

José Antonio Portes Junior

Localização espacial do processamento das  
metaloproteinases do veneno botrópico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2014

José Antonio Portes Junior

Localização espacial do processamento das metaloproteinases  
do veneno botrópico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Ana Maria Moura da Silva

São Paulo  
2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

Portes-Junior, José Antonio

Localização espacial do processamento das metaloproteínas do veneno botrópico / José Antonio Portes Junior; Orientadora: Ana Maria Moura da Silva – São Paulo, 2014.

129 fls. : il. color. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, 2014.

1. Metaloproteínas. 2. Ativação enzimática. 3. Veneno de serpente. 4. *Bothrops jararaca*. 5. Pró-domínio. I. Moura-da-Silva, Ana Maria (orient.). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III. Doutor.

CDD 615.9

## AUTORIZAÇÃO

Eu, José Antonio Portes Junior, aluno regular do Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, do Instituto Butantan, em nível de Doutorado, sob orientação da Dra. Ana Maria Moura da Silva, declaro estar de acordo com a divulgação da minha Tese em arquivo tipo pdf no site da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo apenas 6 meses após a defesa.

São Paulo, 14 de Abril de 2014.

Assinatura do aluno: \_\_\_\_\_

De acordo: \_\_\_\_\_

Orientador – Prof(a) Dr(a) Ana Maria Moura da Silva

POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA  
INSTITUTO BUTANTAN

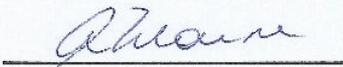
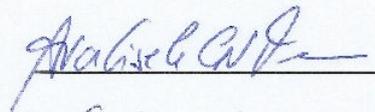
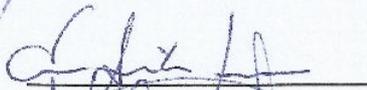
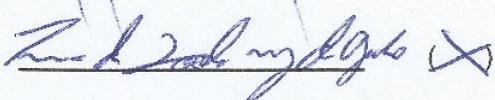
RESULTADO DA DEFESA DE TESE

DOUTORADO

NOME DO ALUNO: JOSÉ ANTONIO PORTES JUNIOR

DATA DO EXAME: 06/05/2014

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Ana M. Moura da Silva (Presidente)		(X)	( )
Ana G. C. Neves Ferreira		(X)	( )
Emer Suavinho Ferro		(X)	( )
Daniel Carvalho Pimenta		(X)	( )
Inácio L. M. J. Azevedo		(X)	( )

DECISÃO FINAL: APROVADO ( X )

REPROVADO ( )

Comentários da Banca (opcional):



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

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

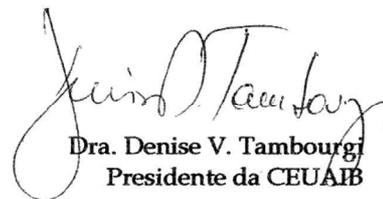
## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Processamento das metaloproteínas do veneno botrópico: ativação da atividade catalítica pela remoção do pró-domínio" protocolo nº 736/10, sob a responsabilidade de Ana Maria Moura da Silva e José Antônio Portes Júnior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/05/2010.

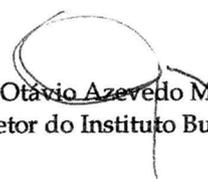
We certify that the research entitled "Processing of metalloproteinase from Bothrops venom: activation of the catalytic activity by removal of pro-domain", protocol nº 736/10, under the responsibility of Ana Maria Moura da Silva and José Antônio Portes Júnior, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 05/13/2010

Vigência do Projeto: 06/2010 – 06/2014	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunopatologia	80 camundongos Balb/c Machos 06 coelhos albinos Machos 20 serpentes <i>Bothrops jararaca</i> Fêmeas

São Paulo, 14 de maio de 2010.

  
Dra. Denise V. Tambourg  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

A todos aqueles que de alguma forma  
estiveram e estão próximos de mim,  
fazendo tudo valer a pena.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que iluminou meu caminho durante esta caminhada.

À minha amada mãe Cláudia, por sua capacidade de acreditar e investir em mim e por sempre estar ao meu lado em todas as minhas decisões. Mãe, seu cuidado e dedicação deram, em alguns momentos, a esperança pra seguir.

Ao exemplo de pai que a vida me deu de presente, Natalin, obrigado por tudo.

À Dra. Ana Maria Moura da Silva, minha orientadora, pelo incentivo e confiança depositada em mim, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade, por ser responsável pelo meu amadurecimento e fonte de inspiração, espero um dia ser, assim como você, um exemplo a ser seguido.

Ao Dr. Geraldo Santana Magalhães, por ter me incentivado a encarar esse desafio, obrigado pela amizade e valiosos conselhos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan que de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Solange Maria de Toledo Serrano, Dr. Emer Suavinho Ferro e Dr. Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo pela valiosa contribuição.

À Dra. Norma Yamanouye, pela colaboração em etapas importantíssimas deste trabalho.

Ao Dr. Gilberto Barbosa Domont e sua equipe, que gentilmente me receberam em seu laboratório e me deram todo o suporte necessário nos experimentos envolvendo espectrometria de massas.

À Dra. Sylvia Carneiro, por sua valiosa colaboração nos experimentos de microscopia eletrônica.

Ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, em especial ao amigo Sávio, pelo fornecimento e classificação das serpentes.

À minha linda, Bruna, companheira de todas as horas. Bru, com você tenho me sentido mais vivo de verdade. Obrigado pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada etapa.

Agradeço minhas amigas Pri e Carol, pelos momentos agradáveis que passamos juntos, pela paciência e principalmente pela convivência. Pri, Carol e Bru, que quarteto formamos!

Aos meus grandes amigos de infância Marcelinho e Pente, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro ajudam a melhorar todo o resultado final.

Aos meus amigos da “Vila Butantã” (Podé, Lou, Peter, Perereca, Bia, Luga, Adriano, Joe, Thi, enfim a galera toda), vocês são amigos que irei levar por toda a vida.

Ao Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, trabalhar em um lugar como esse não tem explicação, obrigado a todos que fazem parte desta equipe e que tornam este laboratório, um ambiente agradável de se conviver e trabalhar.

Minhas “irmãs de laboratório”, Juliana, Paloma, Michelle, Diana, Luciana e Ane, pelas discussões e sugestões.

Aos membros da secretaria e todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, que de alguma maneira me ajudaram a chegar até aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2010/01134-2) pela concessão da bolsa doutorado.

“Nenhuma grande descoberta foi feita  
jamais sem um palpite ousado.”

**Isaac Newton**

## RESUMO

Portes-Junior, José Antonio. Localização espacial do processamento das metaloproteinases do veneno botrópico. 2014. 129 f. Tese (Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

Metaloproteinases incluem famílias de proteínas com funções essenciais para a homeostase em diferentes seres vivos, tais como as MMPs e ADAMs. Estas enzimas estão envolvidas em uma grande variedade de processos biológicos tanto fisiológicos, como proliferação e diferenciação celular, quanto estados patológicos associados com a metástase de tumores, inflamação, degeneração de tecidos e morte celular. Metaloproteinases do veneno de serpentes (SVMPs) também são enzimas dependentes de zinco abundantes em venenos de serpentes. SVMPs são responsáveis pela maioria dos sintomas locais e sistêmicos do envenenamento humano. Tal como as MMPs e ADAMs, as SVMPs são sintetizadas como zimogênios e a ativação da enzima é regulada por meio de hidrólise do seu pró-domínio. No entanto, muito pouco se sabe sobre a ativação de SVMPs e onde a hidrólise do pró-domínio ocorre. Neste estudo, buscou-se identificar e quantificar a presença de pró-domínios como zimogênios ou de forma livre em diferentes compartimentos da glândula de veneno, a fim de esclarecer alguns mecanismos envolvidos na ativação da SMVP. Para esta finalidade, o pró-domínio da jararagina (PD-Jar), uma SVMP prevalente no veneno de *Bothrops jararaca*, foi obtido na sua forma recombinante e usado para imunizar camundongos e coelhos para a obtenção de anticorpos anti-pró-domínio que foram testados com amostras de veneno ou glândulas coletadas em diferentes períodos do ciclo de produção de veneno. Por western blotting, as bandas de 22 e 45 kDa, que correspondem, respectivamente, ao pró-domínio livre e ao zimogênio de SVMP de classe P-I, foram revelados em amostras de veneno coletadas 4, 7 e 10 dias após o estímulo do ciclo de produção de veneno. No veneno coletado a partir do lúmen, bandas de alta massa molecular foram detectadas apenas no pico da produção de veneno e não no estado quiescente. Em glândulas de veneno, foram detectadas predominantemente as bandas de massas moleculares de zimogênios, em tecidos extraídos ao longo do

ciclo. Os antígenos reconhecidos por Western blotting foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PD-Jar e submetidos a MS/MS. Peptídeos de pró-domínio foram identificados em todas as amostras, juntamente com algumas proteínas do veneno que foram co-precipitadas e também o GPC (*glutamyl peptide cyclotransferase*), que está envolvido em processamentos pós-traducionais das SMVPs. A fim de identificar a localização destas moléculas no interior da glândula de veneno, os tecidos das glândulas foram submetidos à análise por imunofluorescência e imunoeletromicroscopia. Os resultados mostram a coloração positiva de pró-domínio em células secretoras majoritariamente nas vesículas secretoras perto do Golgi. Tomados em conjunto, os nossos dados mostram que o processamento das SVMPs começa dentro de vesículas secretoras de veneno das células secretoras e ocorre predominantemente no lúmen da glândula de veneno após a secreção das enzimas. Como tal, a ativação das SMVPs difere de ADAMs e MMPs, mas pode ser utilizado como um modelo para o estudo da relevância dos peptídeos resultantes do processamento e degradação do pró-domínio para o controle da atividade de metaloproteinases.

Palavras chave: Metaloproteinases, ativação enzimática, veneno de serpente, *Bothrops jararaca* e pró-domínio.

## ABSTRACT

Portes-Junior, José Antonio. Spatial location of the processing of snake venom metalloproteinases. 2014. 129 p. PhD Thesis (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

The zinc-dependent metalloproteinases include families of proteins with essential function for homeostasis such as MMPs and ADAMs. These enzymes are involved in a wide variety of biological processes ranging from physiological cell proliferation and differentiation to pathological states associated with tumor metastasis, inflammation, tissue degeneration, and cell death. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs) are also zinc-dependent enzymes abundant in venoms of viper snakes. SVMPs are responsible for most local and systemic symptoms of human envenomings. As MMPs and ADAMs, SVMPs are synthesized as zymogens and the enzyme activation is regulated by hydrolysis of its pro-domain. However, very little is known about activation of SVMPs and where the hydrolysis of the pro-domain occurs. In this study, we attempted to identify and quantify the presence of pro-domains in different compartments of snake venom glands as zymogens or at free form, in order to enlighten some mechanism involved in SVMP activation. For this purpose, the pro-domain of jararhagin (PD-Jar), a SVMP prevailing in the venom of *Bothrops jararaca*, was obtained in its recombinant form and used to immunize mice and rabbits to obtain antibodies specific to SVMP pro-domains, which were tested with samples of venom or glands tissues collected in different periods of the venom production cycle. By Western blotting, bands of 22 and 45 kDa, that correspond respectively to free pro-domains or zymogen of P-I SVMPs expected mobilities, were revealed in venom samples collected 4, 7 and 10 days after stimulus of venom production cycle. In venom glands, bands of zymogen molecular masses were detected in tissue extracts all along the cycle, but on the venom collected from the lumen these high molecular mass bands were detected only at the peak of venom production and not at the quiescent state. The antigens recognized by Western blots were immunoprecipitated with anti-PD-Jar and subjected to MS/MS. Pro-domain peptides were identified in all samples together with a few venom proteins that co-precipitated with SVMPs and the

Glutamyl Peptide Cyclotransferase, involved in SVMP post-translational processing. In order to identify the location of these molecules within the venom secretory apparatus, gland tissues were submitted to immunofluorescence and immunoelectronmicroscopy analysis. The results show positive staining of pro-domain in secretory cells majorly at the secretory vesicles near the Golgi in the active glands. Taken together, our data shows that processing of SVMPs starts within secretory vesicles of venom gland secretory cells and occurs predominantly at the lumen of the venom gland just after the enzyme secretion. As such, SVMP activation differs from ADAMs and MMPs, but can be used as a model for studying the relevance of peptides resulting from pro-domain processing and degradation for the control of metalloproteinases activity.

Key words: Metalloproteinases, enzyme activation, snake venom, *Bothrops jararaca* and pro-domain.

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1.	<b>Serpentes</b> .....	16
1.2.	<b>Veneno e seu mecanismo de produção</b> .....	17
1.3.	<b>Envenenamento ofídico</b> .....	19
1.4.	<b>Venenos ofídicos</b> .....	20
1.5.	<b>Metaloproteinasas</b> .....	20
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
2.1.	<b>Objetivos específicos</b> .....	28
3.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1.	<b>Linhagens bacterianas</b> .....	29
3.2.	<b>Vetor</b> .....	29
3.3.	<b>Meios de cultura</b> .....	30
3.4.	<b>Reação em cadeia da polimerase (PCR) para clonagem do pró-domínio</b> .....	30
3.5.	<b>Digestão do DNA com enzimas de restrição</b> .....	31
3.6.	<b>Reação de ligação</b> .....	31
3.7.	<b>Preparação de <i>E. coli</i> competentes por cloreto de cálcio e transformação</b> .....	32
3.8.	<b>Extração dos plasmídeos e purificação de DNA</b> .....	33
3.9.	<b>Seleção dos clones positivos por PCR</b> .....	33
3.10.	<b>Sequenciamento do pró-domínio clonado no vetor pAE</b> .....	33
3.11.	<b>Expressão da proteína recombinante em <i>E. coli</i></b> .....	34
3.12.	<b>Extração de proteína recombinante das bactérias <i>E. coli</i></b> .....	35
3.13.	<b>Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)</b> .....	35
3.14.	<b>Extração de veneno e das glândulas de veneno de <i>Bothrops jararaca</i></b> .....	35
3.15.	<b>Dosagem de proteínas</b> .....	36
3.16.	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS</b> .....	37
3.17.	<b>Produção do soro anti-pró-domínio</b> .....	37
3.18.	<b>Determinação dos níveis de anticorpos por ELISA</b> .....	38
3.19.	<b>ELISA indireto para quantificação de pró-enzimas</b> .....	39
3.20.	<b>Western blotting</b> .....	40
3.21.	<b>Enriquecimento das frações contendo pró-domínio por imunoprecipitação</b> .....	41
3.21.1.	<b>Isolamento de IgG de coelho do soro anti-PD-Jar<sub>r</sub></b> .....	41
3.21.2.	<b>Ligação da IgG anti-PD-Jar<sub>r</sub> em resina de Sepharose ativada</b> .....	42
3.21.3.	<b>Isolamento das amostras de pró-domínio</b> .....	43
3.22.	<b>Identificação de peptídeos por espectrometria de massas</b> .....	43
3.23.	<b>Imunofluorescência em cortes congelados de glândulas de veneno</b> .....	45

3.24.	Imunoeletromicroscopia em cortes de glândula de veneno.....	45
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	47
4.1.	<b>Obtenção da proteína recombinante</b> .....	47
4.1.1.	Clonagem do pró-domínio no vetor pAE.....	47
4.1.2.	Expressão da proteína recombinante (PD-Jar).....	50
4.2.	<b>Produção do soro anti-PD-Jar</b> .....	51
4.3.	<b>Análise da presença do pró-domínio no veneno coletado no 7º dia do ciclo de produção de veneno</b> .....	52
4.4.	<b>Identificação das proteínas imunorreativas por espectrometria de massas</b> .....	54
4.5.	<b>Análise da presença do pró-domínio no ciclo de produção de veneno</b> .....	56
4.6.	<b>Quantificação do pró-domínio por ELISA indireto</b> .....	58
4.7.	<b>Identificação do pró-domínio em amostras de veneno e extratos de glândula de veneno por espectrometria de massas</b> .....	59
4.8.	<b>Análise de possíveis sítios de clivagem por furina</b> .....	62
4.9.	<b>Localização celular do pró-domínio</b> .....	63
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	75
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	76
	<b>ANEXOS</b> .....	89

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Serpentes

Pertencentes à classe dos répteis e à ordem Squamata, as serpentes são divididas em dois grupos principais: Scolecophidia (cobras-cegas) e Alethinophidia ou serpentes típicas. O grupo Alethinophidia tem uma grande diversidade compreendendo as boas, pythons e as caenophidians. O grupo Caenophidea é onde se encontram todas as serpentes venenosas (VIDAL; HEDGES, 2009). Dentro deste grupo está situada a superfamília Colubrideia de serpentes avançadas composta por quatro famílias: Atractaspididae, Colubridae, Elapidae e Viperidae.

Dentro da família Viperidae são encontradas três subfamílias: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae (FRANCO, 2003). A subfamília Crotalinae possui 21 gêneros e 172 espécies. No Brasil são encontrados 4 desses gêneros: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (BRASIL, 1998; ARAÚJO et al., 2003). O gênero *Bothrops* é o mais abundante no país, com mais de 60 espécies distribuídas em todo o território nacional (BRASIL, 2009).

A família Viperidae tem como uma de suas principais características a presença de um aparelho inoculador de veneno altamente especializado e eficiente na captura de presas e defesa contra predadores. A dentição destas serpentes é do tipo solenoglifodonte, que inclui um par de dentes maxilares extremamente grandes, pontiagudos com um canal interno onde o veneno é excretado. Este tipo de dentição, juntamente com a cinética craniana, formam um mecanismo complexo que permite uma grande abertura bucal, facilitando assim o posicionamento do dente em relação à presa (GOMES; PUORTO, 1993).

As serpentes do gênero *Bothrops* possuem um aparelho glandular de veneno altamente especializado composto por quatro regiões distintas: a glândula principal de veneno, o ducto primário, a glândula acessória e o ducto secundário, que se conecta com o canal do dente inoculador de veneno (GOMES; PUORTO, 1993). O aparelho glandular está localizado na região temporal, um em cada lado da cabeça, logo atrás dos olhos e diretamente abaixo do músculo compressor (MELGAREJO, 2003).

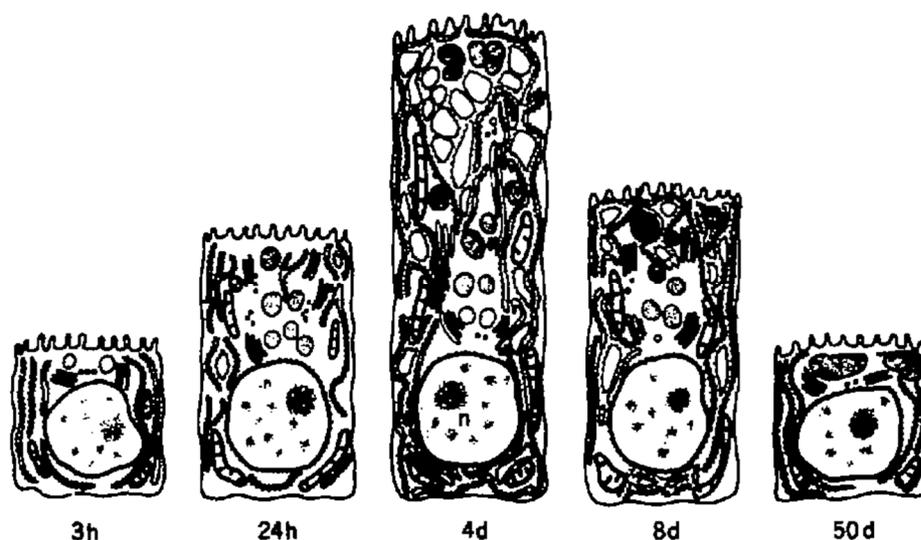
A glândula de veneno é envolta por um tecido conjuntivo e formada por epitélio secretor tubular ramificado, onde se encontram quatro tipos celulares: células escuras, células ricas em mitocôndrias, células horizontais e as células epiteliais secretoras, que são o tipo celular mais abundante na glândula, com cerca de 79% da composição do epitélio glandular (MACKESSY, 1991). Estudos envolvendo a glândula de veneno indicam que provavelmente ela tenha evoluído a partir de uma modificação de glândulas salivares e que seu aparecimento foi um fator importante para o sucesso ecológico das serpentes (KOCHVA et al., 1983). Fry e colaboradores (2005) estimaram que o aparato venenífero surgiu pela primeira vez há cerca de 200 milhões de anos na evolução dos membros da ordem Squamata. As glândulas de veneno de serpentes Viperidae possuem uma importante característica, onde a estocagem do veneno (produto de secreção) é feita no lúmen principal, diferentemente das glândulas de serpentes da família Elapidae e de mamíferos, onde o produto é estocado em vesículas secretoras intracitoplasmáticas (JAMIESON; PLADE, 1967a, b; KOCHVA, 1978).

## **1.2. Veneno e seu mecanismo de produção**

Os venenos de serpentes são os produtos de secreção de glândulas especializadas que evoluíram para a biossíntese de venenos. Como a maioria das proteínas secretadas, as proteínas de venenos são sintetizadas no citoplasma das células secretoras da glândula e transferidas para o retículo endoplasmático rugoso (RER), em seguida, ao aparelho de Golgi e, finalmente, transportadas através de grânulos de secreção para o lúmen da glândula de veneno (WARSHAWSKY et al., 1973). Dessa forma, os mRNAs de proteínas de venenos codificam uma sequência sinal que serve para que a proteína nascente possa reconhecer uma partícula sinalizadora chamada de *translocons* encontrada no retículo endoplasmático (RE). Por analogia com outras proteínas secretadas, é esperado que durante o transporte no RE a sequência sinal seja removida e no RER ocorra o dobramento e as modificações das proteínas nascentes do veneno, que sofrem formação de pontes dissulfeto, glicosilação, ou ainda multimerização (FOX; SERRANO, 2008).

O início da produção de veneno se dá após a redução do conteúdo estocado no lúmen da glândula, seja após extração manual de veneno ou após uma picada. O

início do ciclo de produção de veneno é evidenciado por algumas mudanças morfológicas e bioquímicas nas células secretoras. As glândulas de veneno no estado quiescente, que não sofreram extração de veneno por um longo período, estão repletas de venenos. Neste estado quiescente, as células secretoras estão na forma cuboide, as cisternas do RER estão estreitas e paralelas e o aparelho de Golgi está em repouso. Após a extração de veneno, a quantidade de veneno no lúmen diminui e as células secretoras passam para a forma colunar, as cisternas do RER se expandem e o veneno começa a ser sintetizado (BEN-SHAUL et al., 1971; KCHOVA, 1978; ZAGO, 1971; ORON; BDOLAH, 1973; DE LUCCA et al., 1974; BDOLAH, 1979; CARNEIRO et al., 1991; MACKESSY, 1991). A capacidade máxima de biossíntese pelas células secretoras ocorre aproximadamente quatro dias após a extração do veneno, quando as células alcançam sua altura máxima (KCHOVA, 1978, 1987; CARNEIRO et al., 1991) (Figura 1). A glândula de veneno está muito ativada nesse estágio do ciclo, porém poucas vesículas são encontradas nas células secretoras, pois todo material sintetizado é exocitado e estocado no lúmen glandular. Após este período, as células secretoras diminuem de tamanho e gradualmente voltam ao seu estado quiescente (BEN-SHAUL et al., 1971; ORON; BDOLAH, 1973).



**Figura 1** – Representação esquemática do ciclo de secreção de células da glândula de veneno de *Vipera palaestinae* (adaptado de KCHOVA, 1987).

Os venenos de uma maneira geral são constituídos por moléculas selecionadas durante o processo evolutivo das serpentes, que possuem alta afinidade a importantes componentes fisiológicos relacionados à neurotransmissão, hemostasia e integridade tecidual (MOURA-DA-SILVA et al., 2007). Estas misturas

complexas contêm componentes que agem de modo conjunto, destinados a afetar processos vitais, atuando no sistema nervoso, locomotor, cardiovascular, afetando a permeabilidade de membranas e a coagulação do sangue (KARLSSON, 1979). Deste modo, o veneno desempenha importantes papéis fisiológicos para as serpentes, sendo o fator responsável pela subjugação das presas, constituindo mecanismo de defesa contra predadores e iniciando a digestão das presas (GANS; ELLIOT, 1968; THOMAS; POUGH, 1979; MACKESSY, 1993). Quando acidentalmente inoculados em seres humanos, desencadeiam um sério agravo à saúde, conhecido por envenenamento ofídico.

### **1.3. Envenenamento ofídico**

O envenenamento ofídico, uma das doenças negligenciadas de maior mortalidade no mundo, apresenta aproximadamente 421.000 casos notificados ao ano, desses, cerca de 20.000 a 125.000 são fatais. Se considerarmos os casos não reportados, essa estatística poderia alcançar quase 2 milhões de envenenamentos, com mais de 90.000 casos fatais ao ano. Sua maior ocorrência é em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento (KASTURIRATNE, 2008; WILLIAMS et al., 2010).

No Brasil, os envenenamentos ofídicos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* são os mais importantes devido à alta frequência de acidentes. As serpentes desse gênero são responsáveis por 72,6% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (BRASIL, 2009). A espécie *Bothrops jararaca* distribui-se desde o sudeste da Bahia até a porção nordeste do Rio Grande do Sul, ocupando uma grande área do território nacional. Sendo assim, *B. jararaca* é uma das espécies de serpentes brasileiras de maior distribuição geográfica, sendo encontrada em regiões de Mata Atlântica até regiões abertas e áridas, com domínios predominantemente de cerrado (CAMPBELL; LAMAR, 1989; CARRASCO et al., 2012).

Esta vasta distribuição geográfica e a concentração demográfica das áreas onde habita fazem com que a *B. jararaca* seja responsável por cerca de 90% dos acidentes botrópicos no Brasil (RIBEIRO; JORGE, 1997; SANTORO et al., 2008). Apesar do baixo índice de letalidade, esses acidentes têm grande importância médica, uma vez que podem resultar em severas complicações locais, gerando

sequelas permanentes, como perda de função ou amputação do membro afetado (GUTIERREZ et al., 2007). Os sintomas e a gravidade dos envenenamentos vão depender da quantidade de veneno inoculada no paciente e da complexidade do veneno da serpente envolvida no acidente. Conforme Warrel (2010), os acidentes ofídicos são considerados uma doença ocupacional, atingindo principalmente trabalhadores rurais. A prevalência é em homens, atingindo o sexo masculino em 70 % dos casos. Em mais de 50 % das notificações, há variação de idade entre 15 a 49 anos, faixa etária onde se concentra a força de trabalho.

#### **1.4. Venenos ofídicos**

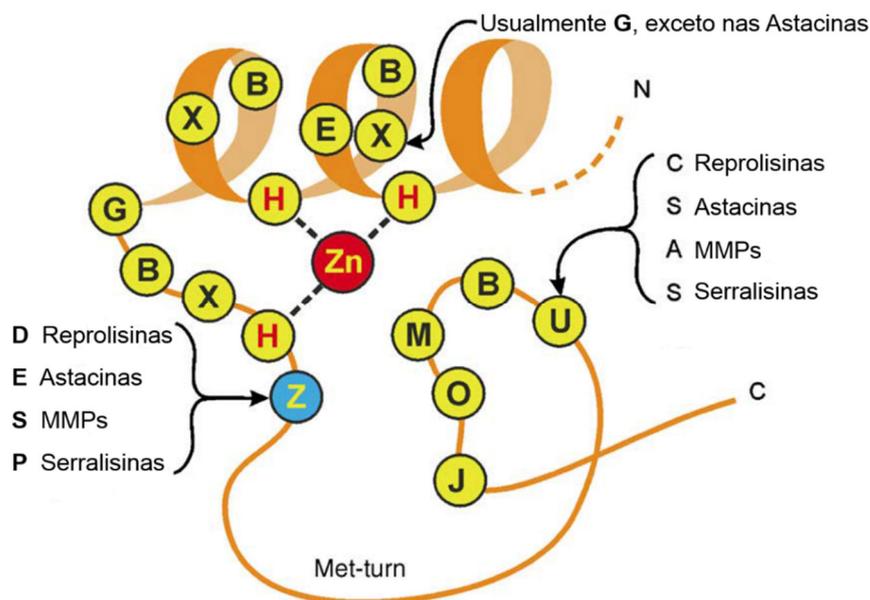
Os venenos estão em constante processo evolutivo. A duplicação e a divergência de genes parecem ser umas das principais causas de substituições de nucleotídeos, levando ao aparecimento de isoformas de toxinas. Este processo, conhecido como evolução acelerada, é um dos principais fatores que norteiam a diversificação dos venenos e as ações das toxinas frente a diferentes alvos/presas (MOURA-DA-SILVA et al., 1997; OHNO et al., 2003; LI et al., 2005a, b). Os componentes mais frequentemente encontrados no proteoma de *B. jararaca* são: metaloproteinases, fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), serinoproteinases, lectinas tipo-C, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs) e L-aminoácido oxidase (SOUSA et al., 2013). Dentre as diversas classes de toxinas encontradas nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, as metaloproteinases de veneno de serpentes (SVMPs – Snake Venom MetalloProteinases) ocupam um papel de grande relevância, principalmente nos distúrbios hemostáticos induzidos por esses venenos.

#### **1.5. Metaloproteinases**

Metaloproteinases são hidrolases dependentes de zinco distribuídas entre todos os organismos vivos. Estas enzimas são importantes na degradação ou digestão de proteínas e também são responsáveis pela hidrólise controlada de ligações peptídicas, sendo fundamentais em vários processos, tais como o desenvolvimento embrionário, a formação do osso, o reparo e a manutenção de

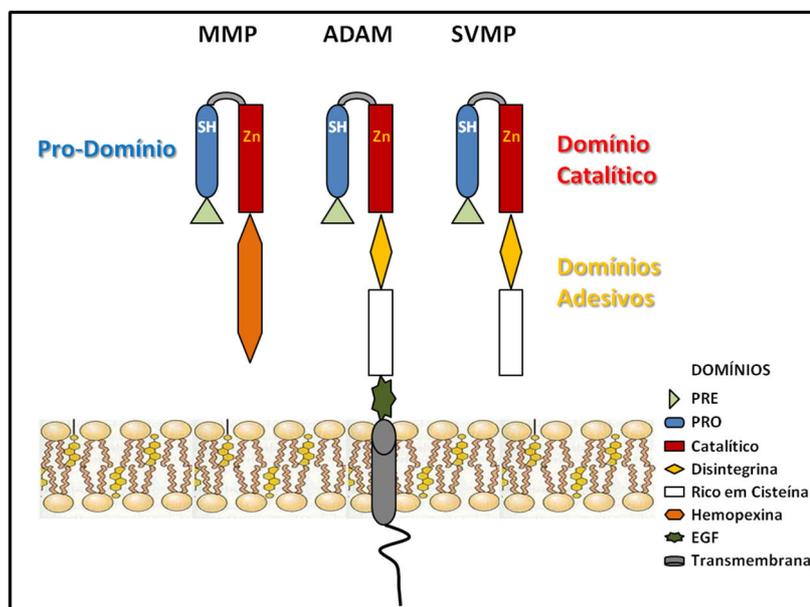
tecidos, entre outros (GOMIS-RÜTH, 2003). A desregulação de tais mecanismos conduz a diferentes patologias, como artrite e câncer. Além disso, as metaloproteinases também podem atuar como fatores de virulência durante a infecção microbiana, como tétano e toxinas do botulismo e também estão envolvidos no envenenamento humano por serpentes (HOOPER, 1994; GOMIS-RÜTH, 2009)

Hidrolases dependentes de zinco são divididas em 4 grupos, de acordo com seu motivo de ligação ao zinco. As zincinas possuem uma curta sequência consenso de aminoácidos, HEXXH, e constituem o maior grupo, subdividido em gluzincinas, aspzincinas e metzincinas (BODE et al., 1993; HOOPER, 1994; STÖCKER; BODE, 1995). O subgrupo das metzincinas contém proteínas com vários domínios: o pró-domínio localizado na porção N-terminal está envolvido na manutenção da latência do domínio catalítico subsequente e, posterior ao domínio catalítico, se encontram domínios envolvidos em interações proteína-proteína e proteína-célula, dentre outras funções (GOMIS-RÜTH, 2003). O pró-domínio age através de um mecanismo conhecido como *cysteine-switch* para manter a latência da enzima; o domínio catalítico é caracterizado por uma porção C-terminal estendida ao motivo de ligação ao zinco, HEXXHXXGXX(H/D), com uma glicina característica e uma terceira histidina ou aspartato que agem no sítio de ligação ao zinco. Além disso, uma metionina está presente numa alça abaixo do sítio ligante de zinco, na direção C-terminal (*met-turn*), que estabiliza os três resíduos de histidina envolvidos na catálise (BODE et al., 1993; STÖCKER et al., 1995) (Figura 2).



**Figura 2** – Representação esquemática da estrutura do sítio ativo das metaloproteinases da família das metzincinas (Adaptada de FOWLKES; WINKLER, 2002).

As metzincinas incluem metaloproteínas importantes, como as metaloproteínas de matriz (MMPs – *matrix metalloproteinases*), ADAMs (*disintegrin and metalloproteinase*) uma metaloproteínase e desintegrina, ADAMTS (*disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) uma metaloproteínase e desintegrina com motivo de trombospondina e as metaloproteínas de veneno de serpentes (SVMPs – *snake venom metalloproteinase*) (HOOPER, 1994). As SVMPs, ADAMs e MMPs apresentam homologia estrutural e funcional no domínio metaloproteínase e, em alguns casos, nos domínios localizados na porção carboxi-terminal subsequente (FOX; SERRANO, 2008). As análises dos cDNAs (*Complementary Deoxyribonucleic Acid*) e das sequências proteicas das SVMPs demonstraram que este grupo de enzimas está relacionado com as MMPs e ADAMs, originando-se a partir de um gene ancestral comum. A origem das SVMPs foi inferida ter ocorrido através do recrutamento, duplicação e nova funcionalidade por uma seleção positiva darwiniana de um gene que codifica um ancestral intimamente relacionado a ADAM-7 ou -28 (MOURA-DA-SILVA et al., 1996a; CASEWELL, 2012). A Figura 3 é uma representação onde é possível compreender como as MMPs, ADAMs e SVMPs são estruturalmente muito similares.



**Figura 3** – Representação estrutural das MMPs, ADAMs e SVMPs (neste caso a SVMP representada se refere a uma SVMP de classe P-III), nota-se que em ambas as proteínas o pró-domínio está diretamente ligado ao domínio catalítico mantendo a latência da enzima.

As MMPs são importantes para a remodelação e desintegração da matriz extracelular (MEC) durante a invasão tumoral e metástases, a angiogênese, a cicatrização, inflamação e infecções. Elas não só degradam macromoléculas da

MEC, mas também contribuem indiretamente modulando as reações imuno-inflamatórias para a ativação ou a liberação extracelular de vários ligantes de morte celular e citocinas (OKAMOTO et al., 2004; MURPHY; NAGASE, 2008).

As ADAMs são uma família de glicoproteínas transmembrânicas que desempenham papéis importantes na regulação do fenótipo celular através de seus efeitos sobre a migração celular, adesão, sinalização e proteólise. Esta família de metaloproteinase é, portanto, importante para muitos processos de controle na homeostase e desenvolvimento, e não surpreendentemente elas estão ligadas a processos patológicos quando suas funções são desreguladas, incluindo a doença de Alzheimer, a asma, doenças cardiovasculares e câncer (EDWARDS et al., 2008).

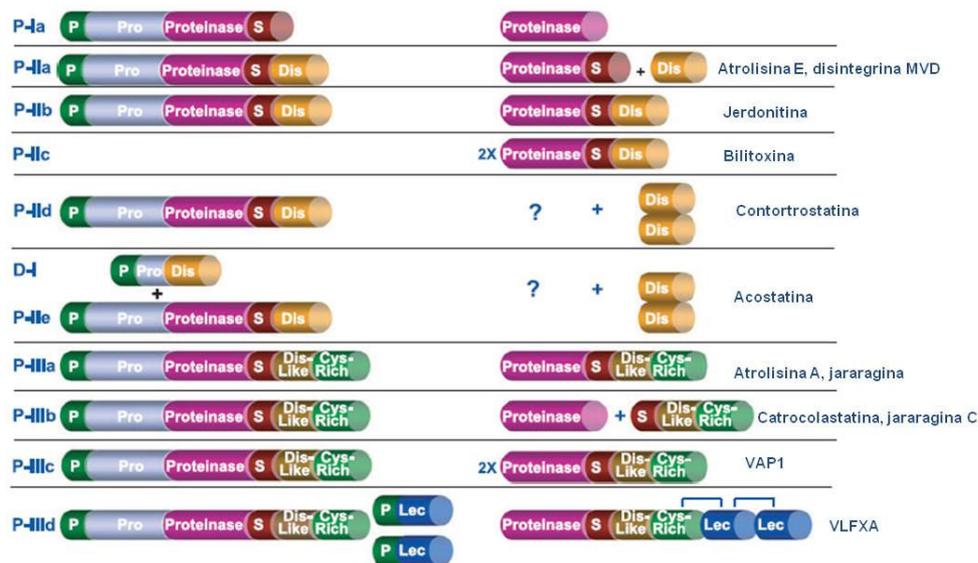
O papel regulador das MMPs e ADAMs em tais eventos é controlado por mecanismos precisos de expressão gênica, compartimentalização em vesícula ou acumulação pericelular, ativação e inativação de pró-enzimas, afinidade e disponibilidade de substratos (RA; PARKS, 2007). As MMPs são principalmente secretada como formas precursoras inativas (pró-MMP) e necessitam de ativação extracelular por proteólise limitada catalisada por membros da cascata de plasminogênio/plasmina, de outras MMPs, ou ainda por modificação química do resíduo conservado de cisteína no domínio auto inibitório que permite a ativação do sítio catalítico por um mecanismo conhecido como *cysteine switch* e a remoção do pró-domínio por um evento de auto proteólise (VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990; OKAMOTO et al., 2004; TALLANT et al., 2010).

As ADAMs também são sintetizadas como zimogênios (SCHLÖNDORFF; BLOBEL, 1999), mas nesta família, o pró-domínio é geralmente removido intracelularmente na via secretora (trans-Golgi) por proteínas pró-convertases (LUM et al., 1998). Entretanto, também há evidências de que a ativação de ADAM-8 e -28 podem estar envolvidas em um mecanismo auto catalítico (HOWARD et al., 2000; SCHLOMANN et al., 2002). Pró-domínios isolados das ADAMs podem atuar como potentes inibidores seletivos das formas ativas maduras das ADAMs, conforme tem sido documentado para a ADAM-10 e ADAM-17 (GONZALES et al., 2004; MOSS et al., 2007). Estudos sugerem também que sejam funções do pró-domínio das ADAMs atuar como chaperona e proteger as enzimas de degradação no sistema secretor das células (ANDERS et al., 2001; MILLA et al., 2006). Para a ADAM-12 foi observado que o pró-domínio clivado se liga de forma não covalente à forma madura

da molécula no espaço extracelular, adotando uma estrutura “trevo de quatro folhas” em que um dos quatros domínios globulares é o pró-domínio (WEWER et al., 2006). Assim, o pró-domínio das ADAMs pode ter funções múltiplas para a manutenção de latência e estabilidade, garantindo dobramento adequado e entrada para a via secretória, e talvez também atue em interações funcionais no exterior da célula (EDWARDS et al., 2008).

As SVMPs são as enzimas mais abundantes do veneno de *Bothrops jararaca* (SOUSA et al., 2013), responsáveis por várias ações locais e sistêmicas causadas no envenenamento. Essas enzimas agem sobre os fatores da cascata de coagulação (WHITE, 2005), induzem a inibição da agregação plaquetária (HUANG et al., 1993; KAMIGUTI et al., 1996a), hemorragia (ESCALANTE et al., 2011), e apoptose de células endoteliais (DÍAZ et al., 2005; TANJONI et al., 2005). As SVMPs também são responsáveis por uma intensa reação inflamatória, causando a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (MOURA-DA-SILVA et al., 2007), desempenhando assim um papel importante na patologia causada por acidentes ofídicos. As SVMPs também participam dos efeitos locais do envenenamento, promovendo um quadro de hemorragia, um dos efeitos mais graves do envenenamento botrópico, que ocorre principalmente no local da picada e contribui para o efeito isquêmico e regeneração tecidual incompleta, mas também pode ocorrer de maneira sistêmica, afetando diversos órgãos resultando em sérias complicações, tais como choque cardiovascular, hemorragia pulmonar e hemorragia cerebral, que são sintomas associados à letalidade desses venenos (CARDOSO et al., 1993; WARREL, 1995; OTERO et al., 2002).

As SVMPs são sintetizadas como precursores latentes multimodulares compostos por combinações dos domínios de peptídeo sinal, pró-domínio, metaloproteinase, disintegrina ou tipo-disintegrina, rico em cisteínas e tipo lectina. Essas moléculas precursoras sofrem diferentes etapas de processamento proteolítico que resultam em moléculas cataliticamente ativas ou em domínios não catalíticos livres, conhecidos como disintegrinas. Possuem massa molecular entre 20 e 110 kDa e, segundo Fox e Serrano (2008), são divididas em classes e subclasses (Figura 4), de acordo com a presença desses domínios nas moléculas precursoras (através das sequências dos cDNAs) e maduras (proteínas isoladas dos venenos).



**Figura 4** – Classificação das SVMPs. As SVMPs são sintetizadas na forma latente como precursores multimodulares que sofrem diferentes estágios de processamento. **P**: pré-domínio, **Pro**: pró-domínio, **Proteinase**: domínio metaloproteínase, **S**: sequência de aminoácidos entre o domínio catalítico e disintegrina ou tipo-disintegrina, **Dis**: disintegrina, **Dis-Like**: domínio tipo-disintegrina, **Cys-Rich**: domínio rico em cisteínas, **Lec**: domínio ligante de lectina (Adaptado de FOX; SERRANO, 2008).

As SVMPs da classe P-I são representadas por enzimas que apresentam somente o domínio catalítico (domínio metaloproteínase). As enzimas pertencentes a classe P-II são subdivididas em 5 subclasses (P-IIa a P-IIe): a P-IIa é sintetizada com o domínio metaloproteínase e o domínio disintegrina e, após sofrer uma modificação pós-traducional, gera duas moléculas diferentes; uma proteínase estruturalmente semelhante a P-Ia e uma disintegrina. As subclasses P-IIb e P-IIc apresentam os dois domínios unidos, porém na P-IIc esta proteína se apresenta na forma dimérica. As SVMPs da subclasse P-IId apresentam a estrutura canônica da classe P-IIa, ou seja, são estruturas prováveis, porém o domínio metaloproteínase nunca foi observado no veneno, e a formação de disintegrinas homodiméricas ocorre por modificações pós-traducionais. As disintegrinas heterodiméricas correspondem a subclasse P-IIe.

As SVMPs de classe P-III são subclassificadas em P-IIIa a P-IIId. As P-IIIa são constituídas por proteínas que possuem, além do domínio metaloproteínase, mais dois domínios: tipo-disintegrina e rico em cisteínas. A subclasse P-IIIb é caracterizada por serem encontradas de duas maneiras no veneno: na forma incólume (com todos os domínios, semelhante a P-IIIa) ou na forma processada por autólise, onde os domínios metaloproteínase e tipo-disintegrina e rico em cisteínas encontram-se separados. As proteínas da subclasse P-IIIc são semelhantes aos

membros da subclasse P-IIIa, porém sofrem oligomerização, apresentando-se na forma de dímeros. Os membros da subclasse P-IIIb possuem estrutura semelhante aos membros da subclasse P-IIIa, contudo apresentam dois domínios tipo-lectina unidos, de forma covalente, ao domínio rico em cisteínas.

Assim como as MMPs e as ADAMs, as SVMPs também são sintetizadas como zimogênios e o seu pró-domínio consiste em média, de 200 aminoácidos ácidos com uma sequência conservada, também presente no pró-domínio de MMPs e ADAMs, relacionada ao mecanismo de *cysteine-switch*. Esse processo controla o estado de ativação de enzimas, bloqueando o sítio catalítico (estado inativo) e o processamento proteolítico do pró-domínio (estado ativo) (BODE et al., 1993; STÖCKER; BODE, 1995). O domínio metaloproteinase das SVMPs conserva as principais estruturas funcionais das MMPs e das ADAMs. Sua ação catalítica está relacionada às suas principais atividades, como a indução da hemorragia, ativação de componentes de coagulação, apoptose de células endoteliais e parte de sua ação pró-inflamatória (MOURA-DA-SILVA et al., 2007).

O domínio disintegrina pode ser encontrado na forma livre nos venenos de viperídeos, sendo conhecidos como as disintegrinas clássicas. Estas moléculas são capazes de interagir com integrinas  $\alpha_{2b}\beta_{III}$  com alta afinidade através da sequência RGD consistindo-se em potentes inibidores da agregação plaquetária (HUANG et al., 1993). No entanto, substituições no tripeptídeo RGD tais como ECD, MLD e KTS também foram descritas mudando a afinidade dessas moléculas para outras integrinas e conferindo-as novas atividades biológicas (CALVETE et al., 2005). O domínio rico em cisteínas, assim como o domínio disintegrina possui alta densidade de resíduos de cisteínas e está relacionado com propriedades adesivas a componentes plasmáticos e de matriz extracelular (SERRANO et al., 2006).

Pouco se sabe como a ativação dessas pró-enzimas ocorre. Alguns autores sugerem que o pró-domínio, responsável pela latência dessas enzimas, seria processado em vias secretoras ainda nas células produtoras de veneno, assim, as SVMPs seriam segregadas em sua forma ativa (BJARNASON; FOX, 1994; HITE et al., 1994; SHIMOKAWA et al., 1996), como ocorre com as ADAMs (LUM et al., 1998). Ainda assim, sequências relacionadas com o pró-domínio de SVMPs foram detectadas no veneno (VALENTE et al., 2009), sugerindo que o processamento proteolítico das pró-SVMPs pode ocorrer em compartimentos extracelulares da

glândula de veneno, na sequência de um modelo semelhante ao que ocorre nas MMPs. A manutenção destas enzimas em forma inativa no interior do lúmen da glândula de veneno seria uma característica muito importante para proteger as células epiteliais da glândula de veneno e outras proteínas do veneno da hidrólise causada por SVMPs ativadas. Atualmente é aceito que o pH ácido do lúmen da glândula de veneno ou vesículas secretoras dão origem a um ambiente que pode limitar a atividade proteolítica e também que tripeptídeos de pirol-glutamato encontrados no veneno possam inibir SVMPs já ativadas (MACKESSY; BAXTER, 2006; MARQUES-PORTO et al., 2008). Entretanto, a secreção de SVMPs para o lúmen da glândula como zimogênios também seria um importante mecanismo de manutenção da latência destas enzimas. Desta forma, a ativação das SVMPs poderia seguir caminhos semelhantes como as MMPs, passando por ativação extracelular no lúmen da glândula de veneno, glândulas acessórias ou no ducto que liga a glândula de veneno para as presas.

Neste estudo, esta questão foi abordada por diferentes métodos imunquímicos e técnicas proteômicas, que permitiram a identificação de zimogênios em pontos distintos do ciclo de produção de veneno mais observados nas vesículas secretoras de células secretoras de veneno. Além disso, sugere-se que a ativação das SMVPs difere das ADAMs e MMPs, mas pode ser utilizada como um modelo para o estudo da relevância dos peptídeos resultantes do processamento de pró-domínio e degradação para o controle da atividade dessas metaloproteinases.

## 2. OBJETIVOS

Determinar a localização tecidual e os períodos do ciclo de produção de veneno onde ocorre o processamento das SVMPs.

### 2.1. Objetivos específicos

- 1) Clonar e expressar o pró-domínio correspondente de uma SVMP classe P-III do veneno de *Bothrops jararaca*.
- 2) Produzir anticorpos policlonais contra este pró-domínio recombinante.
- 3) Identificar por *western blotting* e por espectrometria de massas a presença dos pró-domínios ou seus fragmentos em amostras de veneno e frações de glândulas de veneno coletadas de *Bothrops jararaca*.
- 4) Compreender a localização tecidual e celular dos pró-domínios processados ou ainda complexados, com o uso de técnicas de imunohistoquímica e imunoeletromicroscopia, em cortes de glândulas de veneno.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens bacterianas

Todas as cepas utilizadas neste trabalho foram amplificadas a partir do banco de células do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan. São elas:

- **DH5 $\alpha$** : *supE44  $\Delta$ alcU169( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyra96 thi-1 relA1*. Estas cepas foram usadas para todas as etapas de clonagem da proteína recombinante.
- **BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3)pLysS**: *F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (Cam<sup>R</sup>)*. Estas células contêm uma inserção cromossômica do gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor proU (BHANDARI; GOWRISHANKAR, 1997).

Bactérias contendo a designação (DE3) indicam que o hospedeiro é um lisógeno do fago  $\lambda$ DE3, portanto, carrega uma cópia do gene da T7 RNA polimerase em seu cromossomo sob o controle do promotor *lacUV5*, induzível por IPTG. A designação pLysS é dada para as bactérias carregando plasmídeos compatíveis que codificam a lisozima T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase, que tem por finalidade promover melhor controle da expressão enquanto o IPTG não é adicionado no meio de cultura.

#### 3.2. Vetor

Para a clonagem e expressão da proteína recombinante foi utilizado o vetor pAE, um plasmídeo de 2.850 pb derivado do pRSET A da Invitrogen (Invitrogen, Grand Island, N.Y., U.S.A.), do qual foi removido o gene T7 10 líder. Além disso, teve o epítipo Xpress<sup>TM</sup> removido, que tinha a função de permitir a detecção da proteína de fusão com anticorpo contra este epítipo (RAMOS et al., 2001).

### 3.3. Meios de cultura

Os meios utilizados nas culturas de bactérias foram o LB e o LB/Agar. O meio LB é um meio líquido bastante usado em experimentos de cultura e expressão de proteínas recombinantes em bactérias e é composto por 10 g de triptona; 5 g de extrato de levedura; 10 g de cloreto de sódio (NaCl) para 1 litro de meio de cultura. Deve-se dissolver os substratos do meio em água destilada e ajustar seu pH para 7,2 com NaOH 1 N; feito isso, é necessário autoclavar por 20 minutos a 121 °C para deixá-lo estéril.

Para as placas de meio LB/Agar utilizou-se o mesmo meio LB descrito anteriormente e adiciona-se 1,5% de ágar. Após dissolver bem, o meio é autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Após a autoclavagem, quando a temperatura do meio estiver por volta de 50 °C, é necessário adicionar ampicilina a uma concentração final de 100 µg/mL. Neste caso é usada a ampicilina, pois o vetor pAE confere resistência a esta droga para as bactérias que foram transformadas com este vetor.

### 3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para clonagem do pró-domínio

Para a clonagem do pró-domínio no vetor pAE foi realizada a amplificação por PCR do fragmento do cDNA respectivo utilizando 100 ng de cDNA extraído de glândulas de veneno de serpentes *Bothrops jararaca* adultas, gentilmente cedido pelo Dr. Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan. Os *primers* utilizados para a amplificação dos cDNAs foram desenhados de acordo com a sequências depositadas no GenBank das metaloproteinases jararagina (acesso no GenBank X68251.1) e bothropasina (acesso no GenBank AF056025.2), e consistem das seguintes sequências:

➤ *Primer* senso jararagina (sítio de *Bam*HI em negrito)

5' – TAAT**GGATCC**GCAACGAGGCCCAAAG – 3'

➤ *Primer* senso bothropasina (sítio de *Bam*HI em negrito)

5' – GACT**GGATCC**CATAATCCTGGAATCTGG – 3'

➤ *Primer* antisense jararagina/bothropasina (sítio de *EcoRI* em negrito)

5' – TAT**GAATTCT**TAAGCAGTAAAAGCTAACTGAG – 3'

Para a amplificação foi utilizada a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) que possui alta fidelidade na cópia das sequências. Os reagentes e as concentrações foram utilizadas conforme especificação do fabricante. As condições de ciclagem no termociclador (Perkin-Elmer-2400) foram de 94 °C para a desnaturação do DNA (2 minutos no início do PCR e para cada ciclo 30 segundos), 55 °C para o anelamento dos *primers* (30 segundos por ciclo) e 68 °C para a extensão do DNA (45 segundos por ciclo), em um total de 35 ciclos.

### 3.5. Digestão do DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas em volume de 25 µL, e continham em geral 4 µg de DNA, 2 unidades da enzima de restrição *BamHI* ou *EcoRI* (Fermentas Inc., Burlington, Ontario, Canadá), tampão da enzima (de acordo como especificado pelo fabricante) e água livre de *DNase* e *RNase* para o ajuste do volume. Os produtos da reação foram então incubados por 4 horas à temperatura de 37 °C.

### 3.6. Reação de ligação

As concentrações de DNA (vetor: inserto) utilizadas variaram de acordo com o experimento realizado, sendo normalmente utilizada uma razão molar de 1:3. A reação de ligação foi efetuada utilizando 2 U de T4 DNA ligase da New England Biolabs (New England Biolabs Inc., Beverly, M, U.S.A.) e tampão da ligase (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditiotreitól, 1 mM ATP, 25 µg/mL BSA). O volume foi completado para 15 µL com água “*DNase* e *RNase free*” e após incubação a 15 °C por 16-20 horas, uma alíquota de 5 µL foi utilizada para transformar *E. coli* DH5α competentes por cloreto de cálcio.

### 3.7. Preparação de *E. coli* competentes por cloreto de cálcio e transformação

Uma colônia da bactéria *E. coli* foi inoculada em 5 mL de meio LB, e incubada por 12 a 16 horas com agitação de 250 rpm a 37 °C. No dia seguinte, adicionou-se 1 mL dessa cultura a 100 mL de meio LB e incubou-se com agitação de 250 rpm a 37°C até que a densidade óptica em 600 nm (DO<sub>600</sub>) estivesse em torno de 0,6.

A partir desta etapa, manteve-se a cultura no gelo para estacionar a divisão celular e, em seguida, adicionou-se cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) para a concentração final de 1 mM e deixando então em repouso por 15 minutos. Após este período, dividiu-se a cultura em tubos de 50 mL previamente gelados e centrifugou-se a 2.300 g por 10 minutos a 4 °C. Cada *pellet* foi ressuspendido em 20 mL de solução RFI (Quadro 1) e deixou-se em repouso por 15 minutos no gelo. Após isto, centrifugou-se a 2.300 g por 10 minutos a 4 °C e descartou-se o sobrenadante, cada *pellet* foi ressuspendido com 1 mL de RFII (Quadro 2).

Quadro 1 – Solução RFI	
Reagentes	Concentração Final
Cloreto de Potássio	100 mM
Cloreto de Manganês	50 mM
Acetato de Potássio	30 mM
Cloreto de Cálcio	10 mM
Glicerol	15%

Quadro 2 – Solução RFII	
Reagentes	Concentração Final
Cloreto de Potássio	10 mM
Na-MOPS (pH:7,0)	10 mM
Cloreto de Cálcio	75 mM
Glicerol	15%

Uma vez preparadas, as bactérias foram mantidas a -80 °C. Para a transformação, um microtubo contendo 50 µL da bactéria competente foi descongelado em gelo por 5 minutos e adicionado em torno de 25 ng do plasmídeo

de interesse. Deixou-se em gelo em repouso por 30 minutos, depois o microtubo foi colocado em banho Maria a 42 °C por 1 minuto e após este tempo colocado em gelo por 5 minutos.

Decorrido este tempo, adicionaram-se 500 µL de meio LB, e levou-se a estufa a 37 °C com 250 rpm de agitação por 30 minutos. 100 µL dessa cultura foram adicionados à placa LB ágar com o devido antibiótico. No caso de ligação, o microtubo foi centrifugado a 3000g por 3 minutos e ressuspenso em 100 µL e todo este conteúdo foi adicionado à placa LB ágar com antibiótico.

### **3.8. Extração dos plasmídeos e purificação de DNA**

A extração dos plasmídeos das bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  foi realizada utilizando o kit *Wizard® Plus Minipreps* da Promega (Promega Corporation, Madison, W.I., U.S.A.). A purificação dos fragmentos de PCR do gel de agarose e a limpeza dos produtos de digestão por enzimas de restrição foram realizados com o kit *Wizard® PCR Preps* (Promega). Todos estes processos foram realizados seguindo a orientação do fabricante.

### **3.9. Seleção dos clones positivos por PCR**

Para selecionar os clones que apresentavam o fragmento gênico referente ao pró-domínio foi também utilizado o PCR, utilizando os *primers* senso e antisenso das extremidades de cada sequência já descritos anteriormente. Neste caso, foi utilizada a enzima *Taq* polimerase da Invitrogen. As colônias foram coletadas, inoculadas em 50 µL de meio LB e incubadas a 37 °C por 2 horas. Para a reação foi utilizado 5 µL dessa cultura para um volume final de 25 µL da reação de PCR.

### **3.10. Sequenciamento do pró-domínio clonado no vetor pAE**

Após a obtenção do clone do pró-domínio no vetor pAE, este foi submetido ao sequenciamento utilizando-se o kit “*ABI Prism® Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*” da Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) que combina a *AmpliTaQ®* DNA Polimerase, terminadores *BigDye*

e dNTPs. Para cada reação de sequenciamento foi utilizado somente um *primer*, como o sequenciamento geralmente fornece uma sequência de aproximadamente 450 pb, foram utilizados os *primers* senso ou antisenso correspondentes ao inserto a ser sequenciado.

Seguindo as orientações do fabricante, foram misturados em cada microtubo 2,0 µl de *BigDye*, 1,6 pmol de *primer*, 300 ng de DNA plasmidial, 6,0 µl tampão *Save Money* (Tris 200 mM pH 9,0 e 5 mM MgCl<sub>2</sub>) e água Milli-Q para um volume final de 20 µl. Posteriormente, as reações foram colocadas no termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (*Perkin-Elmer*), utilizando a ciclagem especificada pelo fabricante.

Ao término da reação, procedeu-se a purificação dos produtos amplificados conforme orientação do fabricante e posteriormente realizou-se a leitura da sequência de nucleotídeos no sequenciador automático *ABI 3100* da Applied Biosystems, utilizando eletroforese capilar. As sequências foram analisadas e alinhadas utilizando o programa *DnaStar SeqMan<sup>TM</sup>II*. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan.

### **3.11. Expressão da proteína recombinante em *E. coli***

Uma vez preparadas para competência pelo método do cloreto de cálcio como anteriormente descrito, as bactérias BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) pLysS foram transformadas com o plasmídeo de interesse e semeadas em LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, respeitando a marca de seleção presente no vetor. Feito isso as bactérias foram incubadas por 16 horas. Depois uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB (pré-inóculo) suplementado de 100 µg/mL de ampicilina/cloranfenicol, e colocadas a 37 °C sob agitação de 250 rpm também por 16 horas.

No dia seguinte uma alíquota do pré-inóculo foi adicionada em meio LB suplementado com a mesma concentração de antibióticos (inóculo). A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm até chegar à fase crescente logarítmica (DO<sub>600</sub>= 0,6). Neste momento foram adicionados 1 mM de IPTG à cultura, as amostras foram mantidas por 4 horas a 37 °C, e posteriormente centrifugadas e o *pellet* guardado a -20°C para posterior purificação da proteína recombinante.

### **3.12. Extração de proteína recombinante das bactérias *E. coli***

O *pellet* obtido da expressão, foi ressuspendido em 0,1 volumes de tampão PBS ou Tris-HCl 20 mM pH 8,0. As bactérias foram submetidas à lise por ultrassom (sonicação). Utilizou-se uma amplitude de 70 e pulso de 5 segundos durante 8 minutos. Os produtos sonicados foram centrifugados a 10.000 g por 15 minutos e o sobrenadante estocado a -20 °C até a purificação. Importante ressaltar que durante todo o procedimento, os frascos contendo as bactérias permaneceram em gelo.

### **3.13. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)**

Para a purificação das proteínas recombinantes foi utilizado o método de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (PORATH; OLIN, 1983). Para cada 400 mL de meio de cultura (expressão) utilizou-se em média 3 mL de resina (*Ni Sepharose™ High Performance* – GE Healthcare) em tubos Falcon (BD Biosciences, Canaan, CT, U.S.A.) de 15 mL. A resina foi lavada 3 vezes com 10 mL do tampão de equilíbrio 1X (50 mM fosfato de sódio; 300 mM NaCl; pH:7,0). A amostra (sobrenadante do sonicado) foi aplicada na resina e incubada por pelo menos 40 minutos. Após a incubação realizou-se 4 lavagens de 10 minutos com o tampão de lavagem (50 mM fosfato de sódio; 300 mM NaCl; 40 mM de imidazol; pH:7,0). A proteína foi então eluída com o tampão de eluição (50 mM fosfato de sódio; 300 mM NaCl; 1 M de imidazol; pH 7,0), deixando a resina incubando com este tampão por 30 minutos (foi utilizado 1,5 a 2,0 mL do tampão).

Todo o procedimento foi realizado em tubo falcon de 15 mL. Todas as centrifugações realizadas durante todo o processo foram de 4 minutos à 700 g.

### **3.14. Extração de veneno e das glândulas de veneno de *Bothrops jararaca***

A extração dos venenos e das glândulas de veneno das serpentes *Bothrops jararaca* foi realizada no Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan com a pesquisadora Dra. Norma Yamanouye segundo procedimentos aprovados pela

Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), registro nº 736/10. As serpentes ficaram condicionadas em Biotério apropriado com condições ambientais controladas: foto período de 12 horas, temperatura entre 21 e 27°C e umidade relativa do ar de aproximadamente 65%. Todas as serpentes permaneceram por 40 dias sem alimentação para que as células secretoras de veneno estivessem todas no estado quiescente (Tempo zero). Água foi fornecida *Ad libitum*.

Para a obtenção dos venenos em dias diferentes do ciclo de produção de veneno foi realizada a extração manual do veneno (BELLUOMINI, 1968) da glândula quiescente das serpentes e após 4, 7, 10, 14 ou 21 dias foi feita uma nova coleta. Em uma das serpentes, foi coletado apenas o veneno da glândula quiescente. Para a extração dos venenos as serpentes foram anestesiadas com Pentobarbital Sódico em uma concentração de 30 mg/Kg. Nas extrações do veneno foi tomado o cuidado em coletar o veneno de uma glândula com a presença de inibidores de proteases e o veneno da outra glândula na ausência de inibidores de proteases.

Ao final da extração dos venenos as serpentes foram sacrificadas e foi feita a dissecação da mesma para a sua remoção. Cada glândula foi coletada em 1 mL tampão de lise (7M de Uréia; 2M de Tiouréia; 5mM de DTT), uma glândula na presença de inibidores de proteases e a outra glândula na ausência de inibidores de proteases. As glândulas foram picotadas com o auxílio de uma tesoura e posteriormente maceradas rigorosamente com o auxílio de um homogeneizador de vidro. Após esta etapa esta solução foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 g para separação da fração solúvel (chamada de extrato proteico da glândula de veneno) da fração insolúvel.

Todas as amostras foram estocadas a uma temperatura de – 80 °C até o momento do uso.

### **3.15. Dosagem de proteínas**

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A soroalbumina bovina (BSA) foi utilizada como padrão de referência. As amostras foram diluídas 1:100, 1:50 e 1:25 e 10 µl destas foram incubadas com 90 µl do reagente de Bradford por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a DO<sub>595</sub>

foi medida e a concentração de proteínas calculada a partir de uma curva padrão com BSA, utilizando o programa *GraphPad InStat 3*.

### **3.16. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS**

As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (LAEMMLI, 1970). As amostras analisadas (10 µg da proteína recombinante; 10 µL extrato bacteriano; 100 µg de veneno; 30 µg do extrato proteico da glândula de veneno) foram tratadas com tampão de amostra 6 vezes concentrado (300 mM de Tris pH 6,8; 10% de SDS; 30% de glicerol; 0,6% de azul de bromofenol; 600 mM de DTT), onde para cada 10 µL de amostra foram utilizados 2 µL de tampão de amostra 6 vezes concentrado e posteriormente foram fervidas em banho Maria por 5 minutos. O material foi então aplicado em um gel de empacotamento de 5% e gel de resolução de 12,5% de poliacrilamida e submetido à eletroforese em tampão de corrida (25 mM Tris; 0,1% SDS; 250 mM Glicina pH 8,3) com corrente constante de 35 mA (ou voltagem de 110V).

Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250.

### **3.17. Produção do soro anti-pró-domínio**

O soro anti-pró-domínio foi obtido pela imunização de camundongos BALB/c e também de coelhos. Para tanto, grupos de 5 camundongos fêmeas pesando 22 g foram imunizados com 10 µg da proteína recombinante adsorvida em 100 µg de hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) via intraperitoneal. Doses reforço foram dadas no 7°, 14° e 21° dias após a imunização inicial, com a mesma quantidade de proteína e adjuvante. No 21° dia após a primeira imunização, o animal sofreu uma sangria exploratória pela veia da cauda para a quantificação do título de anticorpos realizada por ELISA (Ensaio Imunoenzimático). No 28° dia foi realizada uma sangria final, sendo o soro separado por centrifugação e estocado à -20 °C até o uso. O Al(OH)<sub>3</sub> foi escolhido como adjuvante por apresentar a característica de induzir altos títulos de anticorpos, segundo Petrovsky; Aguilar (2004).

Os coelhos foram imunizados inicialmente com 200 µg de proteína recombinante adsorvida com o adjuvante Marcol-Montanide via intramuscular. Após

30 dias, foram administradas 3 doses de reforço de 100 µg da proteína recombinante adsorvida com o adjuvante Marcol-Montanide pela via intradérmica, com intervalos de 15 dias entre cada dose. Em todas as doses de reforço foram coletadas alíquotas de sangue para obtenção do soro, com o intuito de acompanhar a resposta imunológica através de ensaios de ELISA.

Para facilitar o entendimento, no texto o soro produzido em camundongos recebeu o nome de anti-PD-Jar<sub>m</sub> e o soro produzido em coelhos recebeu o nome de anti-PD-Jar<sub>r</sub>.

Antes de cada imunização foi coletada uma amostra de sangue para a obtenção do soro pré-imune. Estes protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), registro nº 736/10.

### **3.18. Determinação dos níveis de anticorpos por ELISA**

A técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) foi usada para determinar o título dos soros anti-pró-domínio (anti-PD-Jar<sub>m</sub> e anti-PD-Jar<sub>r</sub>) e também para testar a capacidade do soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> em reconhecer o pró-domínio em diferentes amostras, e realizada como descrito por Theakston e colaboradores (1977) com modificações.

As placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL/poço de uma solução contendo 10 µg/mL da proteína recombinante para a titulação dos níveis de anticorpos. Para testar a capacidade do soro em reconhecer o pró-domínio em amostras de veneno e glândula de veneno, as placas foram sensibilizadas com 10µg/mL de diferentes amostras sendo elas, a PD-Jar, o *pool* de veneno liofilizado, o extrato proteico da glândula de veneno ou o veneno colhido 7 dias após o início do ciclo de produção de veneno. Estas amostras foram diluídas em tampão alcalino de baixa força iônica (tampão carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6), e 100 µL foram adicionados a cada poço da placa de microtitulação, que foi então incubada na geladeira, em câmara úmida, *overnight*, para a sensibilização da placa. Após sensibilização, foram adicionados 200 µL da solução de bloqueio (tampão carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6 contendo 3% de BSA) em cada poço e armazenado na estufa a 37°C por 2h. Após esse procedimento, a placa foi

submetida a 3 lavagens sucessivas de 5 minutos cada uma, com tampão de lavagem (PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20). Para a titulação dos anticorpos, adicionaram-se ao primeiro poço 200 µL do soro imune (1:100) diluído em tampão de incubação (PBS pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 e 1% de BSA) e seguiu-se uma diluição seriada.

A placa foi então submetida à nova incubação por 1 hora a 37 °C, em câmara úmida. Após 3 lavagens, a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37 °C com 100 µL/poço de soro anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase, diluído 1:5.000 em tampão de incubação. Feito mais um ciclo de lavagens, a reação foi revelada pela adição de 100 µL/poço da mistura cromógena mais substrato da enzima (OPD 1 mg/mL em tampão citrato 0,2 M, pH 5,0 mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,06%). A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%. A intensidade da reação foi determinada por leitura da absorbância em comprimento de onda de 492 nm em um leitor de placas *Titertek Multiskan Plus*.

### **3.19. ELISA indireto para quantificação de pró-enzimas**

Para a quantificação de pró-enzimas, o método teve de ser padronizado e, após a padronização, a técnica foi aplicada para a quantificação de pró-domínio e jararagina (SVMP de classe PIII utilizada como correspondente das SVMPs).

O método foi realizado utilizando placas Maxisorp (*Nunc*<sup>TM</sup>) de 96 poços. Essa pesquisa foi feita em amostras de extrato proteico de glândula de veneno de serpentes *B. jararaca* cedidas pelo laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan em diferentes dias do ciclo de produção de veneno (40 dias (Quiescente) e 7 dias após a extração).

Para sensibilizar a placa, 100 µL do soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> foi utilizado em uma proporção de 1:100, para a quantificação de pró-enzimas e 100 µL do soro anti-jararagina produzido em coelhos, foi utilizado em uma proporção de 1:1000, para quantificação de enzimas ativas. Como diluente foi utilizado tampão carbonato, pH 9,6. A placa foi mantida a 4 °C em câmara úmida, por 18 horas.

Após a sensibilização, os poços foram bloqueados com 200 µL/poço de solução de bloqueio (tampão carbonato contendo 3 % de soroalbumina bovina), e a

placa foi mantida a 37 °C em câmara úmida, por 3 horas. A placa foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05 % de Tween 20).

Após a lavagem, 100 µL/poço dos antígenos foram acrescentados. Como curva padrão, as amostras obtidas de PD-Jar e jararagina foram utilizadas em concentrações diferentes. Para a pesquisa de pró-enzimas e enzimas ativas, foram utilizadas amostras de extrato proteico de glândula de veneno em concentrações diferentes. A placa ficou por 3 horas em câmara úmida, a 37 °C.

Foi realizado um novo processo de lavagem, igual ao anterior e 100 µL/poço do anticorpo primário foram adicionados. Como anticorpo primário, em busca de evitar um resultado falso-positivo, foram utilizados anticorpos diferentes dos utilizados na sensibilização em proporção de 1:500 para anti-PD-Jar, ou 1:1000 para anti-jararagina produzido em camundongos. A placa foi mantida em câmara úmida, à 4 °C por 18 horas. Após esse processo, uma nova etapa de lavagem foi realizada e o anticorpo conjugado com a enzima peroxidase foi adicionado em uma proporção de 1:2000 para ambos os anticorpos (anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo), a placa foi incubada à 37 °C por 2 horas. As diluições dos antígenos e dos anticorpos primários e conjugados foram feitas com BSA 1 % (PBS contendo 1 % de BSA).

Após um novo ciclo de lavagem, a reação foi revelada com 100 µL/poço do substrato cromógeno (1 mg/mL de OPD em tampão citrato 0,1 M pH 5,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V 0,15 %), por 10 minutos. A reação foi bloqueada com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 30 %. A leitura da densidade óptica foi efetuada em aparelho SpectraMax®M2e em comprimento de onda de 490 nm.

### **3.20. Western blotting**

As amostras testadas por *Western blotting* (WB) foram submetidas à eletroforese em gel contendo 12,5% de acrilamida por SDS-PAGE, como descrito no item 3.16 e eletrotransferidas em sistema semi-seco da Bio-Rad (*semi-dry system*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) para uma membrana de nitrocelulose da Amershan (*Hybond-ECL-nitrocellulose*, Amershan Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.). O tampão de transferência utilizado foi 0,94 M Tris-HCl; 330

mM glicina pH 8,8 contendo 10% de metanol. A transferência foi realizada sob uma corrente de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de gel por 1 hora.

Após a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S* (*Sigma*) para verificar a eficiência da transferência. Após a descoloração com água, as membranas foram incubadas por 18 horas a 4 °C com solução bloqueadora (20 mM Tris, pH 7,5 contendo 150 mM NaCl e 5% de leite em pó desnatado) e então lavadas com tampão de lavagem (20 mM Tris, pH 7,5 contendo 150 mM NaCl e 0,05% de Tween 20). Subsequentemente, as membranas foram incubadas por 12 horas a 4 °C em solução bloqueadora com o soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> (diluição de 1:500). Após este período, as membranas foram submetidas a mais um ciclo de lavagens e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de camundongo marcado com Peroxidase, marca Sigma) na diluição 1:1.000 em tampão de incubação. O excesso do conjugado foi então removido por um novo ciclo de lavagens e os componentes antigênicos foram revelados em câmara escura, utilizando a solução substrato *ECL Plus™ Western Blotting Detection System* (Amersham) em filme de alta sensibilidade da mesma marca.

### **3.21. Enriquecimento das frações contendo pró-domínio por imunoprecipitação**

Nesta técnica, o pró-domínio presente nas diferentes amostras foi isolado por reatividade com os anticorpos anti-pró-domínio imobilizados à resina de Sepharose ativada, como descrito abaixo.

#### **3.21.1. Isolamento de IgG de coelho do soro anti-PD-Jar<sub>r</sub>**

Para o isolamento das imunoglobulinas da classe IgG de coelho, foi utilizada a cromatografia de afinidade com proteína A/Sepharose (GE Healthcare). Para tanto, a resina (5 mL) foi equilibrada com 20 mL de tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio, pH 7,0) ou até que o pH da resina se estabilizasse em 7,0.

O soro (1 mL) foi diluído em tampão de ligação em uma proporção de 1/5. A amostra diluída foi aplicada na coluna que foi mantida por 10 minutos para a ligação das igGs à proteína A. Passado o período de incubação, a coluna foi lavada com 20

mL de tampão de ligação para a retirada das proteínas do soro que não se ligaram à resina. Feita a lavagem da resina, foi realizada a eluição das IgGs do soro com 20 mL de tampão de eluição (Glicina 0,1 M, pH 2,7), e frações de 1 mL do produto eluído da coluna foram coletadas em tubos previamente numerados e contendo 200 µL de tampão de neutralização (Tris 1 M, pH 9,0). Após a eluição, a resina foi lavada novamente com 20 mL de tampão de ligação para reequilibrar e posteriormente foi armazenada em etanol 20%.

A seleção dos tubos que continham a fração de IgG isolada foi determinada por espectrofotometria a 280nm, foram selecionadas e misturadas as amostras que apresentaram leitura acima de 0,9. A quantidade de IgG presente na fração foi determinada por espectrofotometria a 280 nm usando-se o coeficiente de extinção específica determinado como já descrito (LITTLE; DONAHUE, 1968).

### 3.21.2. Ligação da IgG anti-PD-Jar<sub>r</sub> em resina de Sepharose ativada

A resina utilizada foi a Sepharose Ativada por Brometo de Cianogênio (CNBr-activated Sepharose™ 4B – GE Healthcare). Para a ativação dos grupos de brometo de cianogênio presentes na resina tanto, 1 g da resina foi ressuspendido em 15 mL de HCl 1 mM, esta foi lavada com 200 mL de HCl 1 mM por 15 minutos.

Para o acoplamento do anticorpo, foi utilizado o tampão de acoplamento (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M; NaCl 0,5 M, pH 8,3) e o volume de 5 mL do anticorpo para cada 1 g de Sepharose. Para cada 0,3 g de Sepharose, foram utilizados 10 mg do anticorpo. A mistura foi incubada por duas horas em leve agitação à temperatura ambiente e, após este período, a resina foi lavada 5 vezes com tampão de acoplamento.

Após esse processo, os grupos ativos remanescentes foram bloqueados com Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0 por um período de 2 horas. Feito o bloqueio, realizaram-se 3 ciclos de lavagem da resina alternado o pH da mesma com tampão ácido (ácido acético/acetato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5 M, pH 4,0) e depois com tampão básico (Tris/HCl 0,1 M; NaCl 0,5 M, pH 8,0).

Ao final das lavagens a resina foi equilibrada com Tris Salina – TBS (Tris 20 mM; NaCl 150 mM, pH 7,5) e armazenada em etanol 20%.

### 3.21.3. Isolamento das amostras de pró-domínio

Para o isolamento das amostras de pró-domínio presentes no veneno e nos extratos proteicos das glândulas de veneno, 1 mg de cada amostra foi diluído em 500 µL de TBS contendo inibidores de proteases, adicionados para evitar a ação proteolítica do veneno nas imunoglobulinas ligadas à resina. Para cada amostra foram utilizados 200 µL de resina conjugada com o anticorpo anti-PD-Jar, previamente equilibrada com TBS, que foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação constante para que as moléculas com o pró-domínio se ligassem ao anticorpo anti-PD-Jar.

Feito isso, a resina foi centrifugada por 90 segundos a 2000 g, o sobrenadante foi retirado e a resina novamente submetida a 3 ciclos de lavagens com 1 mL de TBS por 5 minutos. Após as lavagens, o pró-domínio foi eluído incubando-se a resina com 400 µL de tampão de eluição (Glicina 0,1 M, pH 2,7) por 5 minutos e centrifugando-se por 2 minutos a 2000 g. A resina foi recuperada por uma nova lavagem com 1 mL de tampão de eluição, reequilibrada novamente com TBS e armazenada em etanol 20%.

As amostras extraídas por imunoprecipitação foram secas e ressuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE, fervidas em banho Maria por 5 minutos e analisadas em gel de SDS-PAGE 12,5%.

## 3.22. Identificação de peptídeos por espectrometria de massas

A identificação das bandas imunoreativas e das bandas isoladas por imunoprecipitação correspondentes ao pró-domínio foi realizada através de espectrometria de massas. Para isto, foi feita a digestão das amostras de acordo com Shevchenko e colaboradores (1996), com modificações.

Após a realização de SDS-PAGE, as bandas proteicas foram recortadas e transferidas para um tubo de 0,6 mL. Em seguida, foram adicionados 400 µL de uma solução de lavagem contendo bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0/acetoneitrila (1:1) e o tubo foi agitado por 15 minutos. A solução foi descartada e o processo foi repetido até descoloração completa da banda. O gel foi desidratado com a adição de 200 µL de acetoneitrila por 5 minutos. A amostra foi totalmente seca por centrifugação

a vácuo, reduzida com 100 µL ditioneitol 50 mM, por 1 hora a 37° C. Após esta etapa, a solução foi aspirada com uma micropipeta e então as amostras foram incubadas com 100 µL de iodoacetamida 40 mM por uma hora para a alquilação das proteínas. Em seguida, foi realizada a digestão com tripsina (20 ng/µL em bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,0) por 16 h a 37° C.

Após a digestão por tripsina, as amostras foram dessalinizadas em uma coluna C18 (*spin column*) e secas. Cada amostra foi ressuspensa em 10 µL de ácido fórmico 0,1% e transferida para tubos de autosampler. O autosampler aspirou 4 µL de cada tubo e injetou em uma coluna de Reprosil C18 com beads de 3 micras (fase reversa), de aproximadamente 12 cm de comprimento, empacotada em um capilar de 50 micras de diâmetro interno. A amostra foi então eluída com um gradiente de 180 minutos para separação dos peptídeos - as fases móveis utilizadas foram: **A** - 95% de H<sub>2</sub>O, 5% de Acetonitrila, 0,1% Ácido Fórmico; **B** - 80% de Acetonitrila, 20% de H<sub>2</sub>O, 0,1% Ácido Fórmico.

O espectrômetro de massas utilizado foi o nanoLC-LTQ-Orbitrap XL (Thermo Finnigan, USA), programado para adquirir os dados em modo de Data Dependent Acquisition (DDA). A aquisição consistiu das seguintes etapas: obter um espectro em alta resolução de tudo que entra no instrumento e resolver a carga dos íons; se encontrados íons de carga +2, +3, +4, +5, +6, acumular um de cada vez, enviar esse íon para uma câmara de fragmentação por gás (Collision Induced Dissociation - CID), obter o espectro dos fragmentos e reiniciar o ciclo.

Com os arquivos gerados, foi realizada uma busca usando um algoritmo chamado SEQUEST. A busca consistiu em comparar os dados obtidos com uma base de dados teórica. A base de dados continha sequências de proteínas descritas dos venenos de serpentes da família Viperidae encontradas no banco de dados do *SwissProt* ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com a colaboração do Dr. Gilberto Barbosa Domont.

### **3.23. Imunofluorescência em cortes congelados de glândulas de veneno**

As glândulas de veneno das serpentes, obtidas como descrito no item 3.14 foram dissecadas e cuidadosamente incluídas em OCT (*Optimal Cutting Temperature*). Os blocos foram cortados em fatias de 7 µm de espessura que foram armazenadas a -20 °C.

Para realização dos ensaios de imunofluorescência, os cortes foram fixados em formaldeído 3,7% por 10 minutos e, após sucessivas lavagens em PBS, as lâminas foram bloqueadas (triton X-100 1%, soro normal de coelho 5%, BSA 0,5%, glicina 0,5%, 0,5% gelatina de pele de peixe) e incubadas por 12 horas à 4 °C com o anticorpo anti-PD-Jar<sub>m</sub> (1:50). Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas por duas horas à temperatura ambiente com o anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (*succinimidil-éster* – Molecular Probes) diluído 1:1000 e o marcador de núcleo DAPI (4',6-amino-2phenuyindole, dihydrochloride – Molecular Probes) diluído 1:500. As lâminas foram montadas com anti-fading (Invitrogen) e analisadas em microscopio confocal (LSM-780-NLO, Zeiss).

### **3.24. Imunoeletromicroscopia em cortes de glândula de veneno**

Duas serpentes *B. jararaca* foram sacrificadas para a coleta das glândulas. Fragmentos com cerca de 1 mm<sup>3</sup> das glândulas coletadas nos dias 0 e 7 do ciclo de produção de veneno foram colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4% (Sigma) e aldeído glutárico 0,5% (Electron Microscopy Sciences – EMS) em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 com sacarose 2,5% durante 1 hora a 4 °C. Em seguida, os fragmentos foram processados de acordo com o método de Berryman; Rodewald (1990) e incluídos em resina LR White hard grade (London Resin Co. Ltd., UK).

A imunomarcacão foi feita em cortes ultrafinos (70 nm) coletados em grades de níquel. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com solução de PBS 0,02M, pH 8,0 com 1,5% de BSA (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) e 0,01% de Tween 20 (Amresco, Solon, OH) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguiu-se a incubação com o antissoro específico diluído em solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente. Os soros utilizados foram produzidos em coelhos para

os seguintes antígenos: anti-PD-Jar<sub>r</sub> (1:10); anti-jararagina (1:50). O controle foi feito com soro normal de coelho. A seguir foram feitas lavagens dos cortes com solução de bloqueio, e incubação em proteína G-gold (10nm) 1:30 em solução de bloqueio pH 7,4, durante 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS 0,02M pH 7,4 e em água destilada, as grades, já secas, foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss) e as imagens foram capturadas através de câmera CCD Olympus Megaview III e salvas em extensão TIF.

Esta etapa do projeto foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan com a colaboração da Dra. Sylvia Mendes Carneiro.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtenção da proteína recombinante

O primeiro passo deste trabalho foi a obtenção do pró-domínio recombinante referente a uma SVMP de classe P-III, pela clonagem e expressão do cDNA correspondente amplificado a partir de RNA colhido de glândulas de veneno de serpentes *Bothrops jararaca* adultas.

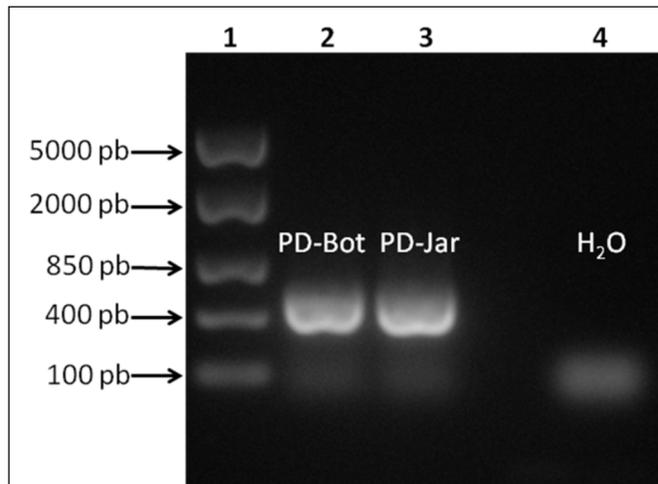
#### 4.1.1. Clonagem do pró-domínio no vetor pAE

A sequência de cDNA do pró-domínio foi obtida no banco de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para a construção dos *primers* utilizados na clonagem, foi necessário analisar as sequências de duas SVMPs de classe P-III, altamente expressas no veneno de *B. jararaca*. A sequência da jararagina depositada no GenBank (acesso n° X68251.1) não continha a sequência completa de seu pró-domínio, faltando os 57 nucleotídeos iniciais correspondentes à região 5' do pró-domínio. A análise da sequência da botropasina, depositada no GenBank (acesso n° AF056025.2), revelou toda a sequência do cDNA que codifica desde o peptídeo sinal, passando pelo pró-domínio, até a região da proteína madura. Portanto, foram desenhados *primers* para as duas sequências de pró-domínio analisadas.

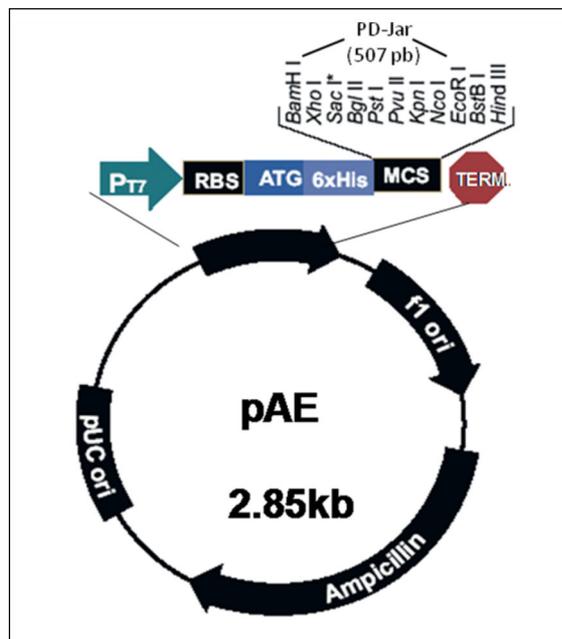
Para a clonagem, o cDNA do pró-domínio foi amplificado por PCR. Para tanto, foi utilizado como molde o cDNA oriundo de glândulas de veneno coletadas de serpentes *B. jararaca* adultas 4 dias após a extração de veneno obtidos anteriormente. Para amplificação do cDNA do pró-domínio, foram realizadas duas reações diferentes de PCR, uma usando os *primers* senso e antisenso desenhados a partir da sequência da botropasina e outra usando o *primer* senso da botropasina e o *primer* antisenso da sequência da jararagina, pois a intenção era amplificar o cDNA correspondente a sequência completa do pró-domínio.

Pode ser observado na Figura 5 que, nas duas reações de PCR foram amplificados fragmentos no tamanho esperado para o cDNA do pró-domínio (507

pb), denominados PD-Bot (referente ao pró-domínio da botropasina) e PD-Jar, referente ao pró-domínio da jararagina. Foi decidido clonar o cDNA obtido a partir da segunda reação, PD-Jar. Este cDNA foi então purificado e posteriormente clonado no vetor pAE (Figura 6) nos sítios de *Bam*HI e *Eco*RI.



**Figura 5** – Gel de agarose 1% corado com GEL-RED (New England Biosciences) mostrando a amplificação dos genes PD-Bot e PD-Jar após reação de PCR. 1- Marcador de massa molecular (Fermentas); 2- Pró-domínio da botropasina (PD-Bot); 3- Pró-domínio da jararagina (PD-Jar); 4- Controle negativo (H<sub>2</sub>O)



**Figura 6** – Figura ilustrando uma representação do mapa do vetor pAE indicando os sítios de *Bam*HI e *Eco*RI onde foi clonado o gene do PD-Jar.

Após a clonagem, bactérias DH5 $\alpha$  foram transformadas e triadas por PCR para a confirmação da presença do inserto (Figura 7). O clone positivo foi submetido à extração plasmidial para o sequenciamento completo do inserto. O inserto contido no clone 12 foi sequenciado e alinhado com seqüências de pró-domínio de



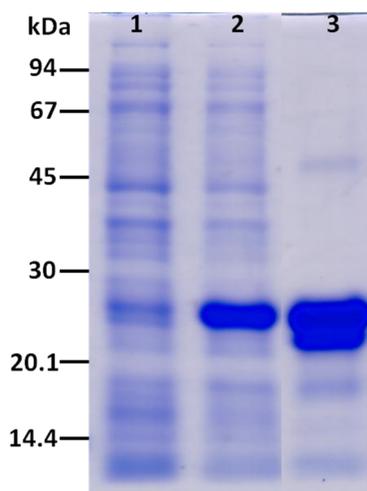
#### 4.1.2. Expressão da proteína recombinante (PD-Jar)

Após confirmação do sucesso na clonagem do pró-domínio no vetor pAE, bactérias BL21 Star™(DE3) pLysS foram transformadas com o clone 12 para a expressão da proteína recombinante referente ao pró-domínio da jararagina que foi chamada de **PD-Jar**. A parte codificadora deste cDNA produz uma proteína de 186 aminoácidos com massa molecular teórica de 21 kDa, cujo ponto isoelétrico teórico é de 6,11.

As bactérias transformadas foram utilizadas para a preparação do pré-inóculo que ficou por 16 horas a 37 °C em agitação constante. No dia seguinte uma alíquota dessa cultura foi utilizada para a preparação do inóculo em uma diluição de 1:70. Foram preparados dois inóculos, um para realizar a expressão a 37 °C e outro a 30 °C. As culturas foram mantidas nessas temperaturas até que atingiram absorvância de 0,6 em densidade óptica de 600 nm, quando então foi adicionado 1 mM de IPTG para a indução da produção da PD-Jar. Após 4 h de indução, as bactérias foram centrifugadas e guardadas para posterior lise e purificação da proteína recombinante.

Após a expressão da PD-Jar, foi realizado o processo de purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel. Os procedimentos técnicos desta etapa encontram-se descritos em material e métodos. Na Figura 9, mostramos a eletroforese do extrato bacteriano da cultura não induzida e induzida das bactérias que cresceram a 30 °C e a proteína purificada. É possível observar a presença de uma banda mais proeminente no extrato induzido, indicando a expressão da proteína. Após purificação, foi observada a presença de uma banda majoritária, referente à PD-Jar. A expressão realizada a 37 °C não foi satisfatória, pois nesta temperatura a proteína purificada se mostrou com um tamanho menor do que o esperado, podendo estar sendo expressa na forma truncada (dados não mostrados).

O rendimento foi de 15 mg a cada litro de cultura, quando a proteína foi expressa a 30 °C e de 7,5 mg/L, quando expressa a 37 °C. Assim, é possível observar com este resultado que a expressão da proteína foi obtida com maior sucesso quando expressa a 30 °C. Sendo assim, esta temperatura foi adotada para todas as expressões da PD-Jar usada em nossos experimentos.



**Figura 9** – Gel de SDS-PAGE 12,5% corado com azul de Coomassie R-250 mostrando expressão e purificação da proteína PD-Jar. **1-** Extrato bacteriano não induzido (30 °C); **2-** Extrato bacteriano induzido com 1 mM de IPTG (30 °C); **3-** PD-Jar purificada (30 °C).

## 4.2. Produção do soro anti-PD-Jar

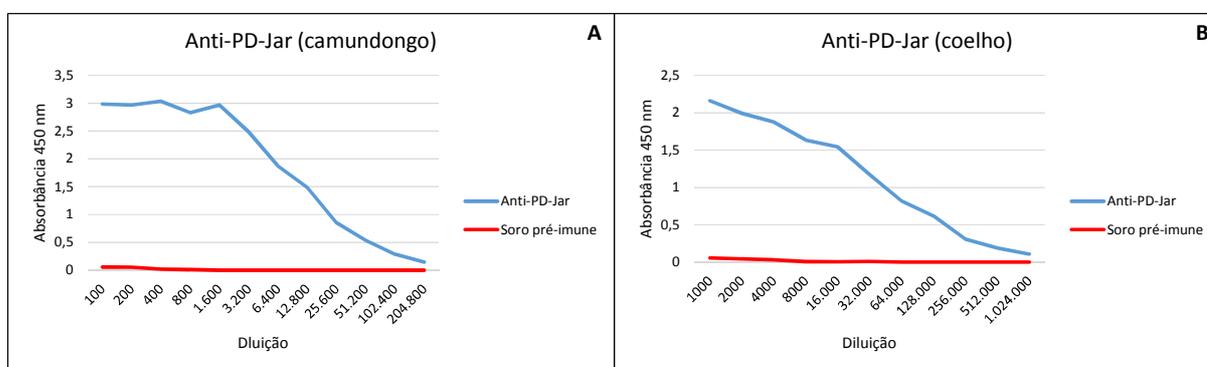
Com o intuito de produzir o soro anti-PD-Jar, foi feita imunização em camundongos e em coelhos. Para a obtenção do soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> foram utilizados dois grupos diferentes (5 camundongos por grupo), um grupo imunizado com a PD-Jar e um grupo controle imunizado com PBS. Foram utilizados 10 µg da proteína (antígeno) homogeneizados com 100 µg de Al(OH)<sub>3</sub> (hidróxido de alumínio), para o grupo controle, foi preparada uma mistura de PBS com 100 µg de Al(OH)<sub>3</sub>. Estas misturas foram injetadas via intraperitoneal em camundongos Balb/c. Após a terceira imunização, foi coletada uma sangria exploratória para avaliar a resposta imune de cada grupo e, após a quarta imunização, foi realizada a sangria final dos camundongos.

Para a obtenção do soro imune de coelho (anti-PD-Jar<sub>r</sub>), antes de iniciar a imunização, o animal foi sangrado pela veia marginal da orelha para a obtenção do soro pré-imune. Na primeira imunização, o coelho recebeu uma dose de 200 µg de PD-Jar com o adjuvante Marcol-Montanide pela via intramuscular; as doses de reforço foram administradas com 100 µg de PD-Jar, com o adjuvante Marcol-Montanide pela via subcutânea.

O título de anticorpos dos soros obtidos foi analisado por ELISA em placas sensibilizadas com a proteína recombinante PD-Jar. A Figura 9 mostra que o título destes anticorpos produzidos em camundongos foi de aproximadamente 1:200.000

e o título do soro produzido em coelho foi de 1:1.024.000, mostrando assim que os animais tiveram uma boa resposta imune contra a proteína e a produção dos anticorpos foi obtida com sucesso (Figura 10).

Foi realizado um novo teste, também por ELISA, para verificar se os soros tinham alguma reatividade frente a jararagina, eliminando a possibilidade de que o soro anti-PD-Jar reconhecesse a SVMP já processada. Este controle nos pareceu fundamental uma vez que para a detecção do pró-domínio livre ou ainda não processado, na forma de zimogênio, este soro não poderia ter nenhum tipo de reatividade com a proteína em sua forma ativa. O teste mostrou que os soros não possuem reatividade frente a SVMPs já processadas (dados não mostrados).



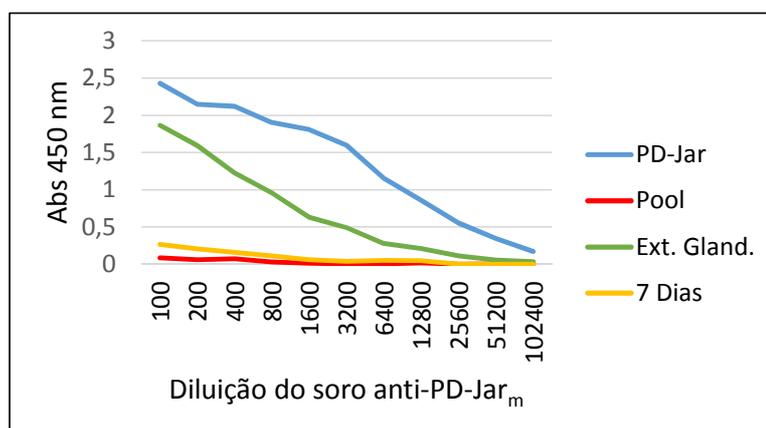
**Figura 10** – Produção de anticorpos anti-PD-Jar em soros de camundongos BALB/c e coelhos previamente imunizados. A produção de anticorpos foi avaliada nos seguintes soros: Controle (camundongo), anti-PD-Jar<sub>m</sub> (camundongo), pré-imune (coelho) e anti-PD-Jar<sub>r</sub> (coelho). **A)** ELISA utilizando placas sensibilizadas com a proteína PD-Jar para titulação do soro anti-PD-Jar<sub>m</sub>. **B)** ELISA utilizando placas sensibilizadas com a proteína PD-Jar para titulação do soro anti-PD-Jar<sub>r</sub>. Os resultados foram expressos em absorbância obtida nas diferentes diluições dos soros.

### 4.3. Análise da presença do pró-domínio no veneno coletado no 7º dia do ciclo de produção de veneno

Os venenos foram colhidos individualmente, ou seja, para cada dia foi utilizado uma serpente. Em todas as serpentes, o veneno e o tecido de uma das glândulas foram coletados na presença de inibidores de proteases e o veneno e o tecido da outra glândula foram coletados sem a presença de inibidores de proteases. Esse procedimento foi adotado para verificarmos se existe alguma diferença entre as amostras e se o processamento está ocorrendo após a coleta, por conta de alguma protease presente no veneno.

Inicialmente, foi realizada uma análise para verificar a capacidade do soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> em reconhecer o pró-domínio nativo. Utilizamos a técnica de ELISA para tentar identificar o pró-domínio em amostras de veneno e também do extrato proteico oriundo da glândula de veneno coletada 7 dias após o início do ciclo de produção de veneno, pool de veneno liofilizado e como controle positivo a proteína recombinante PD-Jar.

É possível observar na Figura 11 que o soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> se mostrou eficiente em reconhecer a proteína recombinante (linha azul) e também o presente no extrato proteico da glândula de 7 dias (linha verde). No veneno de 7 dias (linha amarela), o soro reconhece a presença de pró-domínio de maneira menos eficiente e no pool de veneno (linha vermelha), o soro não se mostrou reativo, sugerindo a presença muito baixa de pró-domínios nessas amostras.



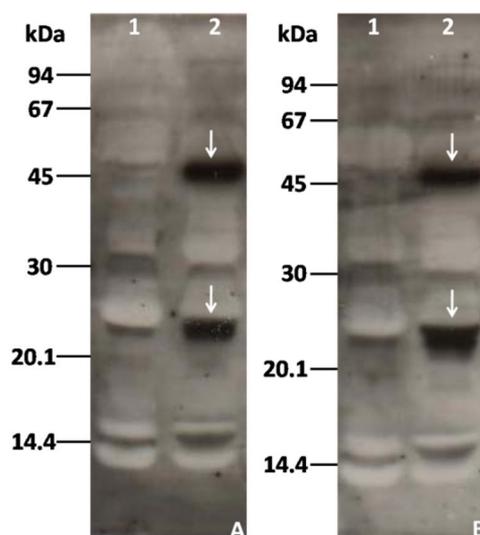
**Figura 11** – Detecção da presença de pró-domínio em amostras de tecido glandular e veneno. Placas de microtitulação foram sensibilizadas com amostras de 1 µg de extrato glandular (verde), 1 µg de veneno de 7 dias (amarelo), 1 µg de veneno liofilizado do pool de venenos do Instituto Butantan (vermelho) e 1 µg da proteína recombinante PD-Jar (azul) e utilizadas como diferentes antígenos para a titulação do soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> pela técnica de ELISA.

Este resultado foi importante para confirmar a presença de antígenos reativos com o soro anti-pró-domínio nas amostras testadas. Para melhor caracterizarmos esses antígenos, prosseguimos em nossos próximos experimentos com a técnica de *Western blotting*, que permite visualizar a massa molecular das amostras encontradas, e por espectrometria de massas, para a confirmação da identidade das bandas por caracterização parcial da estrutura primária das mesmas.

As amostras de veneno coletadas da no dia 0 (quiescente) e 7 do ciclo de produção de veneno foram analisadas por *Western blotting* (WB). É possível visualizar na Figura 12 que o soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> foi capaz de reconhecer duas

bandas; uma de 22 kDa e outra de 45 kDa (indicado pelas setas) somente no veneno coletado no sétimo dia do ciclo de produção de veneno.

As bandas encontradas são um forte indício de que no veneno de 7 dias seja possível encontrar amostras de zimogênios não processados e de pró-domínio já processado, pois a banda referente a 45 kDa sugere que seja de uma SVMP de classe P-I não processada e a banda de 22 kDa é sugestiva de pró-domínio livre, ou seja, já processado.



**Figura 12** – Análise por *Western blotting* da presença do pró-domínio em diferentes amostras de veneno. Amostras de 100 µg de cada veneno foram submetidas a SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras, transferidas para membranas de nitrocelulose e analisadas usando soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> em diluição de 1:500 seguido por incubação com anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase (diluição de 1:1000), revelada por quimioluminescência. **A)** Amostras com inibidores de proteases; **B)** Amostras sem inibidores de proteases. **1-** Veneno da glândula quiescente (dia 0); **2-** Veneno de 7 dias. As setas brancas indicam a presença do pró-domínio na altura de 22 e 45 kDa.

Nota-se que as bandas reconhecidas pelo soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> foram as mesmas na presença e na ausência de inibidores de proteases. Assim, decidimos padronizar que nossos próximos experimentos seriam realizados todos na presença de inibidores de proteases para prevenir uma possível autólise dos supostos zimogênios por algum tipo de protease presente no veneno.

#### **4.4. Identificação das proteínas imunorreativas por espectrometria de massas**

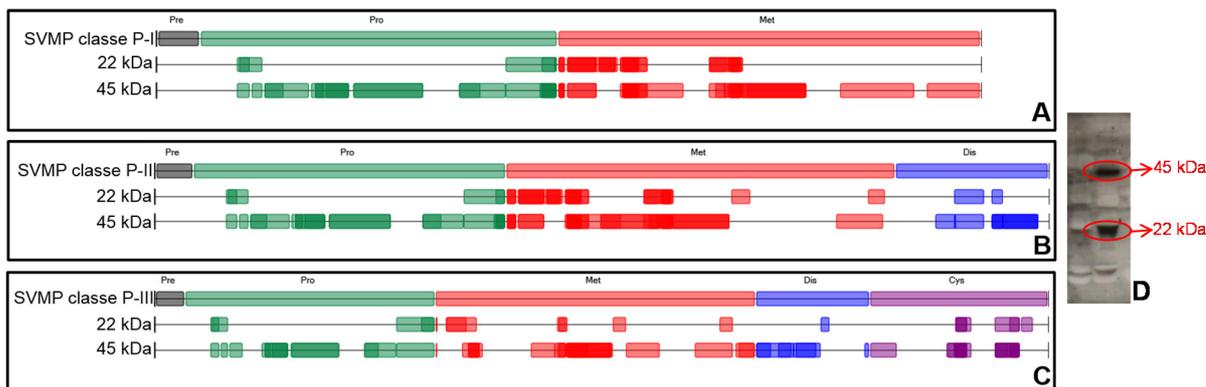
Com o intuito de identificar se as amostras reconhecidas no experimento representado pelas Figuras 11 e 12 realmente são amostras de pró-domínio, foi feita

uma análise preliminar por espectrometria de massas. Para isso, as bandas que foram reveladas positivamente por *Western blotting* foram excisadas do gel de SDS-PAGE 12,5% corado com Azul de Coomassie R-250 que correu paralelamente com o gel utilizado para a realização do WB, que foi utilizado como “guia” para as bandas correspondentes aquelas que se revelaram positivas.

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio de um algoritmo chamado SEQUEST. Este algoritmo se baseia em um banco de dados teórico referente a proteínas descritas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* encontradas no banco de dados do NCBI nr. Foram detectados 106 peptídeos com homologia a proteínas de serpentes do gênero *Bothrops* na banda de 22 kDa e 78 peptídeos com homologia a proteínas de serpentes do gênero *Bothrops* na banda de 45 kDa. Destes, 5,66% dos peptídeos encontrados na banda de menor massa molecular correspondem ao pró-domínio de SVMP e 20,5% dos peptídeos encontrados na banda de maior massa molecular também correspondem ao pró-domínio de SVMP.

Na Figura 13 foi utilizado o software CAITITU, versão 2.0.1.4 (CARVALHO et al., 2008) para ilustrar a posição dos peptídeos que foram encontrados após a análise realizada no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). É possível observar nesta figura que foram encontrados peptídeos com homologia para todas as classes de SVMPs, porém a SVMP de classe P-I foi a que obteve uma maior cobertura dos peptídeos encontrados.

É importante ressaltar que por se tratar de bandas recortadas de um gel de SDS-PAGE contendo veneno total, muitos peptídeos encontrados podem ser considerados “contaminantes” e não só da amostra que foi revelada por WB. Porém, o resultado importante é que nas duas bandas analisadas foram encontrados peptídeos correspondentes ao pró-domínio, confirmando a sua presença que já havia sido sugerida no nosso resultado de WB.



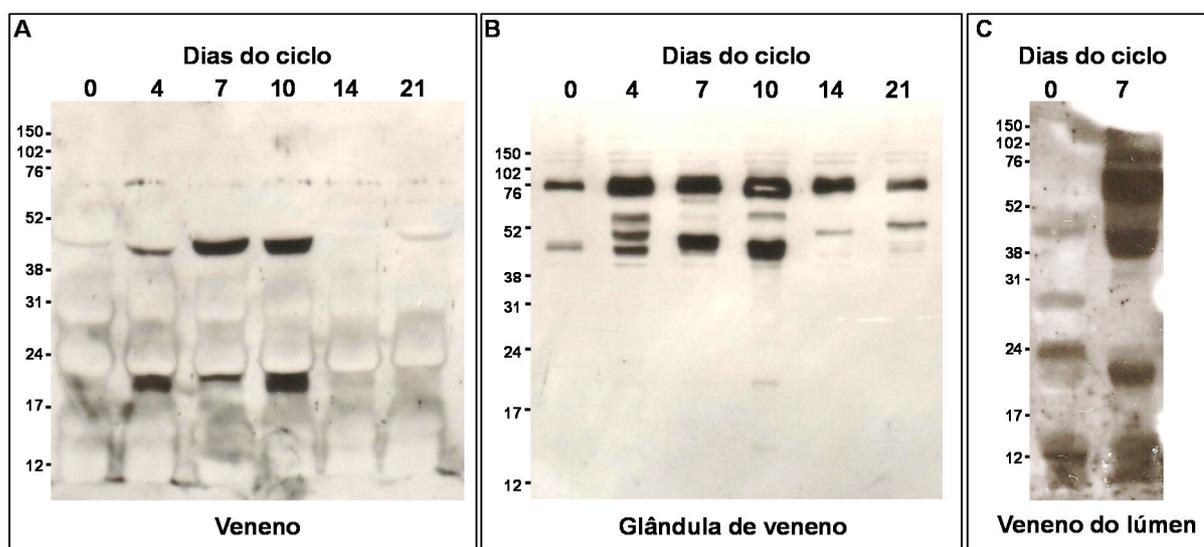
**Figura 13** – Cobertura dos peptídeos encontrados de acordo com os domínios de cada classe de SVMP: Imagem ilustrativa gerada pelo programa CAITITU onde em preto está ilustrado o Pré-domínio, em verde o Pró-domínio, em vermelho o domínio Metaloproteinase, em azul Disintegrina e em roxo Rico em Cisteínas. A intensidade de cor nos peptídeos indica: quanto mais intensa a cor maior o número de vezes esse peptídeo foi identificado. **A)** Peptídeos com homologia de SVMP classe P-I (foi utilizada como referência uma SVMP de classe P-I de *Bothrops insularis*). **B)** Peptídeos com homologia de SVMP classe P-II (foi utilizada como referência a Botrostatina). **C)** Peptídeos com homologia de SVMP classe P-III (foi utilizada como referência a Bothropasina). **D)** Bandas imunorreativas por WB utilizadas nesta análise.

#### 4.5. Análise da presença do pró-domínio no ciclo de produção de veneno

Com base nos resultados já obtidos, decidimos analisar diferentes amostras do ciclo de produção de veneno, coletando novas amostras de diferentes dias do ciclo. Como o veneno coletado com 7 dias se mostrou positivo para a presença do pró-domínio, foram escolhidos para esta análise os dias 0 (estado quiescente), 4, 7, 10, 14 e 21 do ciclo de produção de veneno. Além do veneno também foram coletadas as glândulas de veneno para análise de seus extratos proteicos. Ainda, foram coletadas amostras de veneno diretamente do lúmen da glândula de veneno nos dias 0 e 7 do ciclo de produção de veneno, pensando em verificar se os venenos extraídos sem que passassem por ducto primário, glândula acessória e ducto secundário demonstrariam alguma diferença dos demais quanto à presença de zimogênios ou pró-domínio livre. Todas as amostras foram coletadas na presença de inibidores de proteases.

A análise realizada por WB das amostras de veneno coletadas em diferentes dias do ciclo de produção de veneno, revelou a presença de bandas reativas ao soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> nos dias 4, 7 e 10 do ciclo, com massas moleculares aproximadas de 45 e 22 kDa (Figura 14A). Estes dias correspondem ao pico de produção de

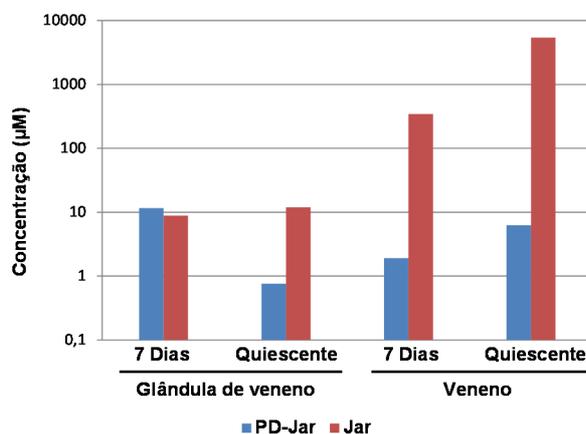
proteínas no ciclo e as massas moleculares das bandas reativas indicam, assim como no experimento anterior, a presença de zimogênios da classe P-I (45 kDa) e pró-domínio livre (22 kDa). Em oposição, muitas bandas com massa molecular acima de 45 kDa foram detectadas nas amostras de extratos proteicos da glândula de veneno coletados ao longo do ciclo de produção de veneno (Figura 14B), porém estas bandas são mais intensas nas amostras dos dias 4, 7 e 10 do ciclo. A mobilidade dessas bandas sugere que a presença do pró-domínio só foi encontrada na forma de zimogênios de SVMPs das classes P-I, P-II e P-III. É interessante notar que, nas amostras de extratos de glândula, as bandas de pró-domínio foram encontradas também no estado quiescente e nos dias 14 e 21 do ciclo de produção de veneno, fato este que não ocorreu nas amostras de veneno. Além disso, nós investigamos a presença de pró-domínio nas amostras de veneno coletadas diretamente do lúmen (Figura 14C), no pico de síntese de veneno (7º dia), onde detectamos a presença de bandas com massas moleculares correspondentes de zimogênios de SVMPs das classes P-I, P-II e P-III. Entretanto, na amostra quiescente, apenas poucas bandas foram detectadas no veneno extraído do lúmen, com predominância de bandas com mobilidade correspondente a forma já processada do pró-domínio ou seus produtos de degradação.



**Figura 14** – Análise por Western blotting das amostras de veneno e de glândula de veneno coletadas ao longo do ciclo de produção de veneno. Amostras (100 µg de veneno ou 20 µg de extrato proteico da glândula de veneno) foram fracionadas por SDS-PAGE 12,5% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> (1:500) como anticorpo primário seguido por incubação com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:1000) e reveladas por quimioluminescência. A) Amostras de veneno. B) Amostras de extratos de glândula de veneno extraídos nos dias 0 (quiescente), 4, 7, 10 e 21 dias do ciclo de produção de veneno. C) Venenos extraídos diretamente do lúmen nos dias 0 e 7 do ciclo.

## 4.6. Quantificação do pró-domínio por ELISA indireto

Realizamos a quantificação do pró-domínio (forma processada ou zimogênio) ou da forma processada da SVMP (domínios met-dis-cys metaloproteinase-disintegrina-rico em cisteína) presentes nas diferentes amostras por ELISA indireto, usando soros anti-PD-Jar e anti-Jar. Como mostrado na Figura 15, no extrato proteico da glândula de veneno coletado no pico do ciclo de produção de veneno, a concentração molar do pró-domínio é similar à concentração dos domínios met-dis-cys, indicando que a maioria das SVMPs ainda se encontra no estado de zimogênio. No entanto, nos extratos de glândulas quiescentes, a concentração dos domínios met-dis-cys se mostrou 10 vezes maior do que a concentração de pró-domínio, indicando que o processamento, embora não concluído, pode começar dentro das células secretoras. Entretanto, nas amostras de veneno, a maioria das SVMPs foi detectada na forma processada. No 7º dia, a concentração detectada dos domínios met-dis-cys se mostrou 200 vezes maior do que a concentração de pró-domínio e no estado quiescente, aproximadamente 5000 vezes maior, indicando que o processamento das SVMPs está, na grande maioria, completo neste estágio do ciclo.



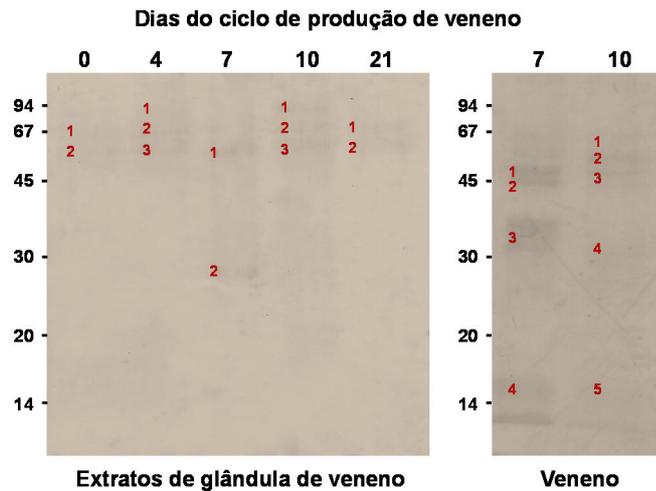
**Figura 15** – Quantificação de pro-domínio ou domínio de proteínas maduras de SVMPs em amostras de veneno ou extratos de glândulas de veneno. Soros anti-PD-Jar<sub>m</sub> (1:100) ou anti-Jar<sub>r</sub> (1:1000) foram usados como *coating* em microplacas (Nunc Maxisorb). Amostras de veneno ou extratos de glândulas em triplicatas foram incubados assim como a curva padrão com as proteínas PD-Jar ou jararagina. Em seguida foram incubados os soros anti-PD-Jar<sub>r</sub> (1:500) ou anti-Jar<sub>m</sub> (1:1000) seguido pela incubação de anti-IgG de coelho ou camundongo (1:2000) marcados com peroxidase. Os níveis de pro-domínio ou SVMPs P-III maduras foram calculadas com base na curva de diluição em série de PD-Jar ou jararagina, respectivamente, e expressas em µM.

#### **4.7. Identificação do pró-domínio em amostras de veneno e extratos de glândula de veneno por espectrometria de massas**

A presença de peptídeos de pró-domínio em bandas imunorreativas com o soro anti-PD-Jar foi avaliada por espectrometria de massas. No experimento anterior (Figura 13), as bandas foram cortadas diretamente dos géis dos venenos e observamos um grande número de peptídeos correspondentes a outros domínios das SVMs, dificultando a análise dos resultados. Ou seja, por se tratar de amostras de veneno bruto, outras proteínas com a mesma mobilidade eletroforética das bandas reveladas por WB acabaram sendo identificadas por espectrometria de massas. Dessa forma, decidimos realizar a extração das bandas imunorreativas por imunoprecipitação usando o soro anti-PD-Jar<sub>r</sub>, das amostras de veneno coletadas nos dias 7 e 10 e extratos proteicos das glândulas coletadas nos dias 0, 4, 7, 10 e 21 do ciclo de produção de veneno foram as escolhidas para esta análise.

Esta metodologia consiste em acoplar as imunoglobulinas de classe IgG do soro anti-PD-Jar<sub>r</sub> a uma resina de Sepharose ativada por brometo de cianogênio (CNBr). Com essa Sepharose conjugada é realizada a imunoprecipitação, onde as moléculas contendo o pró-domínio do veneno e dos extratos de glândula de veneno se ligarão ao anticorpo acoplado na Sepharose. Após várias etapas de lavagem, a Sepharose é centrifugada e o pró-domínio é eluído do anticorpo utilizando um tampão com pH ácido.

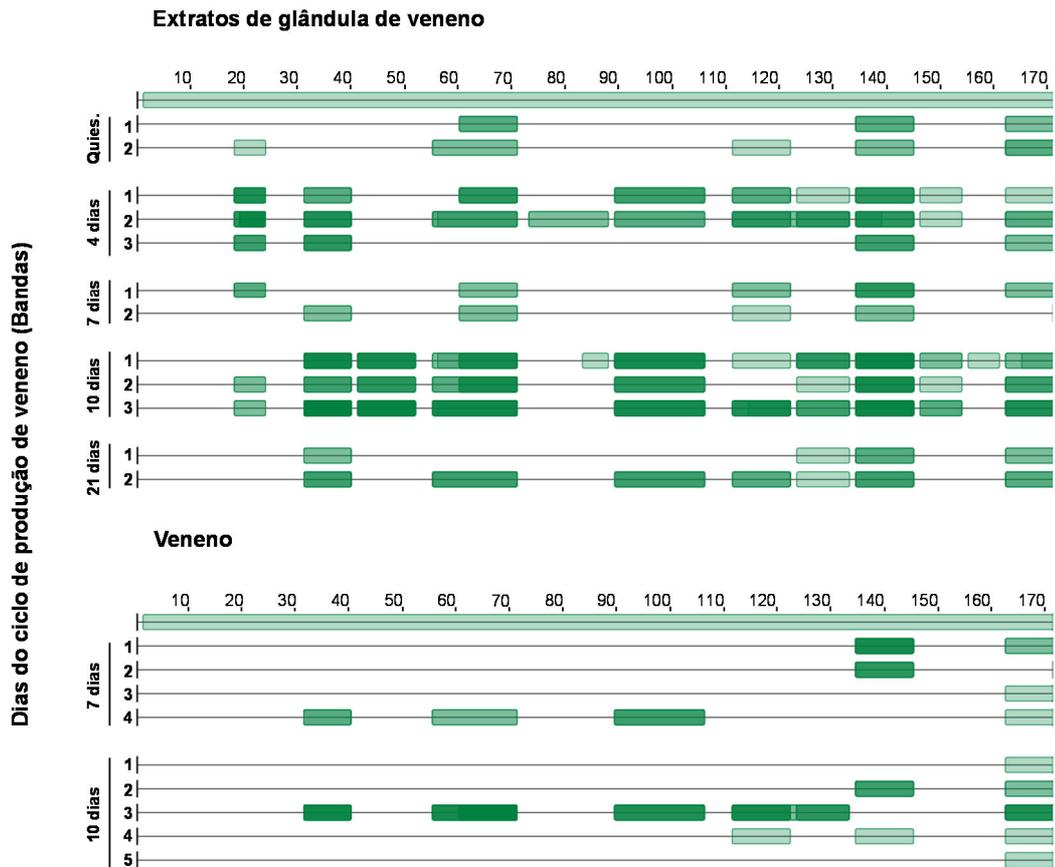
As amostras obtidas por imunoprecipitação foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5%, excisadas do gel e digeridas com tripsina para posterior análise por nanoLC-MS/MS. Como mostrado na Figura 16, a maior parte das bandas isoladas a partir de extratos de glândula correspondem a antígenos de massa molecular mais elevada, enquanto que as amostras de veneno exibiram bandas com tamanhos moleculares inferiores e superiores. É importante ressaltar, que como as proteínas eluídas foram secas e aplicadas no gel sem a dessalinização das amostras, estas se mostraram com um perfil eletroforético um pouco diferente do que já havíamos identificado por WB devido ao excesso de sal contido nestas amostras.



**Figura 16** – Imunoprecipitação de antígenos imunorreativos ao soro anti-PD-Jar<sub>r</sub>. Antígenos reativos ao soro anti-PD-Jar<sub>r</sub> foram isolados por imunoprecipitação a partir de amostras de veneno coletadas aos dias 7 e 10, e de extratos de glândula coletados aos dias 0, 4, 7, 10 e 21 do ciclo de produção de veneno e submetidos a SDS-PAGE 12,5% e coradas com azul de Coomassie. Os números indicam massas moleculares marcadores. Os números em vermelho indicam as bandas selecionadas para uma análise por nanoLC-MS/MS.

Em todas as bandas recortadas foram identificados peptídeos correspondentes a pró-domínios de SVMPS. A Figura 17 mostra uma representação gráfica da sequência de cobertura, dos peptídeos de pró-domínio detectados em cada banda. Este gráfico foi construído com software CAITITU, versão 2.0.1.4 (CARVALHO et al., 2008).

Os peptídeos correspondentes ao pró-domínio foram identificados com mais frequência em bandas eluídas a partir dos extratos proteicos da glândula de veneno, resultando em uma cobertura da sequência do pró-domínio maior do que 50% para a maior parte destas bandas. Tomados em conjunto estes resultados estão em acordo com a presença de zimogênios detectados nas bandas reveladas por WB. Consistente com a presença de zimogênios, foram identificados peptídeos onde encontram-se resíduos da porção C-terminal do pró-domínio e a porção N-terminal do domínio catalítico (ASQLVVTAEEQQK e/ou ASQSNLTPEQQR) que foram encontrados em 11 de 12 bandas analisadas a partir de extratos de glândula de veneno (Figura 17).



**Figura 17** – Representação gráfica da cobertura dos peptídeos de pró-domínio identificados nas amostras obtidas por imunoprecipitação (Figura 16) e analisadas por nanoLC-MS/MS. Os peptídeos de pró-domínio com identidade superior a 80% ao pró-domínio da botropasina (GI: 82190823) foram representados graficamente e a intensidade de cor de cada peptídeo representa a quantidade de vezes que este foi identificado. Figuras foram geradas a partir de dados obtidos por MS/MS pelo software CAITITU, versão 2.0.1.4.

Em bandas coletadas de amostras de veneno, a detecção de peptídeos de pró-domínio foi menor e uma boa cobertura foi observada apenas para a banda 3 da amostra imunoprecipitada do veneno coletado no 10º dia do ciclo de produção de veneno. Nestas amostras também foram identificados peptídeos cuja sequência (ASQSNLTPEQQR e ASQSNLTPEHQQR) corresponde a resíduos da porção C-terminal do pró-domínio e a porção N-terminal do domínio catalítico (Figura 17).

As Tabelas A1 e A2 (em anexo) listam as proteínas identificadas por MS/MS em todas as bandas isoladas por imunoprecipitação com pelo menos dois peptídeos únicos e seus respectivos valores de *score*. A maior parte dos peptídeos identificados pertencem a SVMPs de diferentes classes. Apenas alguns peptídeos correspondentes a serinoproteinases, fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), L-aminoácidos oxidases, lectinas do tipo C, CRISPs, e inibidores de PLA<sub>2</sub> ou SVMPs foram detectados. Nos extratos de glândula de veneno, de acordo com os valores de

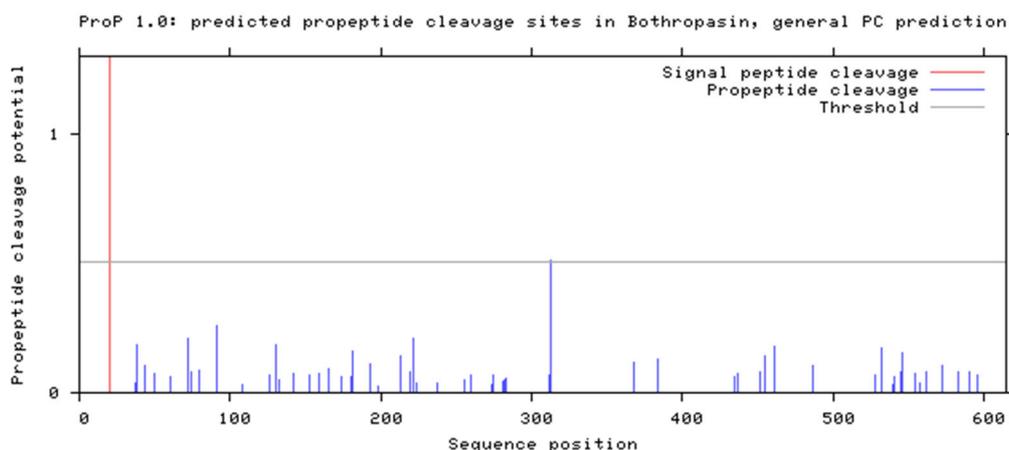
*spectral counts*, foram identificadas SVMPs em todas as bandas, com predominância da classe P-III em bandas de massas moleculares mais elevadas (60 e 70 kDa), enquanto os peptídeos de SVMPs das classes P-I e P-II foram mais abundantes nas bandas de 50 kDa. Estes dados são consistentes com as massas de zimogênios previstos para cada tipo de SVMPs. Em amostras de veneno, as SVMPs também foram as principais proteínas identificadas em bandas superiores a 50 kDa, particularmente no 7° dia do ciclo. Quanto as proteínas co-precipitadas com as SVMPs, a presença de uma proteína chamou a atenção, a GPC (*glutamyl peptide cyclotransferase*) que foi detectada em bandas de 45 kDa das amostras coletadas nos dias 7 e 10 do ciclo de produção de veneno. Esta enzima está envolvida na modificação pós-traducional de SVMPs, elas são responsáveis pela conversão do resíduo glutâmico na porção N-terminal para piroglutâmico, que protegem as enzimas contra a digestão por aminopeptidases.

#### **4.8. Análise de possíveis sítios de clivagem por furina**

Precusores inativos como as ADAMs e outros zimogênios são normalmente processados por enzimas como as furinas ou proteínas pró-convertases (PCs), em locais compostos por resíduos de aminoácidos básicos únicos ou pareados. Assim, decidimos fazer uma análise da sequência de uma SVMP de classe P-III usando um programa de bioinformática que prediz possíveis sítios de clivagem por estas enzimas. O programa utilizado foi o ProP 1.0 Server (DUCKERT et al., 2004); este método prevê locais de clivagem em sequências independentes, com uma sensibilidade de 95% para sítios de furina e 62% para sítios de clivagem de outras PCs.

A Figura 18 mostra a predição para estes sítios através de uma representação gráfica gerada pelo próprio programa. Esta predição foi baseada na sequência da proteína botropasina (GI: 82190823), por ter a sequência completa do pró-domínio. O programa considera possíveis sítios de clivagem onde o potencial de clivagem ultrapassar o valor de 0,5 dentro de uma escala que vai de 0 a 1, e esta análise mostrou que em toda a sequência da botropasina só foi encontrado um sítio em potencial para clivagem por PCs no aminoácido 313 (valor do potencial de clivagem foi de 0,510), que está localizado bem no meio do domínio catalítico. Com

este resultado pode-se considerar que o processamento das SVMPs deve estar ocorrendo por algum outro tipo de mecanismo.



**Figura 18** – Representação gráfica gerada pelo programa ProP 1.0 Server indicando possíveis sítios de clivagem por PCs para a botropasina (GI: 82190823). A barra em vermelho indica o sítio de clivagem do peptídeo sinal e as barras em azul indicam possíveis sítios de clivagem por PCs, apenas um sítio (posição 313) foi considerado positivo.

#### 4.9. Localização celular do pró-domínio

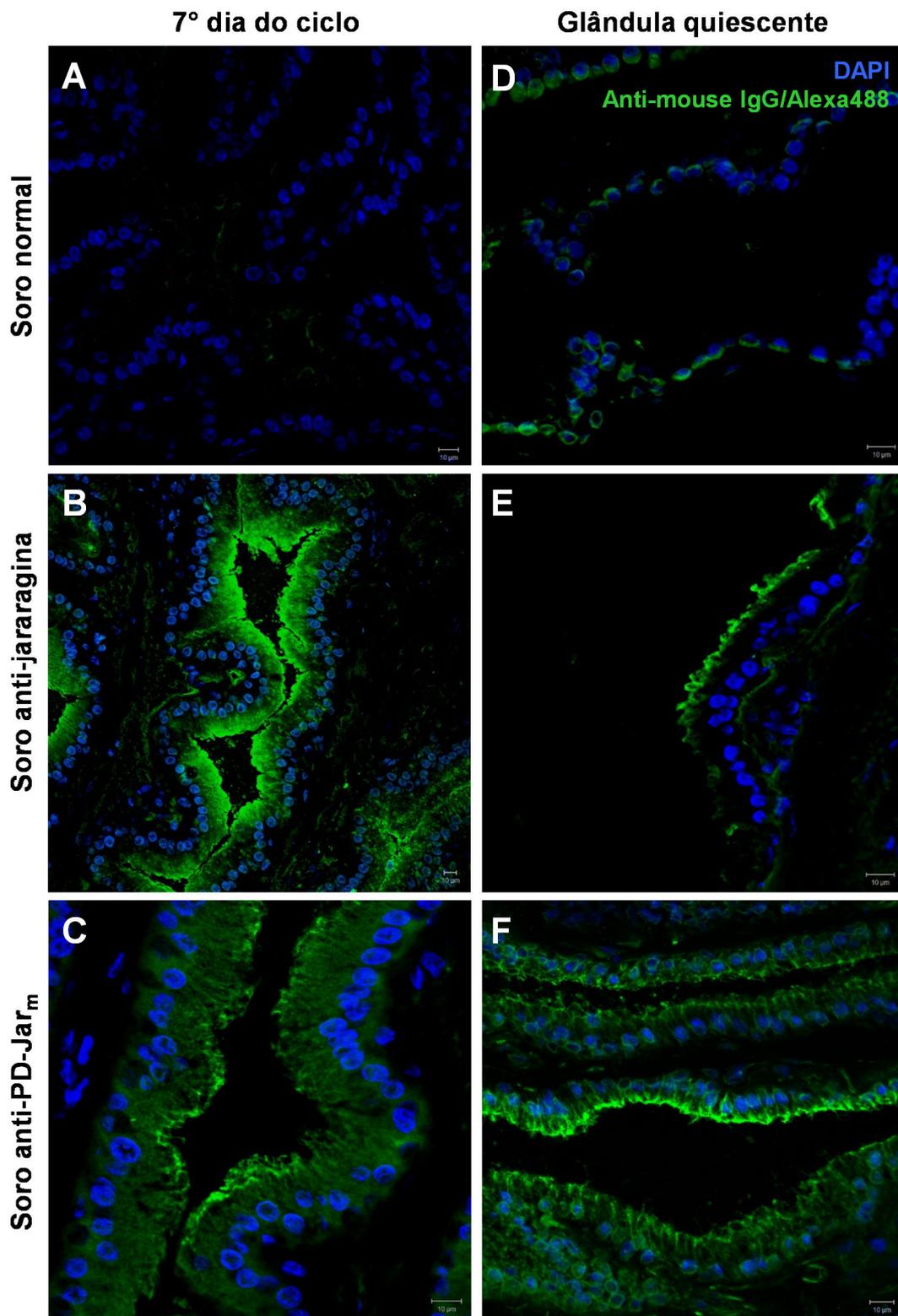
As abordagens bioquímicas utilizadas no trabalho nos ajudaram a identificar a presença do pró-domínio principalmente em amostras de glândula de veneno, indicando onde provavelmente esteja ocorrendo algumas etapas do processamento das SVMPs. Para confirmarmos esses dados, foi decidido usar os anticorpos anti-PD-Jar para detectar a localização dos zimogênios ou do pró-domínio livre em cortes de glândulas de veneno coletadas no estado quiescente e no pico de produção de veneno (7 dias). A detecção do pró-domínio em tecidos de glândula e seus compartimentos celulares foi obtida por imunofluorescência e imunoeletromicroscopia (microscopia eletrônica de transmissão), respectivamente.

A primeira técnica adotada foi a imunofluorescência, para a qual foram utilizados três soros diferentes; soro normal de camundongo para servir como controle negativo; soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> para mostrar a marcação do pró-domínio na glândula; soro anti-jararagina para mostrar a diferença de marcação entre o pró-domínio e as SVMPs processadas. Sendo este um soro policlonal, reconhece não só a jararagina e sim várias outras SVMPs de diferentes classes. O soro normal mostrou uma marcação muito fraca, sendo considerados níveis basais de fluorescência (Figura 19 A e D). O soro anti-jararagina marcou fortemente a região

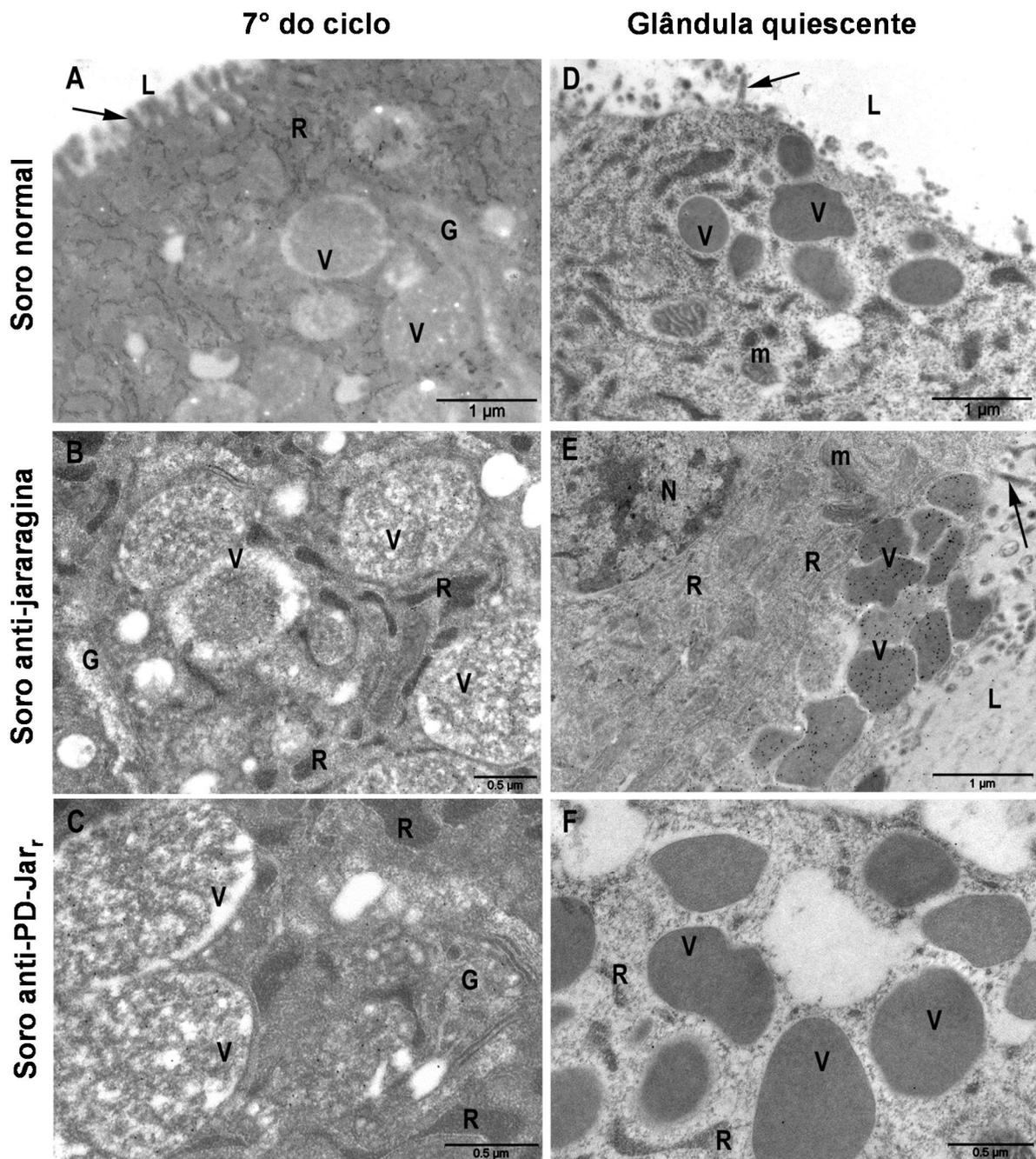
apical das células tanto no tecido coletado no estado quiescente quanto no pico de produção de veneno (Figura 19 B e E). De forma similar, o soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> mostrou uma marcação predominantemente na região apical das células secretoras de veneno dos dois tecidos (Figura 19 C e F).

A localização dos zimogênios nas vesículas secretoras foi possível através do reconhecimento dos pró-domínios por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 20). Os cortes utilizados neste experimento também foram da glândula no estado quiescente e no pico de produção de veneno (7 dias), onde os soros utilizados foram: soro normal de coelho e soro anti-jararagina produzido em coelhos, usados como controles e o soro anti-PD-Jar<sub>r</sub>.

Uma vez mais, a incubação dos cortes com soro normal, utilizado como controle, não resultou em marcações significativas (Figura 20 A e D). Por outro lado, usando soros anti-jararagina ou anti-PD-Jar<sub>r</sub>, os pontos positivos foram detectados tanto no pico de produção de veneno (7 dias) quanto no estado quiescente. Aos 7 dias, as marcações com ouro coloidal foram detectadas no retículo endoplasmático, Golgi e nas vesículas secretoras (Figura 20 B e C). A marcação com o soro anti-jararagina foi mais intensa do que com o soro anti-PD-Jar<sub>r</sub>, na glândula quiescente mas com as mesmas localizações indicando que zimogênios de SMVP estão concentrados nas vesículas secretoras ainda não processados (Figura 20 E e F, respectivamente).



**Figura 19** – Localização celular do pró-domínio por imunofluorescência. Glândulas de veneno foram corados com: **(A e D)** soro normal de camundongo: nível basal de fluorescência (verde). **(B e E)** soro anti-jararagina marcado na região apical das células secretoras nas glândulas coletadas tanto no pico de produção de veneno quanto no estado quiescente (verde). **(C e F)** soro anti-PD-Jar<sub>m</sub> marcado na região apical de células secretoras nas glândulas coletadas tanto no pico de produção de veneno quanto no estado quiescente (verde). A coloração nuclear foi feita com DAPI (azul). O Material foi analisado em um microscópio confocal LSM-780-NLO (Zeiss).



**Figura 20** – Localização celular do pró-domínio por imunoeletromicroscopia. As setas indicam microvilosidades apicais; (L) lúmen tubular; (G) aparelho de Golgi; (R) cisternas do retículo endoplasmático rugoso; (V) vesículas secretoras; (N) núcleo; (m) mitocôndrias. As glândulas de veneno coletadas foram marcadas com os seguintes soros: **(A e D)** soro normal de coelho como controle negativo onde não houve marcação específica sobre as estruturas das células secretoras. **(B e E)** soro anti-jararagina; **(B)** presença de marcação principalmente sobre as vesículas secretoras e algumas marcações foram observadas ao longo das cisternas do aparelho de Golgi; **(E)** vesículas secretoras apicais foram intensamente marcadas. **(C e F)** soro anti-PD-Jar; **(C)** marcação observada ao longo do aparelho de Golgi e sobre as vesículas secretoras; **(F)** marcações raras são observadas sobre as vesículas secretoras. Os cortes foram examinados com um microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss).

## 5. DISCUSSÃO

As metaloproteinases são sintetizadas como precursores inativos, na forma de pró-proteínas. Em adição à clivagem do peptídeo sinal, os zimogênios precisam de processamento pós-traducional para se tornarem enzimas biologicamente ativas. Este é um mecanismo conhecido que permite que as células regulem a atividade enzimática destas proteínas. Na porção N-terminal destas proteínas está localizado o peptídeo sinal, que direciona os precursores para os compartimentos de secreção celular, enquanto que o pró-domínio desempenha diversas funções, incluindo a regulação da atividade enzimática (SHINDE; INOUE, 2000). Este mecanismo desempenha um papel fundamental em muitos processos biológicos importantes, como o desenvolvimento embrionário, reações inflamatórias, doenças neurodegenerativas, câncer e em patologias virais e bacterianas (THOMAS, 2002). Assim sendo, vários estudos chamam a atenção sobre a participação do pró-domínio e seu processamento por proteólise limitada para a regulação das atividades enzimáticas de MMPs e ADAMs em diferentes tecidos (ENDRES et al., 2003; LEE et al., 2006; MAYER et al., 2008; KOO et al., 2009).

As metaloproteinases do veneno de serpente também são moléculas chave na atividade do veneno, incluindo os sintomas induzidos pelo envenenamento ocasionado por acidentes em humanos (MOURA-DA-SILVA et al., 2007). Os seus substratos naturais são proteínas da matriz extracelular (BALDO et al., 2010) e também outras moléculas reguladoras importantes como os fatores da cascata de coagulação (KAMIGUTI et al., 1996b), citocinas pró-inflamatórias (MOURA-DA-SILVA et al., 1996b; CLISSA et al., 2001), receptores de membrana celular (KAMIGUTI et al., 1996a); que também estão envolvidas no dano celular induzindo apoptose (COSTA; SANTOS, 2004; DÍAZ et al., 2005; TANJONI et al., 2005). Quando injetado em presas da serpente ou em vítimas humanas, as SVMPs já estão na sua forma ativa, mas antes disso o veneno é armazenado no lúmen das glândulas de veneno durante longos períodos de tempo, antes que seja necessário ser utilizado para a alimentação ou defesa. Durante este período, as SVMPs poderiam atuar sobre as células epiteliais e da matriz extracelular da própria glândula de veneno ou até mesmo degradar outras toxinas do veneno. Por isso, o

armazenamento das SVMPs na glândula de veneno como zimogênios seria uma vantagem para a proteção dos tecidos glandulares.

No entanto, pouco se sabe sobre o papel do pró-domínio das SMVPs na proteção dos tecidos da glândula antes da injeção do veneno. Uma razão pela qual poucos dados estão disponíveis sobre esta questão se dá ao fato da grande dificuldade em acessar estas pró-enzimas nos compartimentos celulares em que são produzidas e transformadas nas glândulas de veneno das serpentes. Este problema foi superado no presente estudo pela utilização de diferentes abordagens imunológicas, utilizando antissoros específicos para o pró-domínio. Os anticorpos anti-pró-domínio foram obtidos pela imunização de camundongos e coelhos com um fragmento recombinante da jararagina correspondente apenas ao seu pró-domínio (PD-Jar).

Para a amplificação do cDNA referente ao pró-domínio, utilizamos como referência as sequências de duas SVMPs muito expressas no veneno de *B. jararaca*: a jararagina (PAINE et al., 1992) e a botropasina (ASSAKURA et al., 2003). A partir das sequências foram desenhados *primers* para a etapa de amplificação do cDNA por PCR. Realizamos duas reações diferentes de PCR com o intuito de amplificar o cDNA correspondente às duas proteínas, porém a sequência depositada do pró-domínio da jararagina não está completa, faltando 57 nucleotídeos na porção N-terminal. Desta forma, as duas reações de PCR foram realizadas com o mesmo *primer* senso e diferentes *primers* antisenso. Essa abordagem só foi adotada depois de feita análise das sequências dos dois pró-domínios, onde observamos que as duas possuem identidade de 98%, sendo assim muito similares, com regiões bastante conservadas. Os pró-domínios das SVMPs são bastante conservados nas diferentes classes de SVMPs encontradas em diferentes venenos. Dessa forma, a utilização dos *primers* descritos acima seria uma boa abordagem a ser tomada, resultando em um domínio recombinante de uma SVMP da classe P-III potencialmente similar com o das SVMPs das demais classes.

As duas reações geraram cDNAs correspondentes ao tamanho esperado do pró-domínio. Estes dois cDNAs foram então chamados de PD-Bot e PD-Jar por conta dos *primers* diferentes que foram usados. Para a clonagem, escolhemos o cDNA PD-Jar. A clonagem foi realizada com sucesso no vetor pAE (RAMOS et al., 2001), que possui o promotor T7 ( $P_{T7}$ ), reconhecido pela T7 RNA polimerase do fago

$\lambda$ , cujo o gene encontra-se sob controle do promotor *lacUV5* inserido no cromossomo das bactérias designadas como DE3, que é induzível por IPTG. Este vetor apresenta também uma região que codifica uma sequência de 6 histidinas que é expressa em fusão com a proteína de interesse, para posterior purificação com resina de afinidade.

Feita a clonagem do inserto no vetor, o clone 12 foi selecionado por PCR para o sequenciamento. Este sequenciamento nos mostrou a identidade completa da molécula recombinante com o pró-domínio da jararagina e alta identidade com pró-domínios de outras SVMPs de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, indicando que os epítomos comuns podem ser compartilhados entre esses pró-domínios. Além disso, soros policlonais reconhecem múltiplos epítomos e, por isso, esperava-se que o soro preparado com a molécula recombinante fosse hábil em reconhecer pró-domínios nativos de SVMPs das classes P-I, P-II e P-III do veneno de *B. jararaca*. A especificidade do soro produzido com a molécula recombinante (PD-Jar) foi confirmada por titulação por ELISA contra PD-Jar ou a jararagina na forma madura, que compreende apenas os domínios catalítico, tipo-disintegrina e rico em cisteína. A observação de que a reatividade do soro anti-PD-Jar era específica para seu antígeno homólogo garante a adequação desta ferramenta para as outras etapas deste estudo.

Visando entender quando e onde ocorre o processamento das SVMPs, decidimos coletar amostras de veneno em diferentes dias do ciclo de produção do veneno para que assim pudéssemos verificar se existem diferenças na composição do veneno durante o ciclo de produção do veneno.

Inicialmente foi colhido o veneno da glândula quiescente e com 7 dias após extração inicial e as amostras foram coletadas individualmente de cada presa, uma com a presença de inibidores de proteases e da outra sem esses inibidores. Este procedimento foi adotado para verificar se o processamento das SVMPs poderia estar ocorrendo após a liberação do veneno, por alguma protease presente no mesmo. Nossos resultados mostram que não existem diferenças entre os venenos colhidos com inibidores ou sem inibidores, pois as bandas encontradas por WB foram as mesmas nas duas condições. Isto sugere que, sob as condições estritas de conservação usadas neste trabalho, as enzimas presentes no veneno não alteram a integridade dos zimogênios ou pró-domínios livres encontrados nas amostras. Com

isso passamos a utilizar todas as amostras com inibidores de proteases para diminuir a possibilidade de interferências pós-coleta em nossos resultados.

Além disso, nosso resultado de WB mostrou que foram encontradas duas bandas no veneno colhido com 7 dias: uma na altura de 22 kDa sugerindo ser o pró-domínio livre já processado e outra banda na altura de 45 kDa sugerindo ser uma SVMP de classe P-I ainda não processada. Estas bandas foram excisadas do gel de SDS-PAGE e analisadas por espectrometria de massas. Por se tratar de uma banda extraída de um gel onde foi aplicado o veneno total, a análise nos mostrou muitos contaminantes oriundos do veneno, ficando difícil interpretar os dados obtidos. De qualquer forma, nas duas bandas recortadas foram encontrados peptídeos correspondentes ao pró-domínio.

Verificamos que somente a amostra de veneno coletada com 7 dias apresentou bandas positivas e, portanto, passamos à análise do veneno colhido nos demais dias do ciclo de produção de veneno pela glândula, ou seja, dias 4, 10, 14 e 21. Escolhemos esses dias pois se sabe que o pico máximo de produção de veneno pela célula secretora é de 8 dias (KOCHVA, 1987). Com isso, ficamos com seis dias diferentes do ciclo de produção de veneno para identificar amostras de pró-domínio processadas ou não.

Usando ensaios de WB e ELISA quantitativo, observou-se que a maioria do processamento ocorre no lúmen da glândula de veneno, logo após secreção das SVMPs. Isto foi inferido pela presença de bandas que correspondem às massas moleculares de zimogênio nas amostras de glândula extraídas ao longo de todo o ciclo de produção do veneno em comparação com bandas de menor massa molecular, presentes em amostras de veneno apenas no pico de produção de veneno, cuja mobilidade correspondem aos valores esperados para zimogênios de SVMPs classe PI e pró -domínios em seu estado livre. Em amostras de veneno coletadas diretamente do lúmen de glândulas de veneno, as bandas de mobilidade correspondente a massas moleculares de zimogênios das três classes de SVMPs foram fortemente reveladas pelo anti-PD-Jar<sub>m</sub>, no auge da produção de veneno. No entanto, essas bandas apareceram de maneira muito fraca no veneno do lúmen das glândulas quiescentes. Esta observação indica que a maioria do processamento ocorre após a secreção das SVMPs dentro do lúmen da glândula de veneno, descartando a possibilidade de ativação de zimogênio nas regiões posteriores, como

a glândula acessória e ductos, no momento da inoculação do veneno nas presas ou em acidentes com humanos.

A comparação da concentração de pró-domínios como zimogênios ou em forma livre (com soro anti-PD-Jar) e outros domínios presentes nos zimogênios ou na enzima madura (com soro anti-jararagina) também indica a baixa taxa de processamento do pró-domínio dentro das células secretoras e que a maior parte deste evento ocorre no lúmen da glândula de veneno. Tais observações indicam que, após a clivagem no lúmen, pró-domínios sofrem hidrólise adicional gerando diversos peptídeos que não são imunorreativos com os anticorpos anti-PD-Jar, explicando a ausência da banda de 22 kDa nos venenos coletados no estado de repouso das glândulas. A este respeito, peptídeos de pró-domínio de SMVP são muito raros em proteomas de venenos de serpentes, com algumas exceções (VALENTE et al., 2009), mas eles foram recentemente encontrados em peptidomas do veneno de *B. jararaca* (TASHIMA et al., 2012) e proteomas de extratos de glândula de *B. jararaca* (LUNA et al., 2013), o que é consistente com esta hipótese.

A identificação de peptídeos de pró-domínio em cada banda por MS/MS foi possível após a remoção da maioria das proteínas do veneno através da imunoprecipitação de antígenos reativos com anticorpos anti-PD-Jar<sub>r</sub>. A recuperação do pró-domínio por imunoprecipitação foi menor do que o esperado, resultando em bandas fracamente marcadas. Embora a eficácia de acoplamento das imunoglobulinas ser superior a 90% (dados não mostrado), anticorpos policlonais de soros imunes de coelho contêm várias moléculas de IgG com especificidade não relacionada que se ligam à Sepharose em conjunto com as IgGs anti-pró-domínio específicos. Isto prejudica a reatividade dos epítopos do pró-domínio com o anti-PD-Jar ligado a Sepharose. Outro problema é que a Sepharose ativada com brometo de cianogênio permite que a molécula de IgG se ligue tanto com a porção Fc, deixando assim a porção Fab livre para se ligar ao antígeno, quanto com a porção Fab, deixando assim esta mesma porção impedida de se ligar ao antígeno. Além disso, o acoplamento pode alterar a afinidade das moléculas, e estes fatos podem ser a causa da baixa quantidade de amostras eluídas por esta metodologia.

No entanto, os peptídeos de pró-domínio foram detectados em todas as bandas, confirmando a especificidade do anti-soro para a detecção de antígeno. A cobertura da sequência de pró-domínio a partir de peptídeos identificados foi maior

nas bandas dos extratos de glândulas de veneno. Um achado interessante foi a presença dos peptídeos ASQLVVTAEEQK e mais raramente ASQSNLTPEQQR em bandas coletadas a partir de extratos de glândula e ASQSNLTPEQQR ou ASQSNLTPEHQQR em bandas de amostras de veneno. Estes peptídeos contêm resíduos da porção C-terminal do pró-domínio e resíduos N-terminais de domínios catalíticos. Os últimos quatro resíduos do primeiro peptídeo encontrado nas glândulas de veneno (EQQK) corresponde a parte N-terminal da jararagina e outras SVMPs de classe P-III. Os outros peptídeos, principalmente detectados em amostras de veneno, são encontrados nas SVMPs de classe P-I e P-II de venenos de *Bothrops* (ver a Figura 8) e TPEQQR é a porção N-terminal de algumas SVMPs de classe P-II como a insularinase (MODESTO et al., 2005).

Estas observações podem indicar que o processamento das SVMPs de classe P-III ocorre mais rápido do que nas classes P-I e P-II, portanto, zimogênios da classe P-III são dificilmente detectados em venenos mesmo no auge de sua produção. Um fato interessante é que os resíduos encontrados ASQS na porção N-terminal destes peptídeos são o início de um par de argininas que se assemelha ao sítio de clivagem da proteína pró-convertase furina, uma serinoprotease subtilisina semelhante às presentes na rede de trans-Golgi (THOMAS, 2002) e responsável pela clivagem intercelular dos pró-domínios da maioria ADAMs e alguns MMPs (PEI; WEISS, 1995; SATO et al., 1996; KANG et al., 2002; KLEIN; BISCHOFF, 2011).

Uma possibilidade seria supor que a remoção do pró-domínio das SMVPs também poderia ocorrer pela ação de enzimas tipo-furina. No entanto, o processamento do pró-domínio de SMVP por furinas não foi confirmado com o uso do programa ProP 1.0 Version (DUCKERT et al., 2004), que prediz sítios de clivagem por furinas ou outras pró-convertases, pois este não revelou nenhum suposto alvo para a ação destas enzimas durante o processamento.

Em SVMPs, etapas adicionais de processamento são conhecidos por ocorrer após a clivagem do pró-domínio. A maioria das SVMPs de classe P-III apresenta em sua forma madura um ácido piro-glutâmico na porção N-terminal (FOX; SERRANO, 2008). A presença da GPC (glutamyl peptide cyclotransferase) foi detectada em bandas de 45 kDa em amostras coletadas nos dias 7 e 10 do ciclo de produção de veneno. Esta enzima está envolvida na modificação pós-traducional de SVMPs, responsável pela conversão do resíduo glutâmico da porção N-terminal em

piroglutâmico, protegendo, assim, as enzimas de possíveis digestões por aminopeptidases (FISCHER; SPIESS, 1987).

A localização de pró-domínios em cortes de glândulas de veneno também sugeriu que o processamento de zimogênios ocorre após o Golgi. Por técnicas de imunohistoquímica, identificamos marcação de pró-domínio na mesma localização dos antígenos reativos ao soro contra jararagina processada, na superfície apical das células secretoras