK, também chamado de calidina e a Met-Lys-BK. A Lys-BK e Met-Lys-BK podem ser convertidas em bradicinina pela ação de

aminopeptidases. A BK localizada no domínio 4, atua como um peptídeo vasoativo e pró-inflamatório, aumenta a produção de óxido nítrico e prostaglandinas, causa aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, contração do músculo liso e febre (CAGLIANI et al., 2013). Os domínios do cininogênio apresentam efeitos opostos no contexto da angiogênese, conhecidos pela BK ser um estimulador desse processo, e HKa e D5 serem inibidores, por causarem apoptose em células endoteliais proliferativas (GUO et al., 2002). A *kininostatín* (Arg439-Lys478), presente no domínio 5, tem sido reportada como a região responsável pela atividade antiangiogênica promovida por HKa (GUO et al., 2002). A região rica em His-Gly presente no domínio 5 está envolvida no “efeito Vroman”, relacionado à sua adsorção a superfícies carregadas negativamente, sendo também responsável por iniciar a via intrínseca da coagulação e fibrinólise (DELA CADENA; COLMAN, 1992; VROMAN et al., 1980).

Figura 6 - Estrutura esquemática do cininogênio de alta massa molecular. Fonte: Adaptado de Colman e Schmaier (1997); Guo et al. (2002).

1.3 Angiogênese

O sistema vascular evoluiu como o sistema de transporte fisiológico responsável pelo tráfego de oxigênio, nutrientes, resíduos metabólicos, moléculas sinalizadoras (hormônios, fatores de crescimento) e células do sistema imune entre tecidos e órgãos. A angiogênese, ou

neovascularização, é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular já estabelecida. A angiogênese por brotamento envolve a degradação da matriz extracelular por proteases presentes nas células endoteliais, permitindo a migração, proliferação, diferenciação e apoptose (ROSCA et al., 2011). Sendo este processo governado por um fino balanço entre fatores endógenos pró- e antiangiogênicos. Entre as células envolvidas, encontram-se células endoteliais, pericitos vasculares e células do músculo liso vascular (ROSCA et al., 2011). Sob condições fisiológicas e não patológicas, as células endoteliais permanecem quiescentes e são conhecidas como “*phalanx*” ou células falanges, devido ao equilíbrio entre fatores anti e pró-angiogênicos, com o balanço positivo dos primeiros, em um estado no qual o “interruptor angiogênico” estaria “desligado” (MUNDEL; KALLURI, 2007; STAPOR et al., 2014). Quando há o desbalanço com prevalência dos fatores pró-angiogênicos, este “interruptor” é “ligado” e as células endoteliais rapidamente alteram seu fenótipo, sendo caracterizadas pelas células migratórias de ponta (*tip cells*) ou células proliferativas, conhecidas como células de suporte ou *stalk cells* (ADAMS; ALITALO, 2007; STAPOR et al., 2014).

A angiogênese por brotamento é requerida de maneira transitória em eventos fisiológicos, como por exemplo, no ciclo menstrual feminino e no reparo de tecidos. Porém, o crescimento desregulado de vasos sanguíneos pode contribuir com a patogênese de doenças, e estas podem ser caracterizadas ou causadas pela angiogênese excessiva, como as historicamente melhor conhecidas, câncer, psoríase, inflamações crônicas, artrite reumática e retinopatia, além de outras, como obesidade, asma, aterosclerose e doenças infecciosas. De maneira contrária, quando ocorre o crescimento insuficiente ou a regressão dos vasos, podem ocorrer patologias como isquemias, neurodegeneração e pré-eclampsia, por exemplo (CARMELIET, 2003).

Judah Folkman observou que tumores seriam incapazes de crescer além de 1 mm³ sem neovascularização, e propôs pela primeira vez, em 1971, a terapia antiangiogênica. Desde então, fatores anti e pró-angiogênicos têm sido caracterizados.

Entre os fatores estimuladores da angiogênese conhecidos estão VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), FGF2 ou bFGF (fator de crescimento de fibroblasto - tipo 2 ou básico), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF-β1 (fator transformante do crescimento) e condições de hipóxia que ativam o fator 1 induzível por hipóxia (NYBERG; XIE; KALLURI, 2005).

Entre os inibidores angiogênicos endógenos encontram-se fragmentos de componentes da matriz extracelular, proteínas plasmáticas envolvidas na cascata de coagulação, citocinas, fatores de crescimento e seus receptores, resultantes da hidrólise por enzimas tais como, metaloproteases de matriz (MMPs), catepsinas e elastases (RIBATTI, 2009; ROSCA et al., 2011). Interessantemente, a propriedade antiangiogênica encontrada nestes fragmentos é ausente na proteína de origem. Esses fragmentos incluem a angiostatina, um inibidor de proliferação de células endoteliais proveniente da clivagem do plasminogênio por serino protease (GATELY et al., 1996; O'REILLY et al., 1997), o arresten e a tunstatina, ambos derivados do colágeno tipo IV, sendo o segundo liberado por MMP-9, e a endostatina, derivada do colágeno tipo XVIII, liberada por elastase, catepsina L e MMP-7 (BIX; IOZZO, 2005).

Assim, podemos observar que existem informações importantes na literatura sobre a participação de proteases humanas no processo de geração de fragmentos peptídicos envolvidos na angiogênese. Neste cenário, buscamos novos peptídeos ativos ainda não caracterizados que possam ser moduladores de proteases humanas. Ainda, focamos nossos estudos em duas serino proteases humanas de importância médica: a elastase e a trombina, que serão descritas a seguir.

1.4 Inibidores de proteases envolvidas em processos angiogênicos

A atividade proteolítica desregulada é associada a várias patologias severas, como em doenças inflamatórias pulmonares ligadas à elastase e o distúrbio na coagulação provocado pela trombina, tornando o estudo da atividade de proteases e a busca por seus inibidores, alvo de interesse. Proteases extracelulares podem participar de vários processos celulares, modulando o comportamento celular, como a proliferação, migração, invasão, apoptose e morfogênese (GARCIA-TOUCHARD et al., 2005). Entre as proteases de importância médica, destacamos duas, que foram estudadas com os peptídeos sintéticos obtidos neste trabalho como possíveis moduladores destas. Para a escolha das proteases estudadas, consideramos seus conhecidos envolvimento em processos celulares, como a angiogênese.

A **elastase** (EC 3.4.21.37) é uma serino peptidase da família da quimotripsina expressa em monócitos, mastócitos e neutrófilos. Possui aproximadamente 25 kDa e é armazenada em grânulos azurófilos em neutrófilos. A elastase de neutrófilos apresenta ampla especificidade de substratos, sendo umas das poucas proteases capazes de degradar a proteína da matriz

extracelular elastina. Além desta, é conhecida a ação da elastase sobre colágeno e fibronectina, sobre a parede celular de bactérias Gram-negativas, participação da ativação de outras proteases, está relacionada com a liberação de fatores de crescimento, com a inativação de inibidores de proteases endógenas e inibição de fatores de virulência exógenos (VON NUSSBAUM; LI, 2015).

A atividade excessiva da elastase pode estar associada a patologias, como observado na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), a qual se caracteriza por atividade inflamatória intensa devido à degradação de componentes da matriz extracelular, resultando em uma obstrução do fluxo aéreo (JANOFF, 1985; LAGENTE et al., 2005). Outras patologias, como a fibrose cística e a psoríase, também podem estar associadas com a elastase (JANOFF, 1985).

Em 2007, Ai et al. demonstraram que a elastase de neutrófilos é capaz de degradar dois importantes fatores de crescimento, FGF2 e VEGF, resultando na perda de suas atividades angiogênicas. A utilização de inibidor da elastase reverteu esse processo antiangiogênico.

A **trombina** (EC 3.4.21.5) é uma serino peptidase também da família da quimotripsina. É formada a partir de um precursor inativo, a protrombina, clivada pelo complexo protrombinase. A trombina é formada por duas cadeias, A e B, de 36 e 259 resíduos de aminoácidos, respectivamente, ligadas por ponte dissulfeto. A trombina desempenha papel fundamental na cascata da coagulação, ativando os fatores de coagulação V, VIII, XI, XIII e a proteína C anticoagulante (KRENZLIN et al., 2016). E como mencionado anteriormente, a trombina cliva o fibrinogênio, formando monômeros de fibrina e liberando os fibrinopeptídeos A e B.

Além disso, a trombina é o mais potente estimulador de agregação plaquetária (COUGHLIN et al., 1992). Considerada central na trombogênese, acredita-se que a inibição de sua atividade interrompe a formação do trombo e diminui a lesão vascular (HARKER et al., 1995). Atualmente, são utilizados o ácido acetilsalicílico ou a heparina como inibidores da trombina. A heparina é um inibidor indireto da trombina e apresenta desvantagens, por inibir apenas a trombina próxima ao coágulo e não aquela ligada ao trombo (BLAYA et al., 1998).

Em relação à angiogênese, a trombina parece ser um fator estimulador desse processo, por causar o aumento da expressão de receptores de VEGF em células endoteliais (TSOPANOGLU; MARAGOUidakis 2004).

1.5 Justificativa

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pelo maior percentual dos acidentes ofídicos no Brasil, sendo de grande importância em saúde pública. O envenenamento por *Bothrops jararaca* é caracterizado principalmente por distúrbios vasculares, ocasionando hemorragia e edema. Sendo explicado principalmente por ações das proteases presentes no veneno sobre células endoteliais e componentes de seu microambiente circundante. As metalo e serino proteases são as enzimas mais abundantes no veneno de *B. jararaca*, possuindo na literatura vários estudos relacionados às suas ações sobre substratos proteicos humanos. Contudo, existem poucas informações sobre a ação destes peptídeos liberados e, também, sobre as sequências primárias dos mesmos.

Ho et al., (2002) sugerem que durante o envenenamento, as metaloproteases do veneno possam agir como proteases endógenas (ADAMs e MMPs), produzindo peptídeos bioativos, como os peptídeos tipo angiostatinas, derivados da clivagem do plasminogênio. E a utilização das proteases do veneno como uma alternativa de baixo custo para produção destes fatores.

A neovascularização é uma etapa essencial envolvida em processos fisiológicos normais e em patologias, portanto, a busca e o estudo sobre a ação de moduladores da angiogênese apresenta relevância. Tendo em vista as propriedades anti ou pró-angiogênica de fragmentos provenientes de diversas proteínas, as enzimas responsáveis pela liberação destes fragmentos adquirem destaque. Também é sabido que fragmentos podem ser moduladores de proteases humanas que, desta maneira, podem apresentar efeitos na angiogênese.

Assim, a utilização das proteases do veneno como uma alternativa de baixo custo para a produção de peptídeos com ação moduladora de proteases humanas pode ser importante tanto para a geração de novos fatores anti ou pró-angiogênicos quanto para o melhor entendimento do processo de envenenamento pelas serpentes do gênero *Bothrops*.

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho pretendeu explorar a ação da bothropasina e da *Bothrops* protease A provenientes do veneno de *Bothrops jararaca* sobre as proteínas plasmáticas, fibrinogênio, cininogênio e fibronectina. Visando o melhor entendimento dos produtos gerados por estas duas proteases, e possivelmente também encontrados como subprodutos do envenenamento, aliado a busca por novos peptídeos bioativos, com ação inibidora ou ativadora de proteases envolvidas em processos fisiológicos, como a angiogênese.

2.1 Objetivos específicos

- Realizar a digestão e identificar as sequências resultantes da digestão dos substratos proteicos, fibrinogênio, fibronectina e cininogênio de alta massa molecular, pelas proteases bothropasina e *Bothrops* protease A, purificadas do veneno de *Bothrops jararaca*.
- Identificar produtos em comum gerados pelas duas proteases.
- Comparar os produtos da proteólise do fibrinogênio, fibronectina e cininogênio com as moléculas já descritas na literatura.
- Sintetizar as sequências em comum de interesse.
- Avaliar o potencial pró- ou antiangiogênico dos peptídeos sintéticos *in silico*.
- Testar os polipeptídeos sintéticos como moduladores das enzimas elastase e trombina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Substratos, enzimas e peptídeos

Os substratos proteicos utilizados foram o fibrinogênio de plasma humano (Sigma-Aldrich F3879, Saint Louis, EUA), fibronectina de plasma humano (Sigma-Aldrich F2006) e o cininogênio de alta massa molecular de plasma humano (Sigma-Aldrich K1632). A metaloprotease bothropasina e a serino protease *Bothrops* protease A (BPA), purificadas a partir do veneno de *Bothrops jararaca* de acordo com o procedimento descrito em Oliveira et al., (2009) e Mandelbaum e Henriques (1964), respectivamente, foram gentilmente cedidas pela Dra. Solange M. T. Serrano do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan.

Os peptídeos selecionados para síntese foram escolhidos por aparecerem como produto de hidrólise pela bothropasina e BPA, simultaneamente, e não estarem presentes na condição controle de digestão. Também foram considerados o valor de confiabilidade da sequência pelo *score* -10lgP e o número de espectros obtidos de cada sequência por LC-MS/MS. A síntese química ocorreu em fase sólida usando estratégia Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonila), com grau de pureza acima de 95%, avaliados por HPLC e estruturas analisadas por espectrometria de massas, e foram adquiridos da empresa GenicBio Limited (Shanghai, China).

As proteases comerciais utilizadas foram elastase (Sigma-Aldrich E7885) e trombina (Roche 10602400001, Mannheim, Alemanha). Os substratos FRETs utilizados no presente trabalho foram cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da UNIFESP/EPM.

As quantificações proteicas foram determinadas pelo método descrito por Bradford (1976). Para a construção de curvas de referência de concentração proteica, foi empregada a soroalbumina bovina (BSA) como proteína padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda 595 nm (FlexStation 3Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, EUA).

3.2 Análise da atividade hidrolítica das proteases

Antes de iniciarmos as etapas de digestões proteicas pelas proteases do veneno, avaliamos a atividade das partidas purificadas de bothropasina e BPA sobre substratos sintéticos.

A atividade hidrolítica da bothropasina e BPA foi avaliada pela clivagem dos substratos peptídicos fluorescentes FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*). A reação com volume final de 100 μ L continha o tampão (Tris HCl 80 mM, pH 7,4 e CaCl_2 1 mM), 0,05 – 0,1 μ g de protease, e 5 μ M do substrato FRET. A reação ocorreu a 37 °C e sob agitação constante sendo monitorada em fluorímetro Victor 3™ (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) nos comprimentos de onda de emissão, λ_{EM} 420 nm, e excitação, de λ_{EX} 320 nm, durante 15 minutos. A atividade específica foi expressa como unidade de fluorescência livre de substrato clivado por minuto por μ g de protease (UF/min/ μ g). Foram utilizados os substratos, Abz- FRSSR-EDDnp para avaliação da atividade da bothropasina, e Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp para avaliação da atividade da BPA. Como controle negativo, os dois substratos foram incubados apenas em tampão. Os resultados foram analisados utilizando o programa GraFit.

3.3 Digestões

As digestões enzimáticas do fibrinogênio e da fibronectina foram realizadas em volume final de 250 μ L, contendo 20 μ g de substrato, 400 ng de enzima (proporção substrato:enzima 50:1) em tampão Tris HCl 80 mM, pH 7,4 e CaCl_2 1 mM. Na amostra controle, água MilliQ autoclavada foi adicionada ao invés da enzima. As amostras contendo fibrinogênio ou fibronectina foram incubadas a 37 °C por 3 horas. Após o tempo de incubação, foi adicionado oito volumes de acetona gelada e os tubos foram mantidos a -20 °C *overnight* para precipitação das proteínas. Na sequência, os produtos das digestões foram submetidos a centrifugação a 14000 g a 4 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes contendo a fração peptídica foram coletados, secos por *SpeedVac* e ressuspensos em ácido acético 1% e acetonitrila 5%. A seguir, foi realizada a remoção de sais por ZipTip C18 (item 3.5) e analisado por espectrometria de massas (item 3.7). Os *pellets* também foram secos e ressuspensos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 2% SDS e 2% β -mercaptoetanol). As amostras

foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos, para desnaturação, e aplicadas ao gel SDS-poliacrilamida (item 3.4). O esquema da etapa experimental utilizada está ilustrado na Figura 7.

Uma vez que enfrentamos dificuldades técnicas ao utilizar o cininogênio, optamos por analisar a digestão do mesmo pelas proteases do veneno por HPLC, como será descrito adiante (item 3.6).

Figura 7. Ilustração da estratégia experimental utilizada para obtenção e identificação dos peptídeos derivados do fibrinogênio e fibronectina (A) e cininogênio (B).

3.4 Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida

A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada como descrito por Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida é composto por duas fases, a parte superior é o gel de empacotamento ou empilhamento da amostra e a parte inferior, o gel de separação de proteínas. Os géis de separação preparados foram compostos de 7,5% ou 10% de acrilamida/bisacrilamida, além de Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,1% de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etileno-diamino) e 0,06% de persulfato de amônio. O gel de empilhamento, adicionado após a polimerização do gel de separação, continha 4% de acrilamida, 0,1% de bisacrilamida, tampão Tris-HCl 0,1M, pH 6,8, 0,1% de SDS, 0,1% de TEMED e 0,06% de persulfato de amônio.

Como tampão de corrida foi utilizado Tris-HCl 25 mM, glicina 0,19 M e SDS 0,1%. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Foi utilizado o sistema de eletroforese Mini Protean® Tetra Cell (BioRad, Hercules, EUA). As bandas proteicas foram visualizadas por coloração por nitrato de prata.

3.5 Dessalinização das amostras

Para análise dos produtos de digestão por espectrometria de massas, as porções peptídicas (sobrenadantes) das digestões depois de secas e ressuspensas em 10 µL de ácido acético 1% e acetonitrila 5% (solução A), foram submetidas à remoção de sais em minicoluna cromatográfica Zip Tip® C18 (Millipore, Billerica, EUA). A mistura de peptídeos foi aplicada à coluna previamente condicionada com 20 µL de acetonitrila 100%, seguido de 20 µL de ácido acético 1% e acetonitrila 80% (solução B) e por 30 µL de solução A. A solução contendo a mistura de peptídeos foi aplicada à coluna e a amostra foi dessalinizada lavando a resina com 20 µL de solução A. Em seguida, os peptídeos foram eluídos em 20 µL de solução B. Os eluatos foram concentrados em *SpeedVac*, ressuspensos em ácido fórmico 0,1% e analisados por cromatografia líquida no Sistema Easy-nLC II acoplado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

3.6 Cromatografia por HPLC

Os produtos de hidrólise do cininogênio foram separados por HPLC (Prominence, Shimadzu, Nakagyo-ku, Japão), utilizando coluna C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm Restek, Bellefonte, EUA), os picos foram coletados manualmente e submetidos à análise por espectrometria de massas. As condições do HPLC usadas foram, solvente A 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético) em água, e como solvente B, acetonitrila mais solvente A (proporção 9:1). A separação dos produtos de hidrólise ocorreu sob fluxo de 1,0 mL/min, com gradiente inicial de 10-60% de solvente B por 20 minutos e absorção UV a 214 nm.

3.7 Análise dos peptídeos por espectrometria de massas

As análises foram realizadas em colaboração com o Dr. Leo K. Iwai e o doutorando Eduardo Kitano do Laboratório de Espectrometria de Massas e Proteômica do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA - Instituto Butantan). As amostras de peptídeos foram automaticamente carregadas em pré-coluna C18 (5 cm de comprimento, 100 μ m I.D. x 360 μ m O.D.; Jupiter, Phenomenex, Torrance, EUA) acoplada a uma coluna analítica C18 (10 cm de comprimento, 75 μ m I.D. x 360 μ m O.D.; Aqua, Phenomenex) pelo sistema de nanoHPLC Easy-nLC II (Thermo Scientific). Os peptídeos foram eluídos em gradiente linear de 5% a 40% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) por 25 minutos, sob fluxo de 200 nL/min. Os eluatos foram submetidos ao método de ionização por electrospray (voltagem aplicada: 2,0 kV) e analisados no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Para aquisição de dados MS, o espectrômetro foi operado em modo positivo e os espectros adquiridos no intervalo de 200 – 2000 m/z, resolução de 60.000 em 400 m/z, operando no modo DDA (*Data Dependent Acquisition*) nos quais os cinco íons mais intensos por scan foram selecionados para o evento de fragmentação a partir da dissociação induzida por colisão (CID). O sinal mínimo para disparar o evento de fragmentação foi ajustado para 5.000 cps e tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 15 segundos.

3.8 Identificação e parâmetros de análise dos peptídeos

Os dados brutos foram analisados utilizando o programa Peaks Studio sendo ajustados os seguintes parâmetros; nenhuma enzima específica foi considerada, oxidação da metionina como modificação variável, tolerância de erro do peptídeo precursor de ± 10 ppm, taxa de tolerância de erro do fragmento de $\pm 0,5$ Da, taxa de falso positivo (FDR) 0,1% , score $-10\lg P \geq 35$ para os peptídeos derivados do fibrinogênio e fibronectina, e score $-10\lg P \geq 25$ para peptídeos derivados do cininogênio. Como dados de referência, foram utilizadas as sequências completas depositadas de fibrinogênio, fibronectina e cininogênio disponíveis no banco de dados *on line* UniProt (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista das proteínas e número de acesso no UniProt.

Acesso UniProtKB	Proteína
P02671 (FIBA_HUMAN)	cadeia α do fibrinogênio de plasma humano
P02675 (FIBB_HUMAN)	cadeia β do fibrinogênio
P02679 (FIBG_HUMAN)	cadeia γ do fibrinogênio
P02751 (FINC_HUMAN)	fibronectina humana
P0142 (KNG1_HUMAN)	cininogênio de alta massa molecular

3.9 Análise *in silico* dos peptídeos

As propriedades físico-químicas das sequências selecionadas para síntese foram preditas utilizando a plataforma ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) que fornece peso molecular, ponto isoeletrico, índice de estabilidade e hidropaticidade. O potencial da atividade angiogênica dos peptídeos foi avaliado pelo AntiAngioPred (RAMAPRASAD et al., 2015), uma ferramenta de predição de peptídeos coma atividade antiangiogênica baseada em sequências já caracterizadas.

Os pontos de clivagem preferenciais foram analisados utilizando os logos de sequências gerados pelo programa IceLogo. Logos de sequências fornecem uma representação gráfica do alinhamento de sequências múltiplas. A altura total da pilha de aminoácidos indica o grau de

conservação daquela posição, e o tamanho de cada símbolo de aminoácido, indica a sua frequência relativa.

As sequências peptídicas simultaneamente liberadas pela bothropasina e BPA a partir dos substratos utilizados foram confrontadas com o banco de dados do NCBI- *National Center for Biotechnology Information* utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) à procura de similaridade com peptídeos já estudados, assim como foi realizada a busca na literatura disponível.

3.10 Testes enzimáticos

Para os ensaios de modulação das atividades enzimáticas da elastase e trombina foram utilizados os substratos FRETs Abz-FRSSR-EDDnp e Abz-GGFLRRV-EDDnp, respectivamente. O teste foi realizado com 300 ng de cada protease, com 5 μ M de seu respectivo substrato e incubado com 10 μ M dos peptídeos sintéticos em tampão Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0.

Os ensaios fluorimétricos ocorreram conforme descrição no item 3.2. Como controle negativo, os substratos FRET foram incubados apenas em tampão. Como controle positivo, as proteases foram incubadas com seus respectivos substratos FRET. Os resultados da incubação com os peptídeos sintéticos foram normalizados com os dados do controle positivo. Os resultados obtidos em duplicatas foram analisados utilizando o programa GraFit.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade hidrolítica da bothropasina e BPA

As atividades específicas das enzimas utilizadas foram avaliadas por meio da clivagem dos substratos FRETs. A bothropasina exibiu atividade específica de 1156,10 UF/min/ μ g, enquanto a BPA apresentou atividade específica de 78422,90 UF/min/ μ g frente aos substratos utilizados (Figura 8). Também foi comprovada a inércia do tampão Tris HCl 80 mM, pH 7,4 e CaCl_2 1 mM frente aos substratos sintéticos.

Figura 8 - Atividade hidrolítica das proteases sobre os substratos de fluorescência apagada. (A) Atividade da bothropasina sobre Abz-FRSSR-EDDnp, (B) Atividade da BPA sobre Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp.

Nossos resultados indicam que ambas as proteases estavam ativas e, para os substratos utilizados, ocorre uma maior atividade específica da BPA para a hidrólise do Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp quando comparada com a hidrólise do Abz-FRSSR-EDDnp pela bothropasina.

4.2 Hidrólise do fibrinogênio pela bothropasina e BPA

O fibrinogênio foi diferencialmente clivado pelas metalo e serino proteases utilizadas (Figura 9). Pela análise do perfil eletroforético da digestão, a bothropasina clivou preferencialmente a cadeia α do fibrinogênio, que foi totalmente degradada. Também foi observado que a cadeia β foi substrato para a bothropasina. O perfil eletroforético está de acordo com os resultados obtidos por espectrometria de massas, onde a bothropasina foi capaz de liberar peptídeos provenientes das cadeias α e β (Figura 10).

Também foi verificada a ação da *Bothrops* protease A (BPA) na hidrólise das cadeias α e β do fibrinogênio, através da análise do perfil eletroforético do produto da digestão e pela análise por espectrometria de massas.

A cadeia γ do fibrinogênio de plasma humano não foi clivada pelas proteases na condição testada.

Figura 9 - Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10%. Atividade fibrinogenolítica das enzimas bothropasina (Bothro) e *Bothrops* protease A (BPA), incubadas por 3 h a 37 °C.

Por espectrometria de massas foi possível identificar a sequência de aminoácidos dos fibrinopeptídeos gerados. A sequência completa do fibrinogênio de plasma humano foi obtida no banco de dados *online* UniProt.

>sp|P02671|FIBA_HUMAN **Fibrinogen alpha chain** OS=Homo sapiens GN=FGA
PE=1 SV=2

1 MFSMRIVCLV LSVVGTAWTA **DSGEGDFLAE GGGVRGPRVV** ERHQSACKDS

*****

51 DWPFCSDWD NYKCPSGCRM KGLIDEVNQD FTNRINKLKN SLFEYQKNNK
101 DSHSLTTNIM EILRGDFSSA NNRDNTYNRV SEDLRSRIEV LKRKVIKQVQ
151 HIQLLQKNVR AQLVDMKRLE VDIDIKIRSC RGSCSRALAR EVDLKDIEDQ
201 QKQLEQVIK DLLPSRDRQH LPLIKMKPVP **DLVPGNFKSQ LQKVPEWKA**

** ***** *

251 LTDM PQMRME LERPGGNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS SAGSWNSGSS
*****

301 GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKP GSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQNPG

351 SPRPGSTGTW NPGSSERGSA GHWTSESSVS GSTGQWHSES GSFRPDSPGS

401 GNARPNPDW GTFEEVSGNV SPGTRREYHT EKLVTSGDK ELRTGKEKVT

451 SGSTTTTRS CSKTVTKTVI GPDGHKEVTK EVVTSEDGSD CPEAMD LGTL

501 SGIGTLDGFR HRHPDEAAFF DTASTGKTFP GFFSPMLGEF VSETESRGSE
*****

551 SGIFTNTKES SSHHPGIAEF PSRGKSSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS

601 YKMADEAGSE ADHEGTHSTK RGHA KSRPVR DCDDVLQTHP SGTQSGIFNI

651 KLP GSSKIFS VYCDQETSLG GWLLIQQRMD GSLNFNRTWQ DYKRFGGSLN

701 DEGEGEFWLG NDYLHLLTQR GSVLRVELED WAGNEAYA EY HFRVGSEAEG

751 YALQVSSYEG TAGDALIEGS VEEGA EYTSN NNMQFSTFDR DADQWEENCA

801 EVYGGGWYN NCQAANLNGI YYPGGSYDPR NNSPYEIENG VVWVSFRGAD

851 YSLRAVRMKI RPLVTQ

>sp|P02675|FIBB_HUMAN **Fibrinogen beta chain** OS=Homo sapiens
GN=FGB PE=1 SV=2

1 MKRMVSWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS **QGVNDNEEGF FSARGHRPLD**

*****

51 **KKREEAPSLR PAPPISGGG YRARPAKAAA TQKKVERKAP** DAGGCLHADP

** ***** *

101 DLGVLCPTGC QLQEALLQQE RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQYMYL

151 LKDLWQKRQK QVKDNENVVN EYSSELEKHQ LYIDETVNSN IPTNLRVLRS

201 ILENLRSKIQ KLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS GKE CEEIIRKGGE

```

251 TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENGGWT VIQNRQDGSV DFGRKWDPYK
301 QGFGNVATNT DGKNYCGLPG EYWLGN DKIS QLTRMGPTL LIEMEDWKGD
351 KVKAHYGGFT VQNEANKYQI SVNKYRGTAG NALMDGASQL MGENRTMTIH
401 NGMFFSTYDR DNDGWLTS DP RKQCSKEDGGG WWYNRCHAA NPNGRYYWGG
451 QYTWDMAKHG TDDGVVWMNW KGSWYSMRKM SMKIRPFFPQ Q

>sp|P02679|FIBG_HUMAN Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG
PE=1 SV=3
1 MSWSLHPRNL ILYFYALLFL SSTCVAYVAT RDNCCILDER FGSYCPTTCG
51 IADFLSTYQT KVDKDLQSLE DILHQVENKT SEVKQLIKAI QLTYNPDESS
101 KPNMIDAATL KSRKMLEEIM KYEASILTHD SSIRYLQEIY NSNNQKIVNL
151 KEKVAQLEAQ CQEPCKDTVQ IHDITGKDCQ DIANKGAKQS GLYFIKPLKA
201 NQQFLVYCEI DGSGNGWTVF QKRLDGSVDF KKNWIQYKEG FGHLSPTGTT
251 EFWLGNEKIH LISTQSAIPY ALRVELEDWN GRTSTADYAM FKVGPEADKY
301 RLTYAYFAGG DAGDAFDGFD FGDDPSDKFF TSHNGMQFST WDNDNDKFEG
351 NCAEQDGS GW WMNKCHAGHL NGVYYQGGTY SKASTPNGYD NGIIWATWKT
401 RWYSMKKTTM KIIPFNRLTI GEGQQHHLGG AKQVRPEHPA ETEYDSLYPE
451 DDL

```

Figura 10 - Sequência de aminoácidos das cadeias α , β e γ do fibrinogênio humano. Sublinhado em preto estão as sequências encontradas na digestão controle, as regiões sublinhadas em vermelho evidenciam sequências obtidas por hidrólise pela bothropasina e em azul, pela BPA. Fibrinopeptídeo A e B estão destacados em cinza. Outras sequências já descritas estão apresentadas em negrito. Os asteriscos indicam sequências consenso entre as digestões.

Do número total de sequências obtidas pelas digestões (83), 69 são provenientes da cadeia α e 14, da cadeia β do fibrinogênio (Figura 11). A hidrólise da cadeia α do fibrinogênio pela bothropasina apresenta 52 sequências únicas, duas sequências exibidas em todas as digestões (bothropasina, BPA e controle) e quatro sequências idênticas, liberadas tanto pela bothropasina, quanto pela BPA. A digestão da mesma cadeia pela serino protease BPA, apresenta oito sequências únicas e uma compartilhada com a condição controle de digestão. Adicionalmente, a condição controle exibe duas sequências únicas.

Quanto à cadeia β do fibrinogênio, a condição controle de digestão não resultou em sequências identificadas por espectrometria de massas. A bothropasina liberou oito sequências únicas, enquanto a BPA liberou duas sequências únicas e as duas proteases exibiram quatro sequências em comuns, como produtos da hidrólise da cadeia β do fibrinogênio.

Sequências provenientes da cadeia γ do fibrinogênio não foram identificadas pela análise por espectrometria de massas utilizando o programa Peaks Studio 7.0.

Figura 11 - Diagramas de Venn representando o número de peptídeos derivados das cadeias α e β do fibrinogênio liberados pelas proteases utilizadas.

As oito sequências liberadas pelas duas proteases simultaneamente e não presentes na condição controle das cadeias α e β do fibrinogênio humano são apresentadas na Tabela 2. Nestas sequências, é observada a presença preferencial dos resíduos Arg ou Lys na posição P1 (SCHECHTER ; BERGER, 1967).

As oito sequências foram confrontadas com o banco de dados do NCBI utilizando a ferramenta BLAST à procura de similaridade com peptídeos já estudados.

A sequência obtida DSGEGDFLAEGGGVR é similar ao fibrinopeptídeo A (FpA), sem o primeiro resíduo Ala presente no N-terminal (ADSGEGDFLAEGGGVR). Outro fragmento, a alphastatina (ADSGEGDFLAEGGGVRGPRVVERH) compreende também a mesma região, e apresenta propriedades antiangiogênicas já descritas. A segunda sequência, SQLQKVPPEWK, corresponde exatamente a um peptídeo descrito como vasoativo e depositado no NCBI (Acesso nº 0603334A). As outras sequências provenientes da cadeia α do fibrinogênio não apresentam similaridades com fragmentos peptídicos descritos. Da cadeia β , a sequência VNDNEEGFFSAR compreende a maior parte da região conhecida como fibrinopeptídeo B (FpB). E as outras

sequências fazem parte do peptídeo já descrito B β 15-42, (GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR) gerado pela clivagem do fibrinogênio pela plasmina, com potencial anti-inflamatório (JENNEWEIN et al., 2011) capaz de proteger camundongos de injúria renal aguda, através da proliferação de células epiteliais e reparo de tecido (KRISHNAMOORTHY et al., 2011).

Tabela 2 - As oito sequências em comum encontradas como produto da hidrólise do fibrinogênio pela bothropasina e BPA, e não exibidas na condição controle.

Peptídeo	-10lgP	Massa	m/z	RT	Espectros
Derivado da cadeia α					
DSGEGDFLAEGGGVR	200.00	14.646.481	7.333.307	20.67	Bothro: 2
DSGEGDFLAEGGGVR	158.87	14.646.481	7.333.316	19.77	BPA: 1
SQLQKVPPEWK	143.97	13.387.295	6.703.718	20.17	BPA: 11
SQLQKVPPEWK	104.46	13.387.295	6.703.717	20.20	Bothro: 3
ALTDMPQMR	133.44	10.774.948	5.397.546	19.38	BPA: 8
ALTDMPQMR	115.11	10.774.948	5.397.547	19.99	Bothro: 4
ALTDMPQMR	117.59	10.614.998	5.317.570	20.22	BPA: 4
ALTDMPQMR	74.59	10.614.998	5.317.567	20.48	Bothro: 2
ALTDMPQMR	126.14	10.774.948	5.397.546	18.85	BPA: 2
ALTDMPQMR	103.28	10.774.948	5.397.545	19.73	Bothro: 1
ALTDMPQMR	98.44	10.934.896	5.477.520	17.88	BPA: 7
ALTDMPQMR	95.25	10.934.896	5.477.520	19.34	Bothro: 6
SGIGTLDGFR	131.88	10.215.192	5.117.664	20.72	BPA: 2
SGIGTLDGFR	118.53	10.215.192	5.117.701	15.77	Bothro: 1
Derivado da cadeia β					
PAPPPISGGGYR	155.61	11.676.036	5.848.080	20.69	BPA: 15
PAPPPISGGGYR	129.48	11.676.036	5.848.091	20.12	Bothro: 10
VNDNEEGFFSAR	147.52	13.836.055	6.928.094	20.67	BPA: 2
VNDNEEGFFSAR	115.69	13.836.055	6.928.109	20.57	Bothro: 1
LRPAPPPISGGGYR	125.49	14.367.888	7.194.011	20.02	Bothro: 7
LRPAPPPISGGGYR	114.29	14.367.888	4.799.368	20.07	BPA: 3
EEAPSLRPAPPPISGGGYR	117.39	19.499.958	6.510.058	20.03	BPA: 3
EEAPSLRPAPPPISGGGYR	90.75	19.499.958	6.510.061	20.15	Bothro: 1

M: Modificação pós-traducional de oxidação da metionina (+15.99)

4.3 Hidrólise da fibronectina pela bothropasina e BPA

A metaloprotease bothropasina e a serino protease BPA mostraram atividade sobre a fibronectina. Pela análise por SDS-PAGE, a bothropasina apresenta maior atividade hidrolítica sobre a fibronectina (Figura 12).

Figura 12 - Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 7,5%. Atividade das enzimas bothropasina (Bothro) e *Bothrops* protease A (BPA) sobre a fibronectina, incubadas por 3 h a 37 °C.

Os peptídeos gerados a partir das digestões foram identificados por espectrometria de massas. A sequência da fibronectina de plasma humano foi obtida no banco de dados *on line* UniProt (Figura 13).

```
>sp|P02751|FINC_HUMAN Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1
SV=4
```

```
1    MLRGPGPGLL LLAVQCLGTA VPSTGASKSK RQAQQMVQPO SPVAVSQSKP
                                     _____

51   GCYDNGKHYQ INQQWERTYL GNALVCTCYG GSRGFNCESEK PEAETCFDK
101  YTGNTYRVGD TYERPKDSMI WDCTCIGAGR GRISCTIANR CHEGGQSYKI
151  GDTWRRPHET GGYMLECVCL GNGKGEWTCK PIAEKCFDHA AGTSYVVGET
201  WEKPYQGWMV VDCTCLGEGS GRITCTSRNR CNDQDTRTSY RIGDTWSKKD
251  NRGNLLQCIC TGNGRGEWKC ERHTSVQTTT SGSGPFTDVR AAVYQPQPHP
                                     _____
                                     _____
```

301 QPPPYGHCVT DSGVVYSVGM QWLKTQGNKQ MLCTCLNGV SCQETAVTQT
 351 YGGNSNGEPC VLPFTYNGRT FYSCTTEGRQ DGHLWCSTTS NYEQDQKYSF
 401 CTDHTVLVQT RGGNSNGALC HFPFLYNNHN YTDCTSEGRR DNMKWC GTTQ
 451 NYDADQKFGF CPMA**AHEEIC** **TTNEGV**MYRI GDQWDKQHDM GHMMRCTCVG
 501 NGRGEWTCIA YSQLRDQCIV DDITYNVNDT FHKRHEEGHM LNCTCFGQGR
 551 GRWKCDPVDQ CQDSETGTFY QIGDSWEKYV HGVRYQCYCY GRGIGEWHCQ
 601 PLQTYPSSSG PVEVFITETP SQPNSHPIQW NAPQPSHISK YILRWRPKNS

 651 VGRWKEATIP **GHLNSYTIK**G LKPGVVYEG QLISIQQYGHQ EVTRFDFTTT

 701 STSTPVTSNT **VTGETTPFSP** LVATSESVTE ITASSFVVS **VSASDTVSGF**

 751 **RVEYELSEEG** DEPQYLDLPS TATSVNIPDL LPGRKYIVNV YQISEDGEQS

 801 LILSTSQTTA PDAPPD TTVD QVDDTSIVVR WSRPQAPITG **YRIVYSPSVE**

 851 **GSSTELNLPE** **TANSVTLSDL** QPGVQYNITI YAVEENQEST PVVIQQUETT

 901 TPRS DTVPSRDLQFVEVTD **VKVTIMWTPP** ESAVTGYRVD VIPVNLPGEH

 951 GQRLPISRNT FAEVTGLSPG VTYFYFKVFAV SHGRESKPLT **AQQT**KLDAP****
 1001 **TNLQFVNEDT** STVLVRWTPP **RAQITGYRLT** **VGLTRRGQPR** QYNVGPSVSK

 1051 YPLRNLQPAS **EYTVSLVAIK** GNQESPKATG VFTTLQPGSS IPPYNTTEVTE

 1101 TTIVITWTPA PRIGFKLGVR PSQGGEAPRE VTSDSGSIVV SGLTPGVEYV
 1151 YTIQVLRDGQ ERDAPIVNKV VTPLSPPTNL **HLEANPD**TGV LTVSWERSTT

 ***
 1201 **PDITGYRITT** TPTNGQQGNS LEEVVHADQS SCTFDNLSPG LEYNVSVYTV
 *****
 1251 KDDKESVPIS DTIIPAVPPP TDLRFTNIGP DTMRVTWAPP PSIDL TNFLV
 1301 RYSPVKNEED VAELSISPSD NAVVL TNLLP GTEYVVS VSS VYEQHESTPL
 1351 RGRQKTGLDS PTGIDFSDIT ANSFTVHWIA PRATITGYRI RHHPEHFSGR

 1401 **PREDRV**PHSR**** **NSITLT**NLTGTEYVVSIVA LNGREESPLL IGQQSTVSDV

 1451 PRDLEVVAAT **PTSL**LLISWDA**** PAVTVRYRYI TYGETGGNSP VQEFTVPGSK

 1501 STATISGLKP GVDYTITVYA **VT**GRGDS**PAS** SKPISINYRT **EIDKPSQMQV**

 1551 **TDVQDNSISV** **KWLPSSSPVT** **GYRVTTTPKN** **GPGPTKTKTA** **GPDQTEMTIE**
 ***** ***** ***
 1601 **GLQPTVEYV****V** **SVYAQNPSGE** **SQPLVQTA**VT NIDRPKGLAF TDVDVDSIKI

 1651 AWESPQGQVS RYRVTYSSPE DGIHELFPAP DGEEDTAELO GLRPGSEYTV

```

1701 SVVALHDDME SQPLIGTQST AIPAPTDLKF TQVTPTSLSA QWTPPNVQLT
1751 GYRVRVTPKE KTGPMKEINL APDSSSVVVS GLMVATKYEV SVYALKDTLT
1801 SRPAQGVVTT LENVSPPRRA RVTDATETTI TISWRTKTET ITGFQVDAVP
1851 ANGQTPIQRT IKPDVRSYTI TGLQPGTDYK IYLYTLNDNA RSSPVVIDAS
1901 TAIDAPSNLR FLATTPNSLL VSWQPPRARI TGYIIKYEKP GSPPREVVPR
1951 PRPGVTEATI TGLEPGTEYT IYVIALKNNQ KSEPLIGRKK TDELPQLVTL
2001 PHPNLHGPEI LDVPSTVQKT PFVTHPGYDT GNGIQLPGTS GQQPSVGQQM
      *****
2051 IFEEHGFRRT TPPTTATPIR HRPRPYPPNV GEEIQIGHIP REDVDYHLYP
      *****
2101 HGPGLNPNAS TGQEALSQTT ISWAPFQDTS EYIISCHPVG TDEEPLQFRV
2151 PGTSTSATLT GLTRGATYNV IVEALKDQQR HKVREEVTV GNSVNEGLNQ
      *****
2201 PTDDSCFDPY TVSHYAVGDE WERMSESGFK LLCQCLGFGS GHFRCDSSRW
2251 CHDNGVNYKI GEKWDRQGEN GQMMSCCTLG NGKGEFKCDP HEATCYDDGK
2301 TYHVGEQWQK EYLGAICSCT CFGGQRGWRC DNCRRPGGEP SPEGTTGQSY
2351 NQYSQRYHQR TNTNVNCPIC CFMPLDVQAD REDSRE

```

Figura 13 - Sequência da fibronectina do plasma humano. Sublinhado em preto estão as sequências encontradas na digestão controle. Sublinhado em vermelho estão as sequências obtidas pela clivagem com a bothropasina, e em azul, com a BPA. Outras sequências já descritas são apresentadas em negrito. Os asteriscos indicam sequências consenso entre as digestões.

A condição testada de incubação das proteases com a fibronectina de plasma humano foi capaz de gerar 100 sequências identificadas pelo programa Peaks Studio 7.0 utilizando os parâmetros descritos anteriormente. Destas 100 sequências, 83% foram liberadas pela bothropasina, sendo 54 sequências unicamente liberadas pela bothropasina, 14 encontradas em todas as digestões (bothropasina, BPA e digestão controle), quatro sequências compartilhadas pela digestão controle e com a bothropasina, e onze sequências idênticas encontradas tanto nas incubações com bothropasina e a BPA. A BPA liberou, no total, 40 sequências, sendo 14 únicas e uma encontrada também na digestão controle. Também foram observadas na condição controle, duas sequências únicas (Figura 14).

Figura 14 - Diagrama de Venn representando o número de sequências derivadas da fibronectina identificadas em cada digestão.

As onze sequências comuns derivadas da digestão com a metalo e a serino proteases utilizadas e não exibidas na condição controle são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequências em comum encontradas na hidrólise da fibronectina.

Peptídeo	-10lgP	Massa	m/z	RT	Espectros
MIFEEHGFR	116.24	11.645.386	5.832.764	20.95	Bothro: 10
MIFEEHGFR	98.80	11.645.386	5.832.769	20.22	BPA: 1
<u>M</u> IFEEHGFR	115.20	11.805.334	5.912.736	21.84	Bothro: 23
<u>M</u> IFEEHGFR	90.64	11.805.334	5.912.739	19.81	BPA: 3
WLPSSSPVTGYR	110.61	13.486.775	6.753.457	20.66	BPA: 3
WLPSSSPVTGYR	57.00	13.486.775	6.753.469	20.50	Bothro: 1
FEEHGFR	88.18	9.204.140	4.612.142	18.39	BPA: 1
FEEHGFR	55.90	9.204.140	4.612.188	14.94	Bothro: 1
IFEEHGFR	88.11	10.334.980	5.177.563	19.59	BPA: 2
IFEEHGFR	80.80	10.334.980	5.177.589	14.07	Bothro: 3
STTPDITGYR	79.41	11.095.353	5.557.750	19.79	BPA: 3
STTPDITGYR	72.56	11.095.353	5.557.750	19.67	Bothro: 1
LHGPEILDVPSTVQ	73.77	15.037.932	7.529.034	20.90	Bothro: 1
LHGPEILDVPSTVQ	69.28	15.037.932	7.529.038	20.86	BPA: 1
ATLTGLTR	69.28	8.314.814	4.167.480	19.65	BPA: 1
ATLTGLTR	64.38	8.314.814	4.167.479	19.62	Bothro: 1
FEEHGF	61.17	7.643.129	3.831.636	19.92	BPA: 1
FEEHGF	58.96	7.643.129	3.831.637	20.00	Bothro: 1
DVQDNSISV	42.80	9.754.509	4.887.328	20.28	Bothro: 1
DVQDNSISV	42.30	9.754.509	4.887.327	20.31	BPA: 1
IFEEH	40.69	6.733.071	3.376.611	18.21	Bothro: 1
IFEEH	39.74	6.733.071	3.376.611	18.29	BPA: 1
VIVEALKDQQR	38.91	12.977.354	6.498.735	19.30	Bothro: 1
VIVEALKDQQR	35.15	12.977.354	6.498.749	18.66	BPA: 1

M: Modificação pós-traducional de oxidação da metionina (+15.99)

Em sete das onze sequências em comum apresentadas como produto de hidrólise da fibronectina pela bothropasina e BPA, é encontrado o resíduo Arg na posição P1 quando analisada a hidrólise na região C-terminal dos peptídeos.

As sequências foram confrontadas no BLAST e não foram encontradas similaridades com peptídeos já descritos.

4.4 Hidrólise do cininogênio pela bothropasina e BPA

A eletroforese em gel SDS-poliacrilamida 10%, após a incubação do cininogênio com as metalo e serino proteases, exibe a digestão da maior cadeia do cininogênio de 62 kDa pela bothropasina (Figura 15). Contudo, as análises por espectrometria de massas não identificaram peptídeos provenientes desta hidrólise.

Figura 15 - Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10%. Atividade das enzimas bothropasina (Bothro) e *Bothrops* protease A (BPA) sobre o cininogênio de alta massa molecular, incubados por 3 h a 37 °C.

Após diversas tentativas frustradas de tentar identificar os produtos peptídicos oriundos destas digestões, optamos por outra abordagem. Foi realizada separação por HPLC dos produtos de digestão, os picos foram coletados manualmente e estes submetidos à espectrometria de massas para identificação dos peptídeos gerados (Figura 16).

Todos os picos (1-13) foram submetidos à análise por espectrometria de massas, mas apenas os peptídeos presentes nos picos 7, 8, 9, 11, 12 e 13 puderam ser identificados (Tabela 4). A incubação com a BPA mostrou um perfil cromatográfico similar ao da condição controle, realizada com a incubação do cininogênio nas mesmas condições de tempo e temperatura, porém sem a presença de protease. Desta forma, concluímos que o cininogênio não se comportou como substrato para a BPA.

Figura 16 - Perfil cromatográfico em coluna C18 dos produtos de digestão do cininogênio pela bothropasina (linha azul), BPA (linha preta) e condição controle, sem protease (linha vermelha). Os picos numerados foram coletados e submetidos à análise por espectrometria de massas. Dos picos destacados foram obtidas as sequências peptídicas.

As onze sequências derivadas da digestão do cininogênio pela bothropasina estão exibidas na Tabela 4. Os posicionamentos dos peptídeos identificados na sequência completa do cininogênio de alta massa molecular estão mostrados na Figura 17.

Tabela 4 - Sequências obtidas na hidrólise do cininogênio pela bothropasina.

Peptídeo	-10lgP	Massa	m/z	RT	Pico
HKFKLDDDLHQGGH	60.48	17.748.386	5.926.201	19.33	8
LGHGHEQQHGLGHGKFKLDDDLHQGGH	58.44	32.195.095	8.058.838	18.88	8
LGHGHEQQHGLGHGKFKLDDDLHQGGH	32.59	32.195.095	6.449.094	18.86	8
LGHGHEQQHGLGHG	42.21	14.626.814	4.885.681	17.13	7
LGHGHEQQHGLGHG	35.96	14.626.814	4.885.676	16.88	7
IQSDDDWIPDIQIDPNG	38.67	19.398.799	9.709.470	22.63	13
LIATM	30.68	5.632.989	2.826.786	19.72	9
FKAVIDAALKKY	29.76	12.527.179	4.185.800	19.83	9
RPPGFSPF	28.12	9.034.602	4.527.368	21.44	12
IDIQL	27.72	6.003.483	3.011.996	21.47	11
LGHGHEQQHGLGH	25.99	14.056.599	4.695.605	16.97	7
LGHGHEQQHGLGHG	25.57	15.997.404	4.009.426	16.76	7
DQGHGH	25.29	6.492.568	3.256.561	20.13	9

M: Modificação pós-traducional de oxidação da metionina (+15.99)

```
>sp|P01042|KNG1_HUMAN Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2
1   MKLITILFLC SRLLLSLTQE SQSEEIDCND KDLFKAVDAA LKKYNSQNQS
51  NNQFVLYRIT EATKTVGSDT FYSFKYEIKE GDCPVQSGKT WQDCEYKDAA
101 KAATGECTAT VGKRSSTKFS VATQTCQITP AEGPVVTAQY DCLGCVHPIS
151 TQSPDLEPIL RHGIQYFNNN TQHSSLFMLN EVKRAQRQVV AGLNFRITYS
201 IVQTNCSEKEN FLFLTPDCKS LWNQDTGECT DNAYIDIQLR IASFSQNCID
251 YPGKDFVQPP TKICVGCPRD IPTNSPELEE TLTHITITKLN AENNATFYFK
301 IDNVKKARVQ VVAGKKYFID FVARETTCSK ESNEELTESC ETKKLGQSLD
351 CNAEVYVVPW EKKIYPTVNC QPLGMISLMK RPPGFSPFRS SRIGEIKEET
401 TVSPPHTSMA PAQDEERDSG KEQGHTRRHD WGHEKQRKHN LGHGKHHERD
451 QGHGHQRGHG LGHGHEQQHG LGHGKFKLD DDLEHQGGHV LDHGKHKHKHG
501 HGHGKHKNKG KKNKGKNGWK TEHLASSED STTPSAQTQE KTEGPTPIPS
551 LAKPGVTVTTF SDFQSDLIA TMMPPISPAP IQSDDDWIPD IQIDPNGLSF
601 NPISDFPDTT SPKCPGRPWK SVSEINPTTQ MKESYYFDLT DGLS
```

Figura 17 - Sequência do cininogênio de alta massa molecular de plasma humano. As sequências obtidas pela clivagem com a bothropasina estão sublinhadas em vermelho. A bradicinina está evidenciada em cinza, outras sequências já descritas são apresentadas em negrito.

Foi encontrada a cinina des-Arg⁹-BK (RPPGFSPF) como produto da hidrólise pela bothropasina. Quanto às outras dez sequências encontradas, após a busca utilizando a ferramenta BLAST, nenhuma apresentou similaridade com sequências já estudadas.

4.5 Análise dos pontos de clivagem preferenciais

Conforme os logs de sequências gerados pelo IceLogo, a bothropasina apresenta preferência por resíduos polares (G, S) ou básicos (R, H) nas posições P3, P2 e P1, dependendo do substrato, seguida pela ocorrência predominante de um resíduo hidrofóbico (L, M, V) na posição P1'. Nas posições P2', P3' e P4' são aceitos resíduos polares (T, G, S), básicos (H, R) ou hidrofóbicos (P, Q, V) de acordo com os peptídeos analisados (Figura 18A, C e E e Apêndice 1, 2 e 3).

Para a BPA foi observada a preferência por resíduos polares (G, S, T) ou hidrofóbicos (P, Q, F, V) nas posições P4, P3, e P2, sendo marcante a frequência de arginina na posição P1. Nas posições P1' P2', P3' e P4' foram encontrados preferencialmente resíduos polares (S, G, T), ácidos (E) básicos (R), ou hidrofóbicos (M, P) (Figura 18B e D).

Figura 18 - Sítios de clivagem preferenciais das proteases bothropasina e BPA frente aos substratos fibrinogênio, fibronectina e cininogênio. Logos de sequência dos peptídeos das cadeias α e β do fibrinogênio pela (A) bothropasina e (B) BPA; logos de sequência dos peptídeos da fibronectina pela (C) bothropasina e (D) BPA; e (E) peptídeos derivados do cininogênio pela bothropasina.

4.6 Peptídeos selecionados para síntese química e suas propriedades preditas *in silico*

As propriedades das sequências selecionadas para síntese química foram obtidas pela ferramenta ProtParam (ExPASy) e pela análise na plataforma AntiAngioPred (Tabela 5).

Tabela 5 - Propriedades preditas dos peptídeos sintéticos.

Sequências		ProtParam			AntiAngioPred			
Derivadas da cadeia α do FBG	PM	pI teórico	GRAVY	II	Score	Propriedade predita	Mutante	score mutante
FBG1 SQLQKVPP <u>E</u> WK	1339,5	8,31	-1,382	85,67 instável	1,67	Antiangiogênico	SQLQKVPP <u>C</u> WK	2,31
FBG2 ALTDMPQMR	1062,2	5,88	-0,489	70,73 instável	0,21	Antiangiogênico	<u>C</u> LTDMPQMR	1,64
FBG3 SGIGTLDGFR	1022,1	5,55	0,040	-7,98 estável	0,54	Antiangiogênico	SGIGTLDG <u>C</u> R	1,96
Derivadas da cadeia β do FBG								
FBG4 (análogo FpB) VNDNEEGFFSAR	1384,4	4,14	-0,967	36,33 estável	-1,11	Não antiangiogênico	<u>C</u> NDNEEGFFSAR	0,27
FBG5 LRPAPPPI <u>S</u> GGGYR	1437,6	10,84	-0,614	91,31 instável	0,72	Antiangiogênico	LRP <u>C</u> PPPI <u>S</u> GGGYR	1,68
FBG6 PAPPPI <u>S</u> GGGYR	1168,3	9,18	-0,658	72,77 instável	0,81	Antiangiogênico	P <u>C</u> PPPI <u>S</u> GGGYR	1,80
Derivadas da fibronectina								
FN1 STTPDITGYR	1110,1	5,55	-0,970	-32,43 estável	2,04	Antiangiogênico	STTPDITG <u>C</u> R	3,24
FN2 WLPSSSPV <u>T</u> GYR	1349,5	8,75	-0,450	101,00 instável	1,67	Antiangiogênico	WLPSSSP <u>C</u> TGYR	2,85
FN3 IFEEH <u>G</u> FR	1034,1	5,40	-0,625	27,11 estável	-0,34	Não antiangiogênico	IFEE <u>C</u> GFR	0,80
FN4 MIFEEH <u>G</u> FR	1165,3	5,38	-0,344	25,21 estável	-0,91	Não antiangiogênico	<u>C</u> IFEEH <u>G</u> FR	0,33
Derivada do cininogênio								
des-Arg⁹-BK RPPG <u>F</u> SPF	909,0	9,75	-0,613	135,90 instável	1,46	Antiangiogênico	RPPG <u>E</u> SPF	2,55

PM: peso molecular

pI: ponto isoelétrico

GRAVY: média da hidropaticidade

II: índice de instabilidade (<40 considerável estável)

Os peptídeos derivados do fibrinogênio são tratados por FBG e numeração de 1 a 6, e os derivados da fibronectina, por FN e numeração de 1 a 4.

Os peptídeos apresentam as médias do índice de hidropaticidade predominantemente negativas, indicando o caráter hidrofílico dos mesmos. O pI dos peptídeos variam de 4,14 à 10,84. Assim como também são variáveis seus índices de estabilidade.

Dentre os onze peptídeos analisados, oito se apresentam como potencialmente antiangiogênicos. A plataforma providencia mutações pontuais nas sequências que melhorariam o valor de *score* dos peptídeos quanto à sua preditiva atividade antiangiogênica. O que usualmente a plataforma sugere é a mudança de um resíduo menos frequente nos peptídeos descritos, tais como Ala, Asp, Ile, Leu, Val e Phe por uma Cys, geralmente encontrada tanto na região N-terminal quanto na C-terminal dos peptídeos já caracterizados como inibidores do processo de neovascularização.

4.7 Testes de modulação das atividades da elastase e trombina pelos peptídeos sintéticos

A busca por moduladores de proteases de importância médica é atual e peptídeos têm ganhado destaque neste campo. Uma vez que o presente trabalho resultou em onze sequências peptídicas em suas formas sintéticas, decidimos por explorar o possível potencial modulador das mesmas sobre proteases humanas de interesse clínico e atuante no contexto da angiogênese, como a elastase e a trombina. Nossos resultados, obtidos em duplicata, não revelaram inibidores de alta potência destas duas proteases, uma vez que foram utilizados na concentração de 10 μ M cada um. Porém, alguns apresentam seletividade para a interação com uma ou outra peptidase estudada (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de inibição ou ativação da elastase e trombina após incubação com os peptídeos derivados do fibrinogênio, fibronectina e cininogênio.

Peptídeo		elastase		trombina	
		UF/min	Inibição	UF/min	Inibição
controle positivo		302,9		199,4	
FBG1	SQLQKVPPEWK	218,8	28%	166,0	17%
FBG2	ALTDMPQMR	221,4	27%	177,9	11%
FBG3	SGIGTLDGFR	325,6	-7%	201,3	-0,9%
FBG4	VNDNEEGFFSAR	314,5	-3%	290,4	-46%
FBG5	LRPAPPPIISGGGYR	227,8	24%	239,9	-20%
FBG6	PAPPPIISGGGYR	242,9	20%	240,0	-20%
FN1	STTPDITGYR	360,3	-19%	201,4	-1%
FN2	WLPSSSPVTGYR	317,9	-4%	220,3	-10%
FN3	IFEEHGFR	336,3	-11%	239,3	-20%
FN4	MIFEEHGFR	336,8	-11%	240,5	-21%
controle positivo		234,8		105,6	
des-Arg⁹-BK	RPPGFSPF	251,8	-7%	121,8	-15%

Entre os inibidores da elastase, encontramos predominantemente peptídeos sintéticos derivados do fibrinogênio, FBG1 (28%), FBG2 (27%), FBG4 (24%) e FBG6 (20%) capazes de inibir a atividade hidrolítica da elastase frente ao substrato Abz-FRSSR-EDDnp. Os outros peptídeos derivados do fibrinogênio, FBG3 e FBG4, ao contrário, ativaram 7% e 3% respectivamente a atividade da elastase em relação ao controle positivo. Os peptídeos derivados da fibronectina, FN1-4 revelaram ser ativadores (entre 4 e 19%) da atividade da elastase.

Quanto à atividade da trombina frente ao substrato Abz-GGFLRRV-EDDnp, apenas os peptídeos FBG1 e FBG2 mostraram inibir 17% e 11%, respectivamente, sua atividade. Os peptídeos FBG5, FBG6, FN3 e FN4, ao contrário, mostraram ativação da trombina em aproximadamente 20%, sendo FBG4 o mais potente ativador entre eles (46%).

Os resultados mais expressivos de ativação ou inibição das proteases estudadas estão em negrito (Tabela 6).

5 DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes são fonte abundante de material com atividade biológica, pois são misturas complexas, constituídas principalmente por proteínas (com ou sem ação enzimática), peptídeos, nucleosídeos e íons metálicos. Uma vez que as principais toxinas do veneno da *Bothrops jararaca* são metalo e serino proteases, utilizamos um membro de cada uma destas famílias (bothropasina e *Bothrops* protease A) a fim de estudar os produtos obtidos da hidrólise de proteínas plasmáticas humanas. Assim, pudemos comprovar que proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio, fibronectina e cininogênio de plasma humano, são passíveis de sofrer a ação de proteases do veneno e, após sua digestão, gerarem peptídeos bioativos. É importante mencionar que as hidrólises do fibrinogênio e da fibronectina já haviam sido estudadas como substratos para as proteases do veneno de *B. jararaca* (OLIVEIRA et al., 2010), mas a identificação das sequências primárias dos peptídeos resultantes desta degradação foi um dos maiores interesses do presente trabalho.

O estudo de peptídeos ativos iniciou-se no início do século passado, quando Bayliss e Starling, em 1902, observaram que o intestino secretava uma substância capaz de estimular o pâncreas a secretar enzimas digestivas. Após grande esforço, a secretina enfim foi isolada e purificada por Jorpes e Mutt em 1973, e sua sequência peptídica determinada somente em 1991, por Wieland e Bodansky.

Desde então novos peptídeos ativos foram estudados e um número cada vez maior deles tem sido incluído na classe das moléculas de sinalização intercelular que regulam processos neurais, endócrinos e imunes.

O avanço das técnicas de proteômica tem aumentado sensivelmente a detecção de novos peptídeos humanos com atividade biológica de importância. A hemopressina, por exemplo, foi descrita pela primeira vez em 2003 (RIOLI et al., 2003) e é um nonapeptídeo vasoativo (PVNFKFLSH) originado pelo processamento da cadeia α da hemoglobina. Este peptídeo foi descrito por ser antagonista do receptor canabinoide CB1, por ter ação hipotensora e antinoceptiva (GOMES et al., 2010), e desde sua primeira caracterização já foram publicados 50 artigos indexados no NCBI.

Nas últimas décadas, muitos inibidores peptídicos de angiogênese têm sido descobertos e mostram inibir funções de células endoteliais *in vitro* e/ou o crescimento tumoral *in vivo*, por vezes suprimindo respostas desencadeadas por fatores estimuladores, como VEGF e FGF2 (BOOTLE-WILBRAHAM et al., 2000). Entre estes há moduladores das funções de células endoteliais derivados de macromoléculas componentes de matriz extracelular (arrestina, canstatina, endostatina, *anastellin*, tunstatina), e de componentes da cascata de coagulação (angiostatina, alphastatina, β 43-63, kininostatin) (NYBERG; XIE; KALLURI, 2005; RIBATTI, 2009; ROSCA et al., 2011).

Assim, o estudo de peptídeos com potencial utilização em enfermidades caracterizadas por anormalidades na formação de microvasos sanguíneos é proeminente. Recentemente, foi disponibilizada a plataforma AntiAngioPred (RAMAPRASAD et al., 2015), para predição de atividade antiangiogênica de peptídeos, com base nos resíduos de aminoácidos preferenciais de moléculas já estudadas. A ferramenta foi utilizada no presente trabalho e, segundo a predição obtida pela utilização da plataforma, ao menos oito sequências têm potencial ação antiangiogênica. Porém, somente após avaliarmos o potencial pró ou antiangiogênico dos peptídeos que foram sintetizados, poderemos verificar se nossos resultados estão de acordo com a mesma. Também é importante mencionar que a plataforma AntiAngioPred foi disponibilizada após nossas escolhas das sequências serem sintetizadas. Assim, pretendemos na etapa de Doutorado, utilizar a plataforma com todos os fragmentos obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho, incluindo sequências formadas exclusivamente pela bothropasina ou pela BPA. Dependendo dos novos resultados obtidos, realizaremos novas sínteses.

Levando em consideração os efeitos opostos presentes em fragmentos do fibrinogênio, discutidos a seguir, nos pareceu pertinente o estudo de seus fragmentos gerados a partir de proteólise por componentes do veneno de *B. jararaca*.

A bothropasina e a BPA degradaram o fibrinogênio, sendo a bothropasina a proteinase que apresentou maior atividade sobre o fibrinogênio.

Oliveira et al., (2010) mostraram que a bothropasina cliva completamente a cadeia α do fibrinogênio, sendo esta a região preferencialmente degradada por SVMPS (*Snake Venom Metalloproteinases*). No entanto, neste estudo não é relatada a digestão da cadeia β . A jararhagina, outra metaloprotease que compartilha 95% de identidade com a bothropasina, quando incubada com fibrinogênio por 10 minutos em diferentes concentrações, foi capaz de

clivar apenas a cadeia α do fibrinogênio, mantendo intactas as cadeias β e γ (KAMIGUTI et al., 1994). Nossos resultados demonstram que o aumento do tempo de incubação levou à hidrólise da cadeia β do fibrinogênio, além da cadeia α , tanto pela bothropasina quanto pela BPA. Por outro lado, a cadeia γ mostrou-se resistente à hidrólise por ambas as proteases estudadas. A resistência da cadeia γ do fibrinogênio já foi reportada para outras metaloproteases, como foi observado em estudos de degradação do fibrinogênio pela MMP-2 (MONACO et al., 2007).

Um dos fragmentos gerados a partir da hidrólise da cadeia α pela bothropasina e BPA pela incubação com o fibrinogênio (ADSGEGDFLAEGGGVR) é constituinte da alphastatina (ADSGEGDFLAEGGGVRGPRVVERH). Foram relatadas as propriedades antiangiogênicas da alphastatina, com a inibição da migração de células endoteliais e da formação tubular *in vitro* (STATON et al., 2004). A sequência obtida no presente trabalho também é similar ao fibrinopeptídeo A (FpA), sem o primeiro resíduo, Ala (DSGEGDFLAEGGGVR). FpA corresponde aos 16 primeiros aminoácidos da cadeia α do fibrinogênio liberados no processamento endógeno do fibrinogênio pela trombina. A liberação de FpA é uma etapa essencial para a formação de fibrina durante a coagulação sanguínea. Apesar das atividades já descritas para a alphastatina decidimos por não sintetizar a sequência menor encontrada nos nossos estudos, uma vez que este peptídeo também foi detectado na condição controle.

A segunda sequência encontrada, SQLQKVPPEWK, corresponde exatamente ao peptídeo vasoativo descrito por Belew et al., (1978) e, por isso decidimos pela síntese do mesmo (FBG1). Esse peptídeo, liberado pela plasmina a partir da hidrólise do fibrinogênio, foi isolado e promoveu o maior aumento de permeabilidade microvascular em comparação com outros peptídeos de baixa massa molecular provenientes desta degradação. A plasmina (EC 3.4.21.7) é uma serino protease classificada na família S1 e apresenta especificidade marcante para a hidrólise de substratos com os resíduos de Arg e Lys na posição P1. A *Bothrops* protease A também está classificada na família S1 das serino proteases, e apresentou a mesma especificidade para a hidrólise do fibrinogênio e liberação do peptídeo vasoativo. Estas observações estão de acordo com nosso resultado, uma vez que o peptídeo apresenta resíduos de Lys nas posições P1 (K.SQLQKVPPEWK.A). Para a bothropasina não é descrita a preferência para substratos com resíduos básicos na posição P1 (RAWLINGS et al., 2014), entretanto relatamos a ocorrência de resíduos básicos nesta posição nos peptídeos encontrados. Assim, acreditamos que a especificidade ampla da bothropasina para a hidrólise de substratos tenha sido importante para

encontrarmos peptídeos idênticos gerados por duas proteases pertencentes a diferentes classes. Uma vez que o peptídeo já foi descrito como vasoativo, investigamos suas propriedades em ensaios enzimáticos sobre a elastase e trombina. Este fragmento derivado do fibrinogênio apresentou capacidade inibitória de 28% e 17%, respectivamente, sobre a atividade destas duas proteases frente ao substrato FRET testado.

A sequência VNDNEEGFFSAR (FBG4) compreende a maior parte da região conhecida como fibrinopeptídeo B (FpB), composto pelos 14 primeiros resíduos de aminoácidos da cadeia β do fibrinogênio, EGVNDNEEGFFSAR, também liberados endogenamente pela trombina (WEISEL, 2005). Estudos demonstram propriedades anti-inflamatórias de FpB por diminuir o edema de pata de camundongos (RUHENSTROTH et al., 1981) e contraditoriamente são descritos efeitos pró inflamatórios, com FpB atuando como um agente quimiotático para macrófagos (SINGH et al., 1990). No presente estudo, este peptídeo foi gerado a partir das hidrólises das ligações G-V (no N-terminal) e R-G (no C-terminal), mostrando que a BPA é capaz de clivar substratos com resíduos não somente básicos na posição P1. Mais uma vez, a especificidade ampla da bothropasina favoreceu o encontro de mais um peptídeo idêntico, que também foi gerado pela BPA, a partir do fibrinogênio. Considerando que o peptídeo abrange grande parte da sequência conhecida como fibrinopeptídeo B, optamos pela síntese do mesmo.

Tradicionalmente, alosteria é conhecida como um evento de ligação a um sítio alostérico que induz uma alteração conformacional distinta em outro local da molécula (por exemplo, sítio ativo) (MONOD et al, 1965). Este modelo afirma que existem duas conformações distintas: o estado de baixa atividade, sem o ligante do sítio alostérico, e o estado de alta atividade, com o sítio alostérico ocupado com seu ligante. Nos últimos anos, o modelo clássico de alosteria tem sido expandido. Acredita-se agora que, em vez de induzir uma mudança conformacional de um estado inativo rígido a um estado ativo rígido, a interação de um ligante ao local alostérico altera o equilíbrio de um conjunto de conformações para um estado ativo (TSAI et al, 2008; HILSER, 2010). Assim, alosteria é um fenômeno termodinâmico que é acionado por um conjunto de alterações na entropia e/ou entalpia causada na molécula (TSAI et al., 2008).

A trombina é uma enzima que possui regulação alostérica, reconhecida pelo efeito do cátion monovalente, Na^+ e do hirugênio na modulação da sua atividade (LECHTENBERG et al., 2012). A interação do hirugênio se dá no exossítio I da trombina, que é constituído por uma fenda hidrofóbica contornada por resíduos catiônicos e que é essencial para interações com substratos

fisiológicos e moduladores de trombina. Assim, o exossítio da trombina possui características básicas e o expressivo aumento da atividade da trombina (46%) pelo peptídeo FBG4 (VNDNEEGFFSAR) pode ser explicado pela sua propriedade ácida (pI 4,14). Ou seja, pela existência de um sítio para ligação aniônica na trombina, acreditamos que FBG4 esteja se ligando a este sítio. Porém, apesar desse aumento da atividade da trombina sobre o substrato FRET testado, é possível que FBG4 se comporte como um bom inibidor frente à hidrólise de macromoléculas. Hortin e Trimpe (1991) verificaram o aumento da atividade catalítica da trombina frente a substratos cromogênicos incubados com peptídeos ácidos derivados da cadeia γ do fibrinogênio (410-427), hirudina (54-65) e cofator II da heparina (54-75). Contudo, quanto à clivagem de macromoléculas, estes peptídeos apresentam efeitos opostos, sendo observada a inibição da ativação da proteína C pela trombina, assim como a inibição da clivagem do fibrinogênio, atuando como potenciais peptídeos anticoagulantes. Deste modo, como a ativação da trombina pelo FBG4 foi observada frente à hidrólise de um substrato fluorescente de pequeno tamanho, pretendemos estudar futuramente a possível inibição da trombina sobre a hidrólise de macromoléculas pelo FBG4.

Em 2010, Krajewska e colaboradores, caracterizaram o efeito antiangiogênico de outro fragmento do fibrinogênio, este derivado da cadeia β , denominado β 43-63. Sua sequência é composta pelos resíduos de aminoácidos ARPAKAAATQKKVERKAPDA. β 43-63 mostrou ser capaz de inibir respostas angiogênicas promovidas por diferentes fatores de crescimento, tais como VEGF, FGF2, PDGF e HGF (fator de crescimento de hepatócito) *in vitro*, além de inibir a vascularização em modelo de adenocarcinoma mamário murino. A sequência obtida no presente estudo, EEAPSLRPAPPPISGGGYR, está localizada nas posições 24-42 da cadeia β do fibrinogênio, e antecede o peptídeo denominado β 43-63. Além desse fragmento maior (24-42) obtivemos outros peptídeos menores relacionados a esta região que foram simultaneamente gerados pelas proteases em estudo; LRPAPPPISGGGYR (FBG5) e PAPPPISGGGYR (FBG6). O primeiro dos peptídeos apresenta uma clivagem incomum com a descrita para a BPA, entre os resíduos S-L, mas por outro lado está totalmente de acordo com a especificidade da bothropasina para a clivagem de substratos com resíduos de Leu na posição P1' (PAES LEME et al., 2011). O segundo, PAPPPISGGGYR, foi gerado a partir da hidrólise de peptídeos com resíduos básicos na posição P1, que é uma clivagem esperada para a BPA, mas não para a bothropasina. É importante informar que a numeração utilizada acima é baseada na cadeia β do fibrinogênio madura. Estes

peptídeos estão inclusos no peptídeo B β 15-42 (GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR), um fragmento derivado do N-terminal da cadeia β do fibrinogênio, sendo liberado pela plasmina. Este peptídeo é amplamente estudado por seu potencial anti-inflamatório, com registros de diminuir o recrutamento de leucócitos e a ativação endotelial, e de promover a proliferação de células epiteliais, reduzindo assim a lesão de isquemia-reperfusão em transplante renal em modelo murino (JENNEWEIN et al., 2011; KRISHNAMOORTHY et al., 2011; SORENSEN et al., 2011).

Nos ensaios enzimáticos, FBG5 e FB6 apresentaram os mesmos efeitos, apesar da diferença de dois resíduos. Ambos exibiram capacidade inibitória, próximo a 20%, sobre a atividade da elastase, e efeito ativador sobre a trombina de 20% com os substratos analisados. Novamente, nos deparamos com a ativação da hidrólise do substrato FRET pela trombina, porém, por dois peptídeos com características básicas (FBG5, pI = 10,84 e FBG6, pI = 9,18). Talvez, a alta incidência de resíduos Pro e Gly nas sequências pode estar relacionada a ativação da trombina, porém, somente estudos de mutações pontuais dos aminoácidos nestes peptídeos poderiam responder definitivamente esta questão. A inibição da elastase por ambos os peptídeos deverá ser mais bem investigada, uma vez que as duas sequências podem estar se comportando como substratos para a elastase.

As outras duas sequências peptídicas que foram liberadas simultaneamente pelas bothropasina e BPA a partir da hidrólise da cadeia α do fibrinogênio, ALTDMPQMR (FBG2) e SGIGTLDGFR (FBG3), não constam na literatura. FBG2 apresenta baixa capacidade ativadora da atividade da elastase (27%) e da trombina (11%), já FBG3 apresenta pouco efeito na atividade destas mesmas enzimas.

A fibronectina foi degradada pelas enzimas utilizadas, sendo a bothropasina, novamente, a protease que apresenta maior atividade hidrolítica sobre este substrato em comparação com a BPA. A condição controle da digestão da fibronectina, curiosamente apresentou 16 sequências comuns com as duas outras digestões. Provavelmente, isto ocorreu devido à instabilidade da proteína, que sofreu autólise. Contudo, foram encontradas sequências consenso entre as digestões com as proteases e que não estavam presentes na condição controle.

Diferentes peptídeos derivados da fibronectina já foram caracterizados quanto aos seus efeitos mediados por integrinas. Como, por exemplo, o peptídeo KLDAPT, relacionado à adesão celular (MOYANO et al., 1997), o peptídeo GRGDS, que apresenta o *motif* RGD, com ação

antiadesiva capaz de inibir metástase em melanoma murino (HUMPHRIES et al., 1986; GAO; GROVES, 1998), e o peptídeo Ac-PHSRN-NH₂ que estimula a migração de queratinócitos e fibroblastos, acelerando o processo de cicatrização (LIVANT et al., 2000). O peptídeo REDV representa outro fragmento responsável pela regulação da adesão celular presente na fibronectina (HUMPHRIES et al., 1986b). A sequência LDV é essencial para o reconhecimento da fibronectina pela integrina $\alpha 4 \beta 1$ (KOMORIYA et al., 1991). A sequência AHEEICTTNEGVM já foi reportada por sua ação inibitória da migração e invasão celular (COLOMBI et al., 2003).

Das onze sequências comuns obtidas da fibronectina no presente estudo, até o momento, nenhuma foi estudada quanto aos seus efeitos em células endoteliais ou enquanto inibidores de enzimas proteolíticas. Assim, os peptídeos STTPDITGYR, WLPSSSPVTGYR, IFEEHGFR e MIFEEHGFR foram escolhidos para a síntese química. Nossos ensaios enzimáticos iniciais demonstram o efeito majoritariamente ativador (1- 21%) da atividade da elastase e trombina nos nossos ensaios.

Os cininogênios são proteínas compostas por múltiplos domínios, cada um associado a um tipo de atividade. Por apresentar vários peptídeos ativos inseridos em sua sequência, foi nossa maior motivação para a escolha desta proteína enquanto substrato putativo para as proteases do veneno de *Bothrops jararaca*.

O cininogênio de alta massa molecular de plasma humano foi substrato apenas para bothropasina nas condições testadas. Esta metaloprotease parece clivar preferencialmente a cadeia pesada do cininogênio, de 62 kDa. A BPA não apresentou atividade hidrolítica observável por SDS-PAGE ou por análise em sistema de HPLC, apesar de o cininogênio ser um conhecido substrato de serino proteases. Com a estratégia de detecção dos produtos de clivagem pela bothropasina consistindo de digestão enzimática, separação da fração peptídica, dessalinização e análise por espectrometria de massas, como realizado para o fibrinogênio e fibronectina, não foi possível identificar os peptídeos liberados. Então, realizamos a digestão, separação por HPLC, coleta dos picos de cada digestão, e finalmente a análise por espectrometria de massas destes picos. Apenas com a separação adicional por HPLC, obtivemos a identificação dos produtos de clivagem do cininogênio pela bothropasina.

A sequência rica em His-Gly presente no domínio 5, composta pelos resíduos LGHGHKHERDQGHGHQR, foi descrita como responsável pela ligação do cininogênio à superfícies carregadas negativamente, e devido a sua natureza é local de ligação da ferritina e

provavelmente a metais de transição (COLMAN et al., 2000; HUHN et al., 2014). Um dos peptídeos liberados pela bothropasina, DQGHGH, está inserido nesta região. Como produtos da hidrólise pela bothropasina ainda foram encontradas outras sequências maiores ricas em His e Gly.

Um dos peptídeos liberados na degradação do cininogênio pela bothropasina, RPPGFSPF, é conhecido como des-Arg⁹-BK, um análogo à bradiginina, RPPGFSPFR, e calidina, KRPPGFSPFR. O análogo des-Arg⁹-BK é um antagonista do receptor B1, receptor expresso em condições de inflamação e injúria de tecidos (MORBIDELLI et al., 1998). Des-Arg⁹-BK é capaz de promover o mesmo efeito proliferativo que BK em células endoteliais atuando sinergicamente com FGF-2 (MORBIDELLI et al., 1998). Nos ensaios enzimáticos, des-Arg⁹-BK atuou como um fraco ativador da atividade da elastase (7%) e trombina (15%).

O presente trabalho também permitiu um estudo sobre a especificidade primária da bothropasina e da BPA para a hidrólise de substratos proteicos. A partir de estudos de identificação proteômica de especificidade local de clivagem de protease (PICS), considerada uma abordagem proteômica recente para o mapeamento fácil de preferências dos subsítios S e S' de proteases, simultaneamente, pôde-se observar os sítios de clivagem entre ligações peptídicas preferenciais da bothropasina, que correspondem às posições XXGS ↓ LLVL (PAES LEME et al., 2011). O resíduo de Leu na posição P1' do substrato parece direcionar a hidrólise e indica que o subsítio S1' apresenta maior especificidade para a escolha do substrato quando comparado ao sítio catalítico S1. Nossos resultados indicam que a bothropasina é capaz de clivar substratos com uma ampla especificidade, mostrando que o sítio catalítico consegue acomodar resíduos positivos, hidrofóbicos e polares na posição P1. É interessante observar que, apesar da predita prioridade da bothropasina para a hidrólise de substratos contendo resíduos Leu na posição P1', nossos resultados revelaram que apenas a hidrólise do cininogênio seguiu esta preferência. Pudemos observar, nos resultados das digestões do fibrinogênio e fibronectina, que a bothropasina também hidrolisa de forma eficiente sequências que apresentam resíduos básicos, ácidos e polares nesta posição, além de resíduos hidrofóbicos com cadeias laterais de grande tamanho espacial, como Trp e Phe.

Resultados de Zelanis e colaboradores (2015), utilizando a técnica PICS revelaram o perfil das ligações peptídicas preferenciais de clivagem pela BPA. Comprovando que a BPA é uma tripsina-símile com especificidade primária para substrato contendo resíduos básicos na

posição P1. Neste estudo, a sequência AKPR ↓ KGLL foi identificada como sequência peptídica consenso. Os autores mostram que outras sequências peptídicas que se comportaram como substratos apresentaram, em menor ocorrência, os resíduos de Ala, Lys, Gln ou Thr em P1. BPA cliva as cadeias α e β do fibrinogênio, mas a cadeia γ por apresentar menos resíduos de arginina em comparação às outras duas cadeias, não é degradada pela BPA (ZELANIS et al., 2015). Nossas observações estão em acordo com os resultados que indicam que a BPA possui preferência para a hidrólise de substratos contendo resíduos positivos na posição P1. Porém, além desses resíduos, também encontramos hidrólises de substratos com os resíduos de Ala, Gln, Ser e Gly na posição P1 do substrato.

Em resumo, o presente trabalho mostra que a bothropasina e a BPA podem gerar os mesmos fragmentos a partir da hidrólise do fibrinogênio e da fibronectina, mesmo sendo proteases classificadas como metalo e serino protease, respectivamente. Alguns dos peptídeos sintéticos se comportaram como ativadores de trombina principalmente, e foram considerados ativos na angiogênese após estudos *in silico*. Em adição, também pudemos estender os conhecimentos sobre a especificidade primária destas duas proteases para a hidrólise de substratos. Pretendemos, em futuros estudos, avaliar a ação dos peptídeos sintéticos sobre a angiogênese, experimentalmente, dividida em ensaios de migração, proliferação e adesão de células endoteliais.

6 CONCLUSÕES

- As proteases, bothropasina e *Bothrops* protease A (BPA) purificadas a partir do veneno de *Bothrops jararaca*, hidrolisam as proteínas plasmáticas humanas, fibrinogênio e fibronectina. Sendo a bothropasina a protease que libera mais peptídeos dos dois substratos em comparação à BPA.
- Do fibrinogênio, apenas as cadeias α e β foram clivadas pela bothropasina e BPA, sendo identificadas oito sequências comuns entre estas digestões.
- Um dos fragmentos, proveniente da cadeia α do fibrinogênio, gerado pela bothropasina e BPA, SQLQKVPPEWK, é descrito como um peptídeo vasoativo.
- Quanto à fibronectina, foram observadas onze sequências idênticas liberadas pela bothropasina e BPA.
- O cininogênio de alta massa molecular é hidrolisado pela bothropasina, liberando a sequência análoga à bradicinina, des-Arg⁹-BK. Enquanto o cininogênio não demonstrou ser substrato para a BPA nas condições testadas.
- Os sítios de hidrólises encontrados no fibrinogênio e fibronectina mostram que a BPA apresenta maior seletividade (com preferência para a hidrólise de substratos com resíduos básicos na posição P1) quando comparada com a bothropasina.
- No total, foram observadas dezenove sequências liberadas em comum pela bothropasina e BPA, das quais dez foram escolhidas para a síntese química.
- Nossos ensaios iniciais demonstram que alguns dos peptídeos sintéticos podem ser promissores enquanto ativadores das peptidases estudadas e podem apresentar ações antiangiogênicas.

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature**, v. 8, p. 464-478, 2007.
- AI, S.; CHENG, X. W.; INOUE, A.; NAKAMURA, K. et al. Angiogenic activity of bFGF and VEGF suppressed by proteolytic cleavage by neutrophil elastase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 364, p. 395-401, 2007.
- ARTIMO P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K. et al. EsPASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, v.40, p.W597-W603, 2012.
- ASSAKURA, M. T.; SILVA, C. A.; MENTELE, R. et al. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 41, p. 217-227, 2003.
- BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. On the causation of the so-called “peripheral reflex secretion” of the pancreas. (Preliminary Communication). **Proceeding of the Royal Society of London**, v. 60, p. 352-353, 1902.
- BELEW, M.; GERDIN, B.; PORATH, J.; SALDEEN, T. Isolation of vasoactive peptides from human fibrin and fibrinogen degraded by plasmin. **Thrombosis Research**, v. 13, p. 983-994, 1978.
- BLAYA, C.; PRATI, C.; BONETI, C. et al. Use of new thrombin inhibitors in medical practice. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.71, p.163-167, 1998.
- BIOINFORMATIC SOLUTIONS INC. / PEAKS STUDIO. Versão 7. Waterloo, Canadá, 2014. Disponível em: <http://www1.bioinfor.com/peaks/products/studio.html>. Acesso em: Agosto de 2014.
- BIX, G.; IOZZO, R. V. Matrix revolutions: ‘tails’ of basement-membrane components with angiostatic functions. **TRENDS in Cell Biology**, v. 15, p. 52-60, 2005.
- BOOTLE-WILBRAHAM, C. A.; TAZZYMANN, S.; MARSHALL, J. M. et al. Fibrinogen E-fragment inhibits the migration and tubule formation of human dermal microvascular endothelial cells *in vitro*. **Cancer Research**, v.60, p. 4719-4724, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 284-254, 1976.

---

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

CAGLIANI, R.; FORNI, D.; RIVA.; et al. Evolutionary analysis of the contact system indicates that kininogen evolved adaptively in mammals and in human populations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 6, p. 1397-1408, 2013.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 6, p. 653-660, 2003.

CIDADE, D. A. P.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M. R. et al. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, p. 437-461, 2006.

COLMAN, R. W. Inhibitory and antiadhesive properties of human kininogens. **Immunopharmacology**, v. 32, p. 9-18, 1996.

COLMAN, R. W.; SCHMAIER, A. H. Contact system: A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. **Blood**, v. 90, p. 3819-3843, 1997.

COLMAN, R. W.; JAMESON, B. A.; LIN, Y. et al. Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. **Blood**, v. 95, p. 543-550, 2000.

COLOMBI, M.; ZOPPI, N.; DE PETRO, G. et al. Matrix assembly induction and cell migration and invasion inhibition by a 13-amino acid fibronectin peptide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 14346-14355, 2003.

COUGHLIN, S. R.; VU, T. K. H.; HUNG, D. T.; WHWATON, V.I. Characterization of a functional thrombin receptor. Issues and opportunities. **Journal of Clinical Investigation**. v. 89, p. 351-353, 1992.

DELA CADENA, R. A.; COLMAN, R. W. The sequence HGLGHEQGHGLGHH in the light chain of high molecular weight kininogen serves as a primary structural feature for zinc-dependent binding to an anionic surface. **Protein Science**, v. 1, p. 151-160, 1992.

EBLE, J. A. Matrix biology meets toxinology. **Matrix Biology**, v. 29, p. 239-247, 2010.

ERITHACUS SOFTWARE LIMITED / **GraFit**. Versão 5.0.6. Surrey, Reino Unido, 2010. Disponível em <http://www.erithacus.com/grafit>. Acesso em: Junho de 2014.

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

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

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, p. 403-420, 2005.

GAO, X.; GROVES, M. J. Fibronectin-binding peptides. Isolation and characterization of two unique fibronectin-binding peptides from gelatin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 275-284, 1998.

GARCIA-TOUCHARD, A.; HENRY, T. D.; SANGIORGI, G. et al. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 6, p.1119-1127, 2005.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. (In) John M. Walker (ed): **The proteomics protocols handbook**, Human Press, pp. 571-607, 2005.

GATELY, S.; TWARDOWSKI, P.; STACK, M. S. et al. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. **Cancer Research**, v. 56, p. 4887-4990, 1996.

GOMES, I.; DALE, C. S.; CASTEN, K. et al. Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules. **The AAPS Journal**, v. 12, p. 658-669, 2010.

GONÇALVES-MACHADO, L.; PLA, D.; SANZ, L. et al. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of Proteomics**, v. 135, p. 73-89, 2016.

GUO, Y.; WANG, S.; COLMAN, R. W. Kininostatin as an antiangiogenic inhibitor: what we know and what we do not know. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 1931-1940, 2002.

HARKER L. A.; HANSON, S. R.; RUNGE, M. S. Thrombin hypothesis of thrombus generation and vascular lesion formation. **The American Journal of Cardiology**, v. 75, p.12B-17B, 1995.

HENRIQUES, O. B.; LAVRAS, A. A. C.; FICHMAN, M. et al. The protelolytic activity of the venom of *Bothrops jararaca*. **The Biochemical Journal**, v. 68, p. 597-605, 1958.

HILSER, V. J. An ensemble view of allostery. **Science**, v. 327, 653-654, 2010.

HO, P. L.; SERRANO, S. M. T.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, p. 879-885, 2002.

HORTIN, G. L.; TRIMPE, B. L. Allosteric changes in thrombins's activity produced by peptides corresponding to segments of natural inhibitors and substrates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 6866-6871, 1991.

HUHN, A. J.; PARSONAGE, D.; HORITA, D. A. et al. The high-molecular-weight kininogen domain 5 is an intrinsically unstructured protein and its interaction with ferritin is metal mediated. **Protein Science**, v. 23, p. 1013- 1022, 2014.

HUMPHRIES, M. J.; OLDEN, K.; YAMADA, K. M. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. **Science**, v. 233, p. 467-470, 1986.

HUMPHRIES, M. J.; AKIYAMA, S. K.; KOMORIYA, A. et al. Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell type –specific adhesion. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, p. 2637-2647. 1986.

ISHIGURO, H.; HIGASHIYAMA, S.; OHKUBO, I.; SASAKI, M. Mapping of functional domains of human high molecular weight and low molecular weight kininogens using murine monoclonal antibodies. **Biochemistry**, v.26, p. 7021-7029, 1987.

JANOFF, A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 132, p. 417–33, 1985.

JENNEWEIN, C.; TRAN, N.; PAULUS, P. et al. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. **Molecular Medicine**, v. 17, p. 568-573, 2011.

JORPES, J. E.; MUTT, V. Secretin, cholecystokinin, pancreozymin ad gastrin. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**, (Jorpes, J . Erik, Mutt, Viktor eds. v. 34, p. 1-179, 1973.

KAMIGUTI, A. S.; SLUPSKY, J. R.; ZUZEL, M. et al. Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 72, p.244-249, 1994.

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

KOMORIYA, A.; GREEN, L. J.; MERVIC, M. et al. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 15, p. 15075-15079, 1991.

KRAJEWSKA, E.; LEWIS, C. E.; CHEN, Y-Y. et al. A novel fragment derived from the β chain of human fibrinogen, β 43-63, is a potent inhibitor of active endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. **British Journal of Cancer**, v. 102, p. 594-601, 2010.

KRENZLIN, H.; LORENZ, V.; DANCKWARDT, KEMPSKI, O.; ALESSANDRI, B. The importance of thrombin in cerebral injury and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, 1-21, 2016.

KRISHNAMOORTHY, A.; AJAY, A. K.; HOFFMANN, D. et al. Fibrinogen B β 15-42 peptide protects against kidney ischemia/reperfusion injury. **Blood**, v. 118, p. 1934-1942, 2011.

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

LAGENTE, V.; MARTIN-CHOULY, C.; BOICHOT, E. et al. Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl, p. 131–6, 2005.

LECHTENBERG, B. C.; FREUND, S. M. V.; HUNTINGTON, J. A. An ensemble view of thrombin allostery. **Biological Chemistry**, v 393, p. 889-898, 2012.

LIVANT, D. L.; BRABEC, R. K.; KURACHI, K. et al. The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 1537-1545, 2000.

MANDELBAUM, F. R.; HENRIQUES, O. B. Purification and properties of *Bothrops* protease A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 104, p. 369-374, 1964.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon**, v. 20, p. 955-972, 1982.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, p. 304-312, 2006.

MONACO, S.; GIOIA, M.; RODRIGUEZ, J. et al. Modulation of the proteolytic activity of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A) on fibrinogen. **Biochemical Journal**, v. 402, p. 503-13, 2007.

MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J. P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. **Journal of Molecular Biology**. v.12, p. 88-118, 1965.

MORBIDELLI, L.; PARENTI, A.; GIOVANNELLI, L. et al. B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 1286-1292, 1998.

MOSESSON, M. W.; AMRANI, D. L. The structure and biologic activities of plasma fibronectin. **Blood**, v. 56, p. 145-159, 1980.

MOSESSON, M. W.; SIEBENLIST, K. R.; MEH, D. A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 936, p. 11-30, 2001.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BALDO, C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 60, p. 280-289, 2012.

MOYANO, J. V.; CARNEMOLLA, B.; DOMÍNGUEZ-JIMÉNEZ, C. et al. Fibronectin type III5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$ integrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 24832-24836, 1997.

MUNDEL, T. M.; KALLURI, R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. **Microvascular Research**, v. 74, p. 85-89, 2007.

MUNIZ, J. R. C.; AMBROSIO, A. L. B.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. et al. The Three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloproteinase subgroups. **Toxicon**, v.52, p. 807-816, 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, U.S. Nacional Libray of Medicine. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.gov>.

NYBERG, P.; XIE, L.; KALLURI, R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. **Cancer Research**, v. 65, p. 3927-3979, 2005.

OLIVEIRA, A. K.; PAES LEME, A. F.; ASSAKURA, M. T. et al. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine- rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 53, p. 797-801, 2009.

OLIVEIRA, A. K.; PAES LEME, A. F.; ASEGA, A. F. et al. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 104, p. 485-497, 2010.

O'REILLY, M. S.; BOEHM, T.; SHING, Y. et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, p. 277-285, 1997.

PAES LEME, A. F.; PREZOTO, B. C.; YAMASHIRO, E. T. et al. *Bothrops* protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, p. 1363-1372, 2008.

PAES LEME, A. F.; ESCALANTE, T.; PEREIRA, J. G. C. et al. W. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 401-410, 2011.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3861-3863, 2002.

RAMAPRASAD, A. S. E.; SINGH, S.; GAJENDRA, P. S. R.; VENKATESAN, S. AntiAngioPred: A server for prediction of anti-angiogenic peptides. **PLoS One**, v. 9, p. 1-13, 2015.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J.; BATEMAN, A. *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 343-350, 2012.

RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 503-509, 2014.

RAWLINGS, N.D.; SALVESEN, G. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Elsevier, 3 ed., p. 993, 2013.

RIBATTI, D. Endogenous inhibitors of angiogenesis. A historical review. **Leukemia Research**, v. 33, p. 638-644, 2009.

RIOLI, V.; GOZZO, F.C.; HEIMANN, A.S. et al. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 8547-8555, 2003.

ROSCA, E. V.; KOSHIMAKI, J. E.; RIVERA, C. G. et al. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 1101-1116, 2011.

RUHENSTROTH-BAUER, G.; SCHERER, R.; HORNBERGER, M.; TONGENDORFF, G. Demonstration of antiinflammatory activity of fibrinogen and fibrinopeptides in rats. **Inflammation**, v. 5, p. 343-351, 1981.

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

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

SERRANO, S. M. T.; OLIVEIRA, A. K.; MENEZES, M. C.; ZELANIS, A. The proteinase-rich proteome of *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Toxicology: Toxin Review**, v. 33, p. 169-184, 2014.

SIGMA-ALDRICH. Life Science, BioFiles 3.8 Attachment and matrix factors, v. 3, n.8, 2008. Disponível em (https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/flashapps/biofiles-movie/pdf/biofiles_issue3.8.pdf)

SINGH, T. M.; KADOWAKI, M. H.; GLAGOV, S.; ZARINS, C. K. Role of fibrinopeptide B in early atherosclerotic lesion formation. **American Journal of Surgery**, v. 160, p. 156-159, 1990.

SORENSEN, I.; RONG, S.; SUSNIK, N. et al. B β 15-42 attenuates the effect of ischemia-reperfusion in renal transplantation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, p. 1887- 1896, 2011.

STAPOR, P.; WANG, X.; GOVEIA, J.; MOENS, S.; CARMELIET, P. Angiogenesis revisited – role and therapeutic potential of targeting endothelial metabolism. **Journal of Cell Science**, v. 127, p. 4331-4341, 2014.

STATON, C. A.; BROWN, N. J.; RODGERS, G. R. et al. Alphastatin, a 24–amino acid fragment of human fibrinogen, is a potent new inhibitor of activated endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. **Blood**, v. 103, p. 601-606, 2004.

TSAI, C.; DEL SOL, A.; NUSSINOV, R. Allostery: Absence of a change in shape does not imply that allostery is not a play. **Journal of Molecular Biology**, v. 378, p. 1-11, 2008.

TSOPANOGLIOU, N. E.; MARAGOUidakis, M. E. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 1, p. 63-69, 2004.

UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE **UniProt**. Disponível em <<http://www.uniprot.org>>. Acesso em agosto de 2014.

VON NUSSBAUM, F.; LI, V. M. Neutrophil elastase inhibitors for the treatment of (cardio) pulmonary diseases: Into clinical testing with pre-adaptive pharmacophores. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.25, 4370-4381, 2015.

VROMAN, L.; ADAMS, A. L.; FISCHER, G.C.; MUNOZ, P.C. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. **Blood**, v. 55, p. 156-159, 1980.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 4, p. 247-299, 2005.

WIELAND, T.; BODANSZKY, M. Peptide hormones: **The world of peptides: A brief history of peptide chemistry**. In: WIELAND, T.; BODANSZKY, M. (Eds.). 1991, p. 136-161.

YAMASHIRO, E. T. ***Bothrops* protease (BPA): uma nova ferramenta para o planejamento de agentes terapêuticos em trombose e hemostasia**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; ROCHA, M. M. T. et al. Analysis of the ontogenetic variation proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2278-2291, 2010.

ZELANIS, A.; HUESGEN, P. F.; OLIVEIRA, A. K. et al. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **Journal of Proteomics**, v. 113, p. 260-267, 2015.

APÊNDICE A - Fragmentos peptídicos derivados do fibrinogênio sequenciados por espectrometria de massas.

Peptídeo	-10lgP	Massa	ppm	m/z	RT	Espectro	Acesso
ADSGEGDFLAEGGGVR	200.00	15.356.852	0.4	7.688.502	20.43	CTRL	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	200.00	15.356.852	-0.3	7.688.497	20.81	Bothro	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	200.00	15.356.852	-0.2	7.688.497	21.09	Bothro	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	200.00	15.356.852	-0.3	7.688.497	19.92	BPA	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	200.00	15.356.852	0.1	7.688.500	20.36	BPA	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	200.00	15.356.852	0.1	7.688.499	20.62	BPA	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	177.30	15.356.852	5.0	7.688.537	15.25	Bothro	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	158.33	15.356.852	-0.5	7.688.495	20.55	Bothro	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	157.01	15.356.852	0.0	7.688.499	20.29	Bothro	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	156.18	15.356.852	-1.8	7.688.484	19.66	BPA	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	80.75	15.356.852	-0.8	5.129.019	19.75	BPA	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVR	67.31	15.356.852	-2.6	7.688.479	20.19	BPA	P02671 FIBA
AGHWTSESSVSGSTGQ	200.00	15.766.754	-0.4	7.893.447	19.65	Bothro	P02671 FIBA
AGHWTSESSVSGSTGQ	160.34	15.766.754	-0.2	7.893.448	19.33	Bothro	P02671 FIBA
AGHWTSESSVSGSTGQ	144.77	15.766.754	-0.5	7.893.446	19.06	Bothro	P02671 FIBA
DSGEGDFLAEGGGVR	200.00	14.646.481	-0.8	7.333.307	20.67	Bothro	P02671 FIBA
DSGEGDFLAEGGGVR	158.87	14.646.481	0.4	7.333.316	19.77	BPA	P02671 FIBA
DSGEGDFLAEGGGVR	155.46	14.646.481	0.6	7.333.317	20.41	Bothro	P02671 FIBA
MDLGTLSGIGTLDGFR	200.00	16.678.188	-0.1	8.349.166	21.49	Bothro	P02671 FIBA
MDLGTLSGIGTLDGFR	200.00	16.518.240	-0.5	8.269.188	21.77	Bothro	P02671 FIBA
FFDTASTGKTFPGFFSP	200.00	18.528.672	-0.3	9.274.406	21.79	Bothro	P02671 FIBA
WNSGSSGPGSTGNRNPSSGT GGTAT	200.00	23.500.171	-0.7	11.760.150	19.39	Bothro	P02671 FIBA
WNSGSSGPGSTGNRNPSSGT GGTAT	53.98	23.500.171	0.4	7.843.466	19.37	Bothro	P02671 FIBA
ATWKPGSSGPGSTGS	200.00	13.756.367	-0.3	6.888.254	19.69	Bothro	P02671 FIBA
TATWKPGSSGPGSTGS	200.00	14.766.844	-0.2	7.393.494	19.73	Bothro	P02671 FIBA
NPSSAGSWNSGSSGPGSTGNR	200.00	19.628.416	-0.3	9.824.278	18.46	BPA	P02671 FIBA
WTSESSVSGSTGQ	174.91	13.115.579	0.0	6.567.862	19.60	Bothro	P02671 FIBA
WTSESSVSGSTGQ	142.95	13.115.579	-0.2	6.567.861	18.51	Bothro	P02671 FIBA
FDTASTGKTFPGFFSP	166.79	17.057.987	-0.9	8.539.059	21.77	Bothro	P02671 FIBA
FDTASTGKTFPGFFSP	155.80	17.057.987	0.1	8.539.067	21.51	Bothro	P02671 FIBA
PGSTGTWNPSSER	156.80	14.316.378	0.3	7.168.264	19.13	BPA	P02671 FIBA
WKPGSSGPGSTGS	149.02	12.035.520	-0.1	6.027.832	19.54	Bothro	P02671 FIBA
WKPGSSGPGSTGS	133.60	12.035.520	-0.2	6.027.831	19.40	Bothro	P02671 FIBA
WKPGSSGPGSTGS	118.30	12.035.520	-0.2	6.027.831	19.13	Bothro	P02671 FIBA
WKPGSSGPGSTGS	115.62	12.035.520	-0.3	6.027.831	19.80	Bothro	P02671 FIBA
WKPGSSGPGSTGS	112.36	12.035.520	0.4	6.027.835	20.67	Bothro	P02671 FIBA

WKPGSSGPGSTGS	91.72	12.035.520	-0.4	6.027.830	20.40	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMRME	148.22	13.215.829	-0.2	6.617.986	20.68	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMRME	107.98	13.535.728	-0.4	6.777.934	19.81	Bothro	P02671 FIBA
FVSETESRGSESGIF	145.49	16.307.474	5.7	8.163.857	15.78	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQMRME	144.84	12.505.458	-0.5	6.262.798	20.48	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQMRME	132.00	12.505.458	5.6	6.262.837	15.46	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQMRME	90.98	12.985.305	0.0	6.502.725	18.15	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQMRME	72.46	12.825.356	-0.1	6.422.750	19.59	Bothro	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	143.97	13.387.295	-0.4	6.703.718	20.17	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	132.91	13.387.295	-0.7	6.703.716	20.68	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	132.52	13.387.295	-0.5	6.703.717	19.14	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	132.01	13.387.295	-0.1	6.703.719	19.91	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	130.67	13.387.295	0.6	6.703.724	20.43	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	112.95	13.387.295	-0.2	6.703.719	19.40	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	104.46	13.387.295	-0.5	6.703.717	20.20	Bothro	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	86.41	13.387.295	-0.4	6.703.718	19.66	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	76.75	13.387.295	0.0	4.472.504	19.93	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	76.26	13.387.295	-0.4	4.472.502	19.16	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	73.20	13.387.295	0.0	4.472.504	20.45	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	58.97	13.387.295	-0.3	4.472.503	20.19	BPA	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	55.19	13.387.295	0.2	4.472.505	20.19	Bothro	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWK	40.35	13.387.295	0.0	4.472.504	20.56	Bothro	P02671 FIBA
LSGIGTLDGFR	143.31	11.346.033	6.3	5.683.125	15.79	Bothro	P02671 FIBA
LSGIGTLDGFR	135.02	11.346.033	-0.5	5.683.087	21.12	Bothro	P02671 FIBA
LSGIGTLDGFR	126.69	11.346.033	0.0	5.683.089	21.40	Bothro	P02671 FIBA
LSGIGTLDGFR	123.44	11.346.033	-0.9	5.683.084	21.70	Bothro	P02671 FIBA
LSGIGTLDGFR	119.06	11.346.033	-0.9	5.683.084	20.86	Bothro	P02671 FIBA
LGTLSGIGTLDGFR	141.61	14.057.565	-0.5	7.038.852	21.46	Bothro	P02671 FIBA
LGTLSGIGTLDGFR	132.74	14.057.565	-1.1	7.038.848	21.21	Bothro	P02671 FIBA
FTSSTSYNRGDST	140.06	14.216.058	0.2	7.118.103	19.36	Bothro	P02671 FIBA
MDLGTLSGIGTLDG	139.83	13.486.544	-0.5	6.753.342	21.79	Bothro	P02671 FIBA
MDLGTLSGIGTLDG	99.60	13.646.493	6.5	6.833.364	16.24	Bothro	P02671 FIBA
GEGDFLAEGGGVR	137.52	12.625.891	1.2	6.323.026	19.78	BPA	P02671 FIBA
TWKPGSSGPGSTGS	136.01	13.045.996	-0.1	6.533.070	19.67	Bothro	P02671 FIBA
GIGTLDGFR	134.16	9.344.872	0.2	4.682.510	20.73	BPA	P02671 FIBA
GIGTLDGFR	123.13	9.344.872	0.6	4.682.512	20.06	BPA	P02671 FIBA
GIGTLDGFR	111.32	9.344.872	-0.3	4.682.507	19.80	BPA	P02671 FIBA
GIGTLDGFR	108.76	9.344.872	-0.1	4.682.508	20.68	Bothro	P02671 FIBA
GIGTLDGFR	103.74	9.344.872	2.5	4.682.520	15.74	CTRL	P02671 FIBA
GIGTLDGFR	102.53	9.344.872	-0.7	4.682.505	21.11	BPA	P02671 FIBA
GIGTLDGFR	74.29	9.344.872	4.7	4.682.531	15.72	Bothro	P02671 FIBA

GIGTLDGFR	62.99	9.344.872	4.7	4.682.531	15.33	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	133.44	10.774.948	0.0	5.397.546	19.38	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	117.76	10.774.948	0.0	5.397.546	19.11	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	115.11	10.774.948	0.1	5.397.547	19.99	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	114.60	10.774.948	-0.1	5.397.546	19.91	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	107.79	10.774.948	-0.1	5.397.546	19.64	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	96.66	10.774.948	0.0	5.397.546	20.19	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	86.13	10.774.948	-0.2	5.397.545	20.25	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	79.52	10.774.948	-0.1	5.397.546	19.53	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	79.09	10.774.948	-0.1	5.397.546	19.24	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	76.47	10.774.948	-0.1	5.397.546	19.79	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	75.28	10.774.948	-0.5	5.397.544	19.49	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	72.55	10.774.948	-0.4	5.397.545	20.24	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	117.59	10.614.998	-0.3	5.317.570	20.22	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	98.45	10.614.998	0.2	5.317.573	20.48	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	76.36	10.614.998	-0.9	5.317.567	20.75	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	74.59	10.614.998	-0.8	5.317.567	20.48	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	73.15	10.614.998	-0.4	5.317.570	19.56	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	70.91	10.614.998	-0.4	5.317.570	20.23	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	126.14	10.774.948	0.0	5.397.546	18.85	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	103.28	10.774.948	-0.2	5.397.545	19.73	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	65.31	10.774.948	-0.6	5.397.543	18.98	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	98.44	10.934.896	-0.2	5.477.520	17.88	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	98.25	10.934.896	-0.1	5.477.520	18.15	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	95.25	10.934.896	-0.1	5.477.520	19.34	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	93.86	10.934.896	0.1	5.477.521	17.62	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	93.10	10.934.896	0.0	5.477.521	18.58	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	92.03	10.934.896	-0.4	5.477.519	18.33	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	91.86	10.934.896	-0.1	5.477.520	19.09	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	88.52	10.934.896	0.1	5.477.521	18.84	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	86.90	10.934.896	0.0	5.477.521	17.35	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	83.43	10.934.896	0.0	5.477.521	19.46	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	79.70	10.934.896	0.0	5.477.521	19.60	Bothro	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	79.62	10.934.896	-1.3	5.477.514	19.04	BPA	P02671 FIBA
ALTDMPQMR	68.30	10.934.896	0.4	5.477.523	19.32	BPA	P02671 FIBA
SGIGTLDGFR	131.88	10.215.192	-1.0	5.117.664	20.72	BPA	P02671 FIBA
SGIGTLDGFR	130.77	10.215.192	0.7	5.117.672	20.03	BPA	P02671 FIBA
SGIGTLDGFR	118.53	10.215.192	6.3	5.117.701	15.77	Bothro	P02671 FIBA
WNSGSSGPGSTGNRNPSSG TGGTATWKPGSSGPGSTGS	123.93	35.355.583	0.6	11.795.275	19.89	Bothro	P02671 FIBA
WNSGSSGPGSTGNRNPSSG TGGTATWKPGSSGPGSTGS	117.14	35.355.583	-1.5	11.795.249	19.63	Bothro	P02671 FIBA

SYSKQFTSSTS	122.72	12.215.513	-0.7	6.117.825	19.63	Bothro	P02671 FIBA
SGEGDFLAEGGGVR	122.46	13.496.211	-0.1	6.758.177	20.36	Bothro	P02671 FIBA
TGKTFFPGFFSP	120.08	11.845.865	-0.3	5.933.004	21.42	Bothro	P02671 FIBA
<u>M</u> KPVPDLVPGNFK	118.83	14.567.748	0.4	7.293.950	20.44	BPA	P02671 FIBA
<u>M</u> KPVPDLVPGNFK	38.73	14.567.748	-0.7	4.865.985	20.65	BPA	P02671 FIBA
MKPVPDLVPGNFK	79.64	14.407.799	-1.9	7.213.959	20.72	BPA	P02671 FIBA
YSKQFTSSTS	117.57	11.345.193	-0.1	5.682.668	19.35	Bothro	P02671 FIBA
YSKQFTSSTS	93.47	11.345.193	0.1	5.682.670	19.61	Bothro	P02671 FIBA
SSSYSKQFTSSTS	117.04	13.956.154	-0.6	6.988.145	19.64	Bothro	P02671 FIBA
LTD <u>M</u> PQ <u>M</u> R	110.97	10.224.525	0.2	5.122.336	17.79	Bothro	P02671 FIBA
LTD <u>M</u> PQ <u>M</u> R	108.98	10.224.525	0.0	5.122.335	17.54	Bothro	P02671 FIBA
LTD <u>M</u> PQ <u>M</u> R	101.26	10.224.525	-0.1	5.122.335	16.52	Bothro	P02671 FIBA
LTD <u>M</u> PQ <u>M</u> R	99.39	10.224.525	0.2	5.122.336	16.78	Bothro	P02671 FIBA
LTD <u>M</u> PQ <u>M</u> R	99.13	10.224.525	-0.1	5.122.335	17.03	Bothro	P02671 FIBA
LTD <u>M</u> PQ <u>M</u> R	97.33	10.224.525	0.0	5.122.335	17.28	Bothro	P02671 FIBA
LTD <u>M</u> PQ <u>M</u> R	95.92	10.224.525	-0.3	5.122.334	18.30	Bothro	P02671 FIBA
LTD <u>M</u> PQ <u>M</u> R	90.97	10.224.525	0.1	5.122.336	18.05	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQ <u>M</u> R	99.19	10.064.576	0.0	5.042.361	19.53	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQ <u>M</u> R	82.84	10.064.576	-0.1	5.042.360	19.78	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQMR	88.28	9.904.626	-0.3	4.962.385	19.98	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQMR	84.64	9.904.626	0.2	4.962.387	20.24	Bothro	P02671 FIBA
LTDMPQMR	73.06	9.904.626	-0.1	4.962.386	20.30	Bothro	P02671 FIBA
SQLQKVPPEW	110.88	12.106.346	5.3	6.063.278	15.28	Bothro	P02671 FIBA
SQLQKVPPEW	81.61	12.106.346	5.8	6.063.281	15.78	Bothro	P02671 FIBA
FTSSTSYNRGDSTFESKSY	110.66	21.629.392	-0.2	7.219.869	20.09	Bothro	P02671 FIBA
ASTGKTFFPGFFSP	109.27	13.426.558	0.0	6.723.351	21.38	Bothro	P02671 FIBA
SETESRGSESGIFTN	107.58	15.997.012	-0.2	8.008.577	19.22	BPA	P02671 FIBA
SSSYSKQFTS	104.42	11.205.037	0.1	5.612.592	18.81	BPA	P02671 FIBA
LGTLSGIGTLDG	104.38	11.025.870	6.0	5.523.041	16.10	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	102.29	7.574.082	-1.2	3.797.109	17.53	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	102.05	7.574.082	-0.9	3.797.110	18.54	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	101.88	7.574.082	-0.8	3.797.111	19.05	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	100.96	7.574.082	-0.8	3.797.111	18.29	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	98.65	7.574.082	0.0	3.797.114	19.18	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	95.39	7.574.082	-0.9	3.797.110	17.78	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	94.33	7.574.082	0.0	3.797.114	19.44	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	92.22	7.574.082	-0.9	3.797.110	18.79	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	91.91	7.574.082	-0.9	3.797.110	19.57	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	88.99	7.574.082	-1.2	3.797.109	17.27	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	88.18	7.574.082	-0.8	3.797.111	18.03	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	87.38	7.574.082	-1.0	3.797.110	19.30	Bothro	P02671 FIBA

LAEGGGVR	83.41	7.574.082	-0.4	3.797.112	18.92	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	82.88	7.574.082	0.5	3.797.116	20.24	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	82.02	7.574.082	0.1	3.797.114	19.91	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	81.71	7.574.082	-0.4	3.797.112	19.70	Bothro	P02671 FIBA
LAEGGGVR	74.37	7.574.082	0.2	3.797.115	19.97	Bothro	P02671 FIBA
FVSETESRGSESGIFTNTKES	100.96	22.910.552	-4.6	7.646.888	20.31	Bothro	P02671 FIBA
YSKQFTSS	97.42	9.464.396	0.0	4.742.271	19.41	Bothro	P02671 FIBA
STGKTFPGFFSP	97.41	12.716.187	0.1	6.368.167	21.45	Bothro	P02671 FIBA
STGKTFPGFFSP	57.28	12.716.187	5.2	6.368.199	16.04	Bothro	P02671 FIBA
LVTSGDKEL	96.39	10.886.077	-0.6	5.453.108	20.08	Bothro	P02671 FIBA
LVTSGDKEL	90.76	10.886.077	0.0	5.453.111	20.33	Bothro	P02671 FIBA
LVTSGDKEL	94.64	9.755.236	-0.3	4.887.689	19.89	Bothro	P02671 FIBA
LVTSGDKEL	83.63	9.755.236	0.0	4.887.691	20.15	Bothro	P02671 FIBA
LVTSGDKEL	35.94	9.755.236	-0.3	3.261.817	19.70	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	93.92	9.044.766	-0.2	4.532.455	20.09	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	93.54	9.044.766	-0.7	4.532.453	21.93	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	91.97	9.044.766	-0.1	4.532.455	20.15	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	91.37	9.044.766	-0.3	4.532.455	20.94	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	90.31	9.044.766	0.0	4.532.456	19.89	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	88.32	9.044.766	-0.2	4.532.455	20.35	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	86.36	9.044.766	0.2	4.532.457	20.40	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	86.23	9.044.766	0.0	4.532.456	20.66	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	85.75	9.044.766	2.5	4.532.467	20.95	Bothro	P02671 FIBA
FLAEGGGVR	60.20	9.044.766	-0.8	4.532.452	21.67	Bothro	P02671 FIBA
FFDTASTGK	89.51	9.724.552	-0.3	4.872.347	20.17	Bothro	P02671 FIBA
FFDTASTGK	81.91	9.724.552	0.1	4.872.349	20.14	Bothro	P02671 FIBA
WNSGSSGTGSTGNQNPSPR PGSTGTWNPSSSERGS	89.06	35.045.273	-0.9	11.691.820	19.60	Bothro	P02671 FIBA
WNSGSSGTGSTGNQNPSPR PGSTGTWNPSSSERGS	66.47	35.045.273	-0.5	11.691.825	19.86	Bothro	P02671 FIBA
LQKVPPEWKA	88.51	11.946.760	-0.5	5.983.450	20.60	Bothro	P02671 FIBA
LQKVPPEWKA	77.38	11.946.760	0.0	5.983.453	20.34	Bothro	P02671 FIBA
LQKVPPEWKA	68.39	11.946.760	-0.2	3.992.325	20.73	Bothro	P02671 FIBA
IGTLDGFR	86.56	8.774.658	0.0	4.397.402	20.81	Bothro	P02671 FIBA
IGTLDGFR	79.09	8.774.658	5.0	4.397.424	15.25	Bothro	P02671 FIBA
SSSYSKQFTSSTSYNRGDSTFES	85.68	25.520.940	-0.2	8.517.051	19.97	CTRL	P02671 FIBA
LVTSGDKELR	81.44	12.447.089	-1.7	6.233.607	20.29	Bothro	P02671 FIBA
MDLGTLSGIGT	81.20	10.635.220	-0.6	5.327.679	21.56	Bothro	P02671 FIBA
MDLGTLSGIGT	80.66	10.635.220	6.2	5.327.715	16.33	Bothro	P02671 FIBA
MDLGTLSGIGT	65.02	10.795.168	5.3	5.407.686	15.91	Bothro	P02671 FIBA
YSKQFTS	78.60	8.594.076	0.0	4.307.111	19.56	Bothro	P02671 FIBA
HRHPDEAAF	77.32	10.784.944	-0.7	5.402.541	20.46	Bothro	P02671 FIBA

LQKVPPEWK	76.63	11.236.389	0.3	3.755.537	20.37	Bothro	P02671 FIBA
LQKVPPEWK	71.80	11.236.389	0.8	5.628.272	20.24	Bothro	P02671 FIBA
LQKVPPEWK	69.36	11.236.389	0.5	3.755.538	20.64	Bothro	P02671 FIBA
LQKVPPEWK	65.66	11.236.389	-0.9	5.628.262	20.51	Bothro	P02671 FIBA
LQKVPPEWK	64.55	11.236.389	0.3	3.755.537	20.11	Bothro	P02671 FIBA
FTSSTSYNRGDSTFESKS	74.87	19.998.759	-0.4	6.676.323	19.97	Bothro	P02671 FIBA
FTSSTSYNRGDSTFESKS	56.83	19.998.759	0.1	6.676.326	20.22	Bothro	P02671 FIBA
FTSSTSYNRGDSTFESKS	39.47	19.998.759	-0.6	6.676.321	20.75	Bothro	P02671 FIBA
SETESRGSESGIF	67.82	13.846.106	0.3	6.933.128	19.64	BPA	P02671 FIBA
LDGFR	66.20	6.063.125	0.6	3.041.637	20.27	Bothro	P02671 FIBA
LDGFR	56.78	6.063.125	0.6	3.041.637	20.31	Bothro	P02671 FIBA
LDGFR	53.17	6.063.125	-0.4	3.041.634	20.80	Bothro	P02671 FIBA
LDGFR	48.93	6.063.125	0.0	3.041.635	21.15	Bothro	P02671 FIBA
LDGFR	48.16	6.063.125	0.2	3.041.636	20.53	Bothro	P02671 FIBA
LDGFR	44.53	6.063.125	-0.1	3.041.635	20.01	Bothro	P02671 FIBA
LDGFR	40.10	6.063.125	0.9	3.041.638	20.57	Bothro	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVRGPR	59.60	18.458.605	-0.5	6.162.938	20.15	CTRL	P02671 FIBA
ADSGEGDFLAEGGGVRGPR	42.94	18.458.605	0.6	6.162.945	20.21	BPA	P02671 FIBA
IFTNTKES	59.40	9.384.709	0.2	4.702.428	19.63	Bothro	P02671 FIBA
FEEVSGNVSP	58.64	10.634.822	-0.1	5.327.483	20.33	Bothro	P02671 FIBA
FEEVSGNVSP	57.44	10.634.822	0.2	5.327.485	19.83	Bothro	P02671 FIBA
SQLQKVPPEWKA	56.52	14.097.666	0.1	4.709.295	20.30	Bothro	P02671 FIBA
MELERPPGNEITR	52.70	15.007.355	0.6	5.012.527	19.82	BPA	P02671 FIBA
MELERPPGNEITR	52.26	15.007.355	-0.6	5.012.521	20.08	BPA	P02671 FIBA
MELERPPGNEITR	42.04	15.007.355	-0.6	5.012.521	20.35	BPA	P02671 FIBA
MELERPPGNEITR	76.55	15.167.303	-0.1	5.065.840	19.70	BPA	P02671 FIBA
MELERPPGNEITR	64.31	15.167.303	-0.4	5.065.838	19.96	BPA	P02671 FIBA
MELERPPGNEITR	53.96	15.167.303	-0.2	5.065.840	19.44	BPA	P02671 FIBA
MDLGTLSG	52.39	8.083.636	1.2	8.093.719	20.42	Bothro	P02671 FIBA
AGHWTSSES	51.47	8.733.617	0.0	4.376.881	19.54	Bothro	P02671 FIBA
WKPGSSGPGS	49.85	9.584.508	0.4	4.802.328	19.61	Bothro	P02671 FIBA
KVPDLVPGNF	41.99	11.816.444	3.8	5.918.317	15.86	CTRL	P02671 FIBA
Cadeia beta do fibrinogênio							
SLRPAPPPISGGGYR	200.00	15.238.208	0.1	7.629.178	20.18	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	147.21	15.238.208	-0.1	7.629.176	20.43	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	143.04	15.238.208	-0.3	7.629.175	19.92	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	142.84	15.238.208	-0.1	7.629.176	20.69	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	140.04	15.238.208	-0.8	7.629.171	21.24	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	132.91	15.238.208	-0.7	7.629.171	20.96	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	100.36	15.238.208	0.2	5.089.477	20.63	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	98.65	15.238.208	-0.1	5.089.475	20.90	Bothro	P02675 FIBB

SLRPAPPPISGGGYR	94.47	15.238.208	-0.1	5.089.475	19.84	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	91.81	15.238.208	0.3	5.089.477	20.37	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	88.25	15.238.208	-0.3	5.089.474	21.16	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	83.34	15.238.208	0.1	5.089.476	20.10	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGYR	80.92	15.238.208	-0.1	5.089.475	21.46	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	155.61	11.676.036	-1.8	5.848.080	20.69	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	146.27	11.676.036	-0.5	5.848.088	20.16	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	146.14	11.676.036	0.1	5.848.091	20.18	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	144.76	11.676.036	0.0	5.848.091	19.91	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	143.00	11.676.036	0.3	5.848.093	19.38	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	139.05	11.676.036	0.2	5.848.092	19.64	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	135.30	11.676.036	0.5	5.848.094	20.43	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	129.48	11.676.036	0.0	5.848.091	20.12	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	126.97	11.676.036	0.2	5.848.092	20.42	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	124.88	11.676.036	-0.4	5.848.088	19.70	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	116.28	11.676.036	0.4	5.848.093	19.12	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	110.59	11.676.036	-0.2	5.848.090	19.96	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	107.52	11.676.036	0.0	5.848.091	19.86	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	91.41	11.676.036	-1.0	5.848.085	20.68	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	87.51	11.676.036	0.0	5.848.091	20.22	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	82.06	11.676.036	-0.4	5.848.088	19.10	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	76.86	11.676.036	0.0	5.848.091	20.90	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	69.66	11.676.036	0.3	5.848.093	19.92	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	62.21	11.676.036	0.1	5.848.091	20.38	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	58.90	11.676.036	0.4	5.848.093	21.64	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	54.90	11.676.036	0.1	5.848.091	19.45	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	46.56	11.676.036	0.4	5.848.093	20.64	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	46.22	11.676.036	0.3	5.848.093	21.09	BPA	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	45.76	11.676.036	0.1	5.848.091	20.49	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGYR	41.93	11.676.036	-0.2	5.848.090	19.62	BPA	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGGY	148.08	13.677.197	-0.4	6.848.669	20.20	Bothro	P02675 FIBB
VNDNEEGFFSAR	147.52	13.836.055	-0.8	6.928.094	20.67	BPA	P02675 FIBB
VNDNEEGFFSAR	131.55	13.836.055	-0.1	6.928.099	19.90	BPA	P02675 FIBB
VNDNEEGFFSAR	115.69	13.836.055	1.3	6.928.109	20.57	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGG	127.57	12.046.564	-0.1	6.033.354	20.07	Bothro	P02675 FIBB
SLRPAPPPISGGG	88.20	12.046.564	-0.4	6.033.352	19.80	Bothro	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	125.49	14.367.888	-0.8	7.194.011	20.02	Bothro	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	114.29	14.367.888	-0.2	4.799.368	20.07	BPA	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	101.33	14.367.888	-0.5	7.194.013	20.29	Bothro	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	101.29	14.367.888	-0.2	4.799.368	19.98	Bothro	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	95.94	14.367.888	0.3	4.799.370	20.24	Bothro	P02675 FIBB

LRPAPPPISGGGYR	93.39	14.367.888	-0.7	4.799.366	20.33	BPA	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	85.82	14.367.888	-0.1	4.799.368	19.81	BPA	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	83.02	14.367.888	-0.6	4.799.366	20.76	Bothro	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	81.20	14.367.888	-1.1	4.799.364	20.49	Bothro	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGGYR	78.37	14.367.888	-0.6	4.799.366	21.01	Bothro	P02675 FIBB
EEAPSLRPAPPPISGGGYR	117.39	19.499.958	-0.1	6.510.058	20.03	BPA	P02675 FIBB
EEAPSLRPAPPPISGGGYR	107.32	19.499.958	-0.4	6.510.056	20.28	BPA	P02675 FIBB
EEAPSLRPAPPPISGGGYR	90.75	19.499.958	0.3	6.510.061	20.15	Bothro	P02675 FIBB
EEAPSLRPAPPPISGGGYR	61.09	19.499.958	-0.1	6.510.058	19.46	BPA	P02675 FIBB
FTVQNEANK	97.77	10.495.142	-0.8	5.257.639	19.59	Bothro	P02675 FIBB
LRPAPPPISGGG	94.94	11.176.244	-0.4	5.598.193	20.00	Bothro	P02675 FIBB
PAPPPISGGGY	91.88	10.115.025	0.1	5.067.586	19.75	BPA	P02675 FIBB
LIQPDSSVKP	66.49	10.825.972	0.0	5.423.058	20.01	Bothro	P02675 FIBB
VNDNEEGFF	57.63	10.694.352	0.9	5.357.253	20.76	BPA	P02675 FIBB
YQISVNK	55.76	8.504.548	-0.3	4.262.346	19.88	Bothro	P02675 FIBB
VNDNEEGFFSA	50.74	12.275.044	5.5	6.147.629	16.05	Bothro	P02675 FIBB

M = oxidação da metionina

APÊNDICE B - Fragmentos peptídicos derivados da fibronectina sequenciados por espectrometria de massas.

Peptideo	-10lgP	Massa	ppm	m/z	RT	Espectro	Acesso
VQTTSSSGSPFTDVRAA	200.00	16.798.114	0.5	8.409.134	19.63	Bothro	P02751 FN
VQTTSSSGSPFTDVRAA	125.92	16.798.114	5.3	8.409.174	14.78	Bothro	P02751 FN
GIQLPGTSGQQPSVGQQ	200.00	16.808.431	-0.2	8.414.287	19.93	Bothro	P02751 FN
GIQLPGTSGQQPSVGQQ	114.47	16.808.431	0.3	8.414.291	15.78	Bothro	P02751 FN
LEANPDTGVLTVSWER	200.00	17.858.896	-1.0	8.939.512	21.06	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	151.76	16.238.217	0.7	8.129.186	15.64	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	140.63	16.238.217	0.1	8.129.182	20.01	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	137.85	16.238.217	0.2	8.129.183	19.75	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	116.02	16.238.217	4.8	8.129.220	15.37	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	108.45	16.238.217	0.6	8.129.186	20.34	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	104.48	16.238.217	0.2	8.129.183	20.82	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	101.32	16.238.217	0.1	8.129.182	21.48	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	50.25	16.238.217	-0.2	8.129.180	21.84	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	47.59	16.238.217	0.7	8.129.187	22.26	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQQ	35.46	16.238.217	5.6	5.422.842	15.56	Bothro	P02751 FN
ATLTGLTRGATYN	144.11	13.376.940	-0.4	6.698.540	20.05	Bothro	P02751 FN
TTSSSGSPFTDVRAA	131.98	14.526.844	-0.5	7.273.491	19.55	Bothro	P02751 FN
TTSSSGSPFTDVRAA	85.64	14.526.844	5.4	7.273.534	14.66	Bothro	P02751 FN
VPGTSTSATLTGLTR	128.47	14.607.834	-1.4	7.313.980	19.57	BPA	P02751 FN
VPGTSTSATLTGLTR	104.31	14.607.834	0.2	7.313.992	20.01	BPA	P02751 FN
VPGTSTSATLTGLTR	95.43	14.607.834	-0.8	7.313.984	19.75	BPA	P02751 FN
TSSSGSPFTDVRAA	124.21	13.516.367	-0.4	6.768.254	19.47	Bothro	P02751 FN
TSSSGSPFTDVRAA	116.83	13.516.367	5.3	6.768.292	14.62	Bothro	P02751 FN
TSSSGSPFTDVRAA	100.87	13.516.367	5.4	6.768.293	14.65	CTRL	P02751 FN
SSGSGPFTDVRAA	123.84	12.505.891	1.7	6.263.029	19.61	Bothro	P02751 FN
SSGSGPFTDVRAA	82.20	12.505.891	1.8	6.263.030	19.42	BPA	P02751 FN
SSGSGPFTDVRAA	80.27	12.505.891	-1.4	6.263.010	19.66	BPA	P02751 FN
SSGSGPFTDVRAA	67.88	12.505.891	5.5	6.263.053	14.59	CTRL	P02751 FN
SSGSGPFTDVRAA	58.68	12.505.891	-3.6	6.262.996	14.58	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQPSVGQ	123.37	14.957.631	0.1	7.488.889	15.66	Bothro	P02751 FN
LTGLTRGATYN	122.36	11.656.091	0.4	5.838.121	19.43	Bothro	P02751 FN
TLTGLTRGATYN	120.39	12.666.569	-0.8	6.343.352	19.87	Bothro	P02751 FN
VVSVYAQNPSGESQP	119.88	15.607.419	5.3	7.813.824	14.60	Bothro	P02751 FN
VVSVYAQNPSGESQP	116.52	15.607.419	-0.2	7.813.781	19.36	Bothro	P02751 FN
SATLTGLTRGATYN	118.46	14.247.260	-0.2	7.133.701	20.15	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	116.24	11.645.386	-0.3	5.832.764	20.95	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	115.68	11.645.386	0.9	5.832.771	19.81	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	113.03	11.645.386	-0.5	5.832.762	20.69	Bothro	P02751 FN

MIFEEHGFR	112.16	11.645.386	0.3	5.832.767	20.32	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	98.80	11.645.386	0.5	5.832.769	20.22	BPA	P02751 FN
MIFEEHGFR	98.13	11.645.386	5.0	5.832.795	14.92	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	85.10	11.645.386	1.2	5.832.773	20.70	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	78.52	11.645.386	6.3	5.832.802	15.19	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	74.69	11.645.386	-0.4	5.832.763	21.39	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	70.85	11.645.386	6.0	5.832.800	15.45	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	69.75	11.645.386	-0.3	5.832.764	15.73	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	115.20	11.805.334	-0.6	5.912.736	21.84	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	109.03	11.805.334	0.1	5.912.740	19.70	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	106.62	11.805.334	-0.2	5.912.739	19.44	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	106.10	11.805.334	0.2	5.912.741	22.11	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	103.86	11.805.334	-0.6	5.912.736	20.67	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	102.16	11.805.334	0.8	5.912.745	20.26	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	99.98	11.805.334	-0.2	5.912.739	22.62	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	99.35	11.805.334	0.0	5.912.740	20.14	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	99.04	11.805.334	-0.8	5.912.735	21.58	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	98.94	11.805.334	-0.4	5.912.737	21.03	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	97.95	11.805.334	-0.3	5.912.738	22.97	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	93.66	11.805.334	0.5	5.912.743	22.37	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	93.65	11.805.334	2.6	5.912.755	14.57	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	93.36	11.805.334	-0.1	5.912.739	20.41	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	93.01	11.805.334	5.8	5.912.774	14.83	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	92.43	11.805.334	-0.6	5.912.736	21.30	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	91.94	11.805.334	5.8	5.912.774	14.31	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	90.64	11.805.334	-0.1	5.912.739	19.81	BPA	P02751 FN
MIFEEHGFR	89.06	11.805.334	-0.5	5.912.737	20.77	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	88.33	11.805.334	0.8	5.912.745	20.00	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	86.91	11.805.334	-0.2	5.912.739	19.88	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	80.85	11.805.334	-0.4	5.912.737	20.08	BPA	P02751 FN
MIFEEHGFR	75.64	11.805.334	4.9	5.912.769	15.10	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	45.17	11.805.334	-0.4	3.945.182	20.16	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	41.01	11.805.334	0.5	3.945.186	19.46	Bothro	P02751 FN
MIFEEHGFR	39.16	11.805.334	-0.4	3.945.182	19.84	BPA	P02751 FN
QTTSSSGPFTDVRAA	114.58	15.807.430	8.9	7.913.859	14.69	Bothro	P02751 FN
QTTSSSGPFTDVRAA	114.10	15.807.430	0.8	7.913.794	19.59	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	112.90	12.696.387	0.2	6.358.267	19.42	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	102.39	12.696.387	6.1	6.358.305	14.71	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	93.22	12.696.387	4.8	6.358.297	14.98	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	87.34	12.696.387	0.5	6.358.269	19.67	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	80.40	12.696.387	-4.8	6.358.235	19.90	Bothro	P02751 FN

MVQPQSPVAVSQ	73.11	12.696.387	5.3	6.358.300	15.26	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	62.77	12.696.387	-2.4	6.358.251	15.78	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	61.38	12.696.387	8.1	6.358.317	14.37	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	58.60	12.696.387	6.6	6.358.308	15.51	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	49.31	12.696.387	-1.2	6.358.259	16.62	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVSQ	48.10	12.696.387	0.7	6.358.270	16.13	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	105.34	12.856.337	-0.3	6.438.239	19.37	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	100.26	12.856.337	-0.2	6.438.240	19.65	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	98.42	12.856.337	0.0	6.438.241	20.17	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	96.99	12.856.337	-0.1	6.438.240	19.53	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	91.40	12.856.337	-0.7	6.438.237	23.22	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	90.15	12.856.337	0.5	6.438.244	19.91	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	85.39	12.856.337	-0.2	6.438.240	20.42	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	85.05	12.856.337	-0.8	6.438.236	20.97	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	82.72	12.856.337	5.0	6.438.273	14.54	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	81.54	12.856.337	0.0	6.438.241	22.14	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	80.60	12.856.337	7.4	6.438.289	14.27	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	79.56	12.856.337	-1.1	6.438.234	22.95	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	78.56	12.856.337	-1.5	6.438.231	21.61	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	78.20	12.856.337	0.1	6.438.242	23.49	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	76.03	12.856.337	0.3	6.438.243	22.43	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	75.44	12.856.337	-0.6	6.438.237	21.35	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	74.80	12.856.337	-0.9	6.438.235	21.87	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	73.15	12.856.337	0.3	6.438.243	24.59	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	73.08	12.856.337	-0.4	6.438.239	24.03	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	71.31	12.856.337	0.1	6.438.242	24.92	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	70.43	12.856.337	0.0	6.438.241	19.75	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	69.73	12.856.337	0.6	6.438.245	20.69	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	68.68	12.856.337	-0.6	6.438.237	22.68	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	66.85	12.856.337	0.4	6.438.243	23.76	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	63.88	12.856.337	5.0	6.438.273	15.02	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	56.49	12.856.337	0.8	6.438.246	24.33	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	53.29	12.856.337	5.3	6.438.275	14.29	CTRL	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	50.94	12.856.337	6.8	6.438.285	15.52	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVSQ	38.60	12.856.337	0.7	6.438.246	16.53	Bothro	P02751 FN
SYNQYSQRY	110.90	12.075.258	0.0	6.047.701	18.87	Bothro	P02751 FN
WLPSSSPVTGYR	110.61	13.486.775	-0.5	6.753.457	20.66	BPA	P02751 FN
WLPSSSPVTGYR	81.10	13.486.775	0.8	6.753.466	20.40	BPA	P02751 FN
WLPSSSPVTGYR	76.22	13.486.775	-0.2	6.753.459	15.76	BPA	P02751 FN
WLPSSSPVTGYR	57.00	13.486.775	1.2	6.753.469	20.50	Bothro	P02751 FN
VQTTSSGSGPFTDVRA	108.80	16.087.743	5.8	8.053.991	14.86	Bothro	P02751 FN

GSGPFTDVRAA	107.85	10.765.250	0.4	5.392.700	19.54	Bothro	P02751 FN
GSGPFTDVRAA	82.13	10.765.250	5.3	5.392.726	14.60	Bothro	P02751 FN
TSSGSGPFTDVRA	103.70	12.805.996	4.9	6.413.102	14.72	Bothro	P02751 FN
TSSGSGPFTDVRA	91.64	12.805.996	5.4	6.413.105	14.64	CTRL	P02751 FN
TSSGSGPFTDVRA	44.36	12.805.996	0.4	6.413.073	19.46	BPA	P02751 FN
IQLPGTSGQQP	99.69	11.245.825	0.1	5.632.986	20.39	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQP	92.37	11.245.825	-0.1	5.632.985	15.75	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQP	82.28	11.245.825	0.8	5.632.990	19.84	Bothro	P02751 FN
IQLPGTSGQQP	80.62	11.245.825	6.3	5.633.021	15.49	Bothro	P02751 FN
SGSGPFTDVRAA	98.53	11.635.570	5.2	5.827.888	14.66	Bothro	P02751 FN
SGSGPFTDVRAA	85.76	11.635.570	6.6	5.827.896	14.63	CTRL	P02751 FN
SGSGPFTDVRAA	83.98	11.635.570	1.2	5.827.865	19.54	Bothro	P02751 FN
SGSGPFTDVRAA	47.55	11.635.570	1.9	5.827.869	19.48	BPA	P02751 FN
SGPFTDVRAA	97.37	10.195.035	5.6	5.107.619	14.67	Bothro	P02751 FN
TIEGLQPTVEY	96.69	12.486.238	-0.4	6.253.189	20.93	Bothro	P02751 FN
TIEGLQPTVEY	92.53	12.486.238	-0.6	6.253.188	20.95	BPA	P02751 FN
TIEGLQPTVEY	81.03	12.486.238	-0.8	6.253.187	21.00	CTRL	P02751 FN
TIEGLQPTVEY	63.44	12.486.238	-1.2	6.253.184	15.94	BPA	P02751 FN
TIEGLQPTVEY	43.46	12.486.238	1.9	6.253.204	16.01	Bothro	P02751 FN
IVYSPVEGSSTE	91.88	13.536.300	-1.0	6.778.216	19.96	Bothro	P02751 FN
TKTETITGFQVDAVPAN	90.96	17.909.050	0.5	8.964.602	15.85	BPA	P02751 FN
VTSNTVTGETTPFSP	89.27	15.367.307	0.1	7.693.727	20.17	Bothro	P02751 FN
VTSNTVTGETTPFSP	79.80	15.367.307	0.1	7.693.727	15.90	Bothro	P02751 FN
FEEHGFR	88.18	9.204.140	-0.1	4.612.142	18.39	BPA	P02751 FN
FEEHGFR	55.90	9.204.140	9.7	4.612.188	14.94	Bothro	P02751 FN
IFEEHGFR	88.11	10.334.980	0.1	5.177.563	19.59	BPA	P02751 FN
IFEEHGFR	80.80	10.334.980	4.9	5.177.589	14.07	Bothro	P02751 FN
IFEEHGFR	76.12	10.334.980	-0.3	5.177.562	19.86	Bothro	P02751 FN
IFEEHGFR	72.48	10.334.980	-0.9	5.177.559	19.85	BPA	P02751 FN
IFEEHGFR	67.95	10.334.980	-0.3	5.177.562	19.84	Bothro	P02751 FN
VREEVTVGN	87.46	11.005.825	-0.4	5.512.983	18.90	Bothro	P02751 FN
VREEVTVGN	86.94	11.005.825	-0.4	5.512.983	19.04	BPA	P02751 FN
VREEVTVGN	79.70	11.005.825	0.1	5.512.986	18.95	CTRL	P02751 FN
MVQPQSPVA	84.89	9.554.797	-0.1	4.787.471	19.44	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVA	75.00	9.554.797	0.5	4.787.474	19.17	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVA	64.84	9.554.797	-0.4	4.787.469	20.23	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVA	61.61	9.554.797	6.4	4.787.502	14.50	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVA	60.66	9.554.797	6.0	4.787.500	14.42	CTRL	P02751 FN
MVQPQSPVA	54.86	9.554.797	5.5	4.787.497	14.76	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVA	52.88	9.554.797	5.3	4.787.497	15.29	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVA	50.02	9.554.797	5.4	4.787.497	15.56	Bothro	P02751 FN

<u>MV</u> QPQSPVA	74.39	9.714.746	0.1	4.867.446	19.42	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	73.25	9.714.746	0.6	4.867.449	22.43	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	67.32	9.714.746	0.4	4.867.448	19.68	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	64.50	9.714.746	0.0	4.867.446	19.51	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	63.52	9.714.746	5.1	4.867.470	14.45	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	58.33	9.714.746	-0.2	4.867.445	20.47	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	54.24	9.714.746	5.4	4.867.472	13.91	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	50.34	9.714.746	0.0	4.867.446	22.69	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	45.04	9.714.746	0.5	4.867.448	21.01	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	44.38	9.714.746	-0.2	4.867.445	20.21	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	40.12	9.714.746	-3.5	9.724.785	22.19	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	36.17	9.714.746	0.0	4.867.446	23.50	Bothro	P02751 FN
<u>MV</u> QPQSPVA	35.91	9.714.746	-0.2	4.867.445	21.89	Bothro	P02751 FN
VQQPSPVAVSQ	84.70	11.385.983	5.9	5.703.098	14.20	Bothro	P02751 FN
GTSTSATLTGLTR	84.35	12.646.624	0.7	6.333.389	19.43	BPA	P02751 FN
GTSTSATLTGLTR	75.20	12.646.624	0.3	6.333.386	19.61	BPA	P02751 FN
ATLTGLTRGAT	83.26	10.605.876	-0.3	5.313.010	19.85	Bothro	P02751 FN
YNQYSQRY	82.94	11.204.938	0.3	5.612.543	18.49	Bothro	P02751 FN
LTGLTRGATY	82.16	10.515.662	0.1	5.267.904	19.84	Bothro	P02751 FN
TIEGLQPTVEYVVS	81.93	15.337.926	-0.4	7.679.033	21.30	CTRL	P02751 FN
TIEGLQPTVEYVVS	68.21	15.337.926	0.1	7.679.037	21.25	BPA	P02751 FN
TIEGLQPTVEYVVS	59.63	15.337.926	-0.3	7.679.034	21.29	Bothro	P02751 FN
MQVTDVQDNS	81.30	11.354.816	0.1	5.687.481	19.05	Bothro	P02751 FN
MQVTDVQDNS	58.49	11.354.816	8.6	5.687.529	14.05	Bothro	P02751 FN
KVREEVVTVGN	80.70	12.286.775	-0.3	6.153.458	18.36	BPA	P02751 FN
GSGPFTDVRA	80.36	10.054.879	0.6	5.037.515	19.57	Bothro	P02751 FN
GSGPFTDVRA	79.00	10.054.879	5.7	5.037.541	14.71	Bothro	P02751 FN
STTPDITGYR	79.41	11.095.353	0.1	5.557.750	19.79	BPA	P02751 FN
STTPDITGYR	72.56	11.095.353	0.2	5.557.750	19.67	Bothro	P02751 FN
STTPDITGYR	46.26	11.095.353	0.1	5.557.750	19.21	BPA	P02751 FN
STTPDITGYR	39.44	11.095.353	0.2	5.557.750	18.99	BPA	P02751 FN
MIFEEHGF	77.69	10.084.375	0.3	5.052.262	15.94	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> IFEEHGF	72.35	10.244.324	0.0	5.132.234	20.05	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> IFEEHGF	67.68	10.244.324	0.2	5.132.236	15.80	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> IFEEHGF	54.47	10.244.324	0.1	5.132.235	20.66	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> IFEEHGF	45.58	10.244.324	0.1	5.132.235	20.48	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVS	75.33	11.415.801	1.0	5.717.979	19.60	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVS	69.74	11.415.801	6.5	5.718.010	14.85	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVS	63.45	11.415.801	0.8	5.717.978	19.89	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVS	52.93	11.415.801	2.2	5.717.986	19.28	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVS	52.21	11.415.801	0.4	5.717.975	20.51	Bothro	P02751 FN

MVQPQSPVAVS	47.26	11.415.801	-0.1	5.717.972	15.67	Bothro	P02751 FN
MVQPQSPVAVS	38.90	11.415.801	5.6	5.718.005	15.39	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	72.32	11.575.751	1.1	5.797.955	19.33	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	58.57	11.575.751	0.2	5.797.949	19.61	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	55.24	11.575.751	0.0	5.797.948	23.37	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	55.12	11.575.751	5.8	5.797.982	14.75	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	50.06	11.575.751	6.2	5.797.984	14.50	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	47.04	11.575.751	0.4	5.797.950	22.57	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	46.69	11.575.751	0.2	5.797.949	19.89	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	44.60	11.575.751	0.6	5.797.952	22.32	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	43.49	11.575.751	0.0	5.797.948	20.40	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	42.54	11.575.751	-0.1	5.797.947	21.01	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	42.19	11.575.751	-0.1	5.797.947	22.84	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	38.38	11.575.751	0.1	5.797.949	23.63	Bothro	P02751 FN
<u>M</u> VQPQSPVAVS	35.51	11.575.751	-0.4	5.797.946	15.61	Bothro	P02751 FN
DVPSTVQKTPF	74.65	12.176.292	0.9	6.098.224	20.36	BPA	P02751 FN
LHGPEILDVPSTVQ	73.77	15.037.932	-0.6	7.529.034	20.90	Bothro	P02751 FN
LHGPEILDVPSTVQ	69.28	15.037.932	-0.1	7.529.038	20.86	BPA	P02751 FN
TVTGETTPFSP	72.93	11.355.397	0.4	5.687.773	20.33	Bothro	P02751 FN
TVTGETTPFSP	69.23	11.355.397	0.2	5.687.772	20.08	Bothro	P02751 FN
TVTGETTPFSP	67.99	11.355.397	-3.7	5.687.750	15.85	Bothro	P02751 FN
PRPYPPN	71.77	8.394.290	0.0	4.207.217	17.51	CTRL	P02751 FN
PRPYPPN	71.11	8.394.290	0.0	4.207.218	17.73	BPA	P02751 FN
PRPYPPN	68.03	8.394.290	0.1	4.207.218	17.70	Bothro	P02751 FN
PRPYPPN	65.76	8.394.290	-0.2	4.207.217	18.06	CTRL	P02751 FN
PRPYPPN	61.39	8.394.290	0.0	4.207.217	17.96	Bothro	P02751 FN
PRPYPPN	58.99	8.394.290	0.0	4.207.217	17.99	BPA	P02751 FN
PRPYPPN	56.51	8.394.290	0.1	4.207.218	17.43	Bothro	P02751 FN
PRPYPPN	56.30	8.394.290	-0.1	4.207.217	17.78	CTRL	P02751 FN
PRPYPPN	44.48	8.394.290	0.6	4.207.220	17.47	BPA	P02751 FN
GLTRGATY	71.69	8.374.344	-0.2	4.197.244	18.55	CTRL	P02751 FN
SSSPVTGYR	69.28	9.524.614	-0.3	4.772.378	18.07	Bothro	P02751 FN
ATLTGLTR	69.28	8.314.814	0.1	4.167.480	19.65	BPA	P02751 FN
ATLTGLTR	64.38	8.314.814	-0.3	4.167.479	19.62	Bothro	P02751 FN
QMVQPQSPVA	67.35	10.835.383	5.6	5.427.795	14.62	Bothro	P02751 FN
QMVQPQSPVA	45.60	10.835.383	0.1	5.427.765	19.43	Bothro	P02751 FN
<u>Q</u> MVQPQSPVA	58.35	10.995.332	5.0	5.507.766	13.96	Bothro	P02751 FN
SSGSGPFTDVR	67.05	11.085.149	-0.4	5.552.645	19.18	BPA	P02751 FN
SSGSGPFTDVR	55.21	11.085.149	-0.6	5.552.644	19.47	BPA	P02751 FN
TSSGSGPFTDVR	67.00	12.095.625	4.3	6.057.911	14.42	Bothro	P02751 FN
TIEGLQPTVE	65.16	10.855.604	-0.7	5.437.871	20.60	CTRL	P02751 FN

TIEGLOPTVE	60.38	10.855.604	-0.6	5.437.872	20.58	BPA	P02751 FN
TIEGLOPTVE	58.71	10.855.604	-0.1	5.437.874	20.55	Bothro	P02751 FN
TIEGLOPTVE	58.69	10.855.604	-0.1	5.437.874	20.35	CTRL	P02751 FN
TIEGLOPTVE	57.91	10.855.604	0.3	5.437.877	20.29	Bothro	P02751 FN
TIEGLOPTVE	54.40	10.855.604	0.2	5.437.876	20.31	BPA	P02751 FN
TDEEPLQFR	64.64	11.335.353	0.7	5.677.753	19.70	BPA	P02751 FN
TDEEPLQFR	52.21	11.335.353	-2.0	5.677.738	19.92	BPA	P02751 FN
IFEEHGF	64.60	8.773.970	-0.2	4.397.057	20.64	CTRL	P02751 FN
IFEEHGF	63.02	8.773.970	0.0	4.397.057	15.45	BPA	P02751 FN
SGSGPFTDVR	64.09	10.214.828	0.2	5.117.488	19.17	BPA	P02751 FN
SGSGPFTDVR	45.51	10.214.828	0.0	5.117.487	19.53	BPA	P02751 FN
VEVFITETPSQP	63.85	13.456.765	1.6	6.738.466	16.01	Bothro	P02751 FN
LHLEANPDTGV	63.25	11.645.775	-0.4	5.832.958	20.07	Bothro	P02751 FN
TLTGLTRG	62.64	8.174.658	0.2	4.097.402	19.18	Bothro	P02751 FN
TLTGLTRG	44.52	8.174.658	-0.3	4.097.401	19.22	CTRL	P02751 FN
MIFEEHG	62.22	8.613.691	8.8	4.316.956	14.69	Bothro	P02751 FN
MIFEEHG	46.42	8.613.691	0.5	4.316.920	19.51	Bothro	P02751 FN
MIFEEHG	36.74	8.613.691	-0.2	4.316.917	20.04	Bothro	P02751 FN
MIFEEHG	55.95	8.773.640	0.3	4.396.894	19.21	Bothro	P02751 FN
MIFEEHG	55.17	8.773.640	0.5	4.396.895	19.49	Bothro	P02751 FN
MIFEEHG	49.20	8.773.640	6.0	4.396.919	14.11	Bothro	P02751 FN
MIFEEHG	42.66	8.773.640	0.2	4.396.894	18.97	Bothro	P02751 FN
MIFEEHG	36.15	8.773.640	5.5	4.396.917	13.85	Bothro	P02751 FN
MIFEEHG	35.53	8.773.640	5.7	4.396.918	14.38	Bothro	P02751 FN
QMVQPOSPVAVSQ	62.08	14.136.923	5.5	7.078.573	14.29	Bothro	P02751 FN
QMVQPOSPVAVSQ	59.91	14.136.923	-0.3	7.078.532	19.22	Bothro	P02751 FN
FEEHGF	61.17	7.643.129	-0.4	3.831.636	19.92	BPA	P02751 FN
FEEHGF	58.96	7.643.129	-0.2	3.831.637	20.00	Bothro	P02751 FN
FRVPGTSTSAT	60.30	11.225.669	6.1	5.622.941	14.40	Bothro	P02751 FN
LHGPEILDVPST	58.97	12.766.663	0.4	6.393.406	20.80	Bothro	P02751 FN
GSGPFTDVR	55.83	9.344.508	5.6	4.682.353	14.37	Bothro	P02751 FN
LTVSWER	54.93	8.894.658	5.7	4.457.427	15.16	Bothro	P02751 FN
VKWLPS SSP	53.82	9.995.389	6.4	5.007.799	15.49	Bothro	P02751 FN
DVPSTVQKTP	52.42	10.705.608	-0.1	5.362.876	18.19	Bothro	P02751 FN
PRPYPP	52.02	7.253.860	1.4	3.637.008	18.46	Bothro	P02751 FN
PRPYPP	51.65	7.253.860	2.1	3.637.010	18.28	CTRL	P02751 FN
PRPYPP	50.55	7.253.860	1.6	3.637.008	18.51	BPA	P02751 FN
PRPYPP	50.01	7.253.860	1.9	3.637.010	18.20	Bothro	P02751 FN
PRPYPP	47.14	7.253.860	2.0	3.637.010	18.02	CTRL	P02751 FN
PRPYPP	47.06	7.253.860	1.6	3.637.009	17.93	Bothro	P02751 FN
PRPYPP	46.84	7.253.860	1.8	3.637.009	18.55	CTRL	P02751 FN

PRPYPP	45.96	7.253.860	1.8	3.637.009	18.25	BPA	P02751 FN
PRPYPP	40.41	7.253.860	2.2	3.637.010	17.99	BPA	P02751 FN
VTGETTPFSP	51.83	10.344.921	0.4	5.182.535	15.83	Bothro	P02751 FN
FTDVR	51.40	6.363.231	0.3	3.191.689	17.41	Bothro	P02751 FN
FTDVR	50.45	6.363.231	1.0	3.191.692	17.47	BPA	P02751 FN
FTDVR	50.35	6.363.231	0.2	3.191.689	17.67	Bothro	P02751 FN
FTDVR	49.04	6.363.231	0.2	3.191.689	17.73	BPA	P02751 FN
FTDVR	45.66	6.363.231	0.9	3.191.691	17.54	CTRL	P02751 FN
IQLPGTSGQQPS	51.39	12.116.146	-0.1	6.068.145	20.17	Bothro	P02751 FN
TVQKTPF	51.29	8.194.490	-0.3	4.107.317	19.75	CTRL	P02751 FN
TVQKTPF	49.39	8.194.490	0.0	4.107.318	19.48	CTRL	P02751 FN
TVQKTPF	47.90	8.194.490	-0.3	4.107.317	19.83	BPA	P02751 FN
TVQKTPF	44.57	8.194.490	0.0	4.107.318	19.56	BPA	P02751 FN
TVQKTPF	40.03	8.194.490	-0.3	4.107.317	19.69	Bothro	P02751 FN
LNLPETAN	51.24	8.704.447	5.4	4.362.320	15.08	Bothro	P02751 FN
LTGLTRGA	50.27	7.874.552	-0.4	3.947.347	18.76	Bothro	P02751 FN
HLYPH	50.13	6.653.286	0.6	3.336.718	16.81	BPA	P02751 FN
HLYPH	49.26	6.653.286	0.7	3.336.718	16.88	Bothro	P02751 FN
HLYPH	48.91	6.653.286	0.9	3.336.718	16.95	CTRL	P02751 FN
HRPRPYPPN	48.91	11.325.890	-0.2	5.673.016	16.74	BPA	P02751 FN
SSPVTGYR	48.86	8.654.294	0.0	4.337.220	17.97	Bothro	P02751 FN
LQFRVPGTS	48.64	10.035.450	-1.1	5.027.792	20.58	Bothro	P02751 FN
LTVGLTR	47.66	7.584.650	0.5	3.802.400	19.47	BPA	P02751 FN
LTVGLTR	45.39	7.584.650	-0.5	3.802.396	19.82	BPA	P02751 FN
FRVPGT	47.14	6.753.704	0.4	3.386.926	20.03	Bothro	P02751 FN
FRVPGTS	46.76	7.624.024	-0.3	3.822.084	19.74	Bothro	P02751 FN
IFEEHG	46.08	7.303.286	1.8	3.661.722	18.30	CTRL	P02751 FN
IFEEHG	42.17	7.303.286	1.7	3.661.722	18.27	BPA	P02751 FN
IFEEHG	36.73	7.303.286	1.6	3.661.721	18.20	Bothro	P02751 FN
MVQPOSPVAV	45.14	10.705.430	5.8	5.362.819	15.07	Bothro	P02751 FN
VTLPHP	44.36	6.623.751	6.0	3.321.968	14.62	Bothro	P02751 FN
DVQDNSISV	42.80	9.754.509	0.1	4.887.328	20.28	Bothro	P02751 FN
DVQDNSISV	42.30	9.754.509	-0.1	4.887.327	20.31	BPA	P02751 FN
ITGYR	42.51	6.083.282	0.5	3.051.715	17.01	Bothro	P02751 FN
IFEEH	40.69	6.733.071	0.9	3.376.611	18.21	Bothro	P02751 FN
IFEEH	39.74	6.733.071	0.7	3.376.611	18.29	BPA	P02751 FN
MIFEEH	40.47	8.043.476	-0.2	4.031.810	20.09	Bothro	P02751 FN
DATETTITIS	40.11	10.505.081	-1.8	5.262.604	15.64	BPA	P02751 FN
MQVTDVQDNSIS	39.98	13.355.977	5.0	6.688.094	14.89	Bothro	P02751 FN
VIVEALKDQQR	38.91	12.977.354	-2.3	6.498.735	19.30	Bothro	P02751 FN
VIVEALKDQQR	35.15	12.977.354	-0.1	6.498.749	18.66	BPA	P02751 FN

KVREEVV	38.67	8.574.970	0.8	4.297.561	17.48	BPA	P02751 FN
KVREEVV	37.32	8.574.970	0.4	4.297.560	19.50	Bothro	P02751 FN
KVREEVV	35.32	8.574.970	-0.4	4.297.556	17.51	CTRL	P02751 FN
HGPEILDVPS	36.71	10.625.345	-0.9	5.322.740	20.79	CTRL	P02751 FN
HRPRPYPP	36.48	10.185.460	0.1	5.102.803	16.85	BPA	P02751 FN
TDVKVTI	35.30	7.744.487	0.4	3.882.318	13.94	BPA	P02751 FN
LHGPEILDVPS	35.02	11.756.187	-0.1	5.888.165	20.77	BPA	P02751 FN

M = oxidação da metionina

APÊNDICE C - Fragmentos peptídicos derivados do cininogênio sequenciados por espectrometria de massas.

Peptídeo	-10lgP	Massa	ppm	m/z	RT	Espectro	Acesso
HKFKLDDDLHQGGH	60.48	17.748.386	-0.2	5.926.201	19.33	Bothro	P01042 KNG
LGHGHEQQHGLGHGHK FKLDDDLHQGGH	58.44	32.195.095	-1.1	8.058.838	18.88	Bothro	P01042 KNG
LGHGHEQQHGLGHGHK FKLDDDLHQGGH	32.59	32.195.095	0.3	6.449.094	18.86	Bothro	P01042 KNG
LGHGHEQQHGLGHG	42.21	14.626.814	0.8	4.885.681	17.13	Bothro	P01042 KNG
LGHGHEQQHGLGHG	35.96	14.626.814	-0.3	4.885.676	16.88	Bothro	P01042 KNG
IQSDDDWIPDIQIDPNG	38.67	19.398.799	-0.3	9.709.470	22.63	Bothro	P01042 KNG
LIAT <u>M</u>	30.68	5.632.989	77.9	2.826.786	19.72	Bothro	P01042 KNG
FKAVDAALKKY	29.76	12.527.179	0.1	4.185.800	19.83	Bothro	P01042 KNG
RPPGFSPF	28.12	9.034.602	-1.2	4.527.368	21.44	Bothro	P01042 KNG
IDIQL	27.72	6.003.483	60.6	3.011.996	21.47	Bothro	P01042 KNG
LGHGHEQQHGLGH	25.99	14.056.599	-0.1	4.695.605	16.97	Bothro	P01042 KNG
LGHGHEQQHGLGHGH	25.57	15.997.404	0.6	4.009.426	16.76	Bothro	P01042 KNG
DQGHGH	25.29	6.492.568	62.9	3.256.561	20.13	Bothro	P01042 KNG

M = oxidação da metionina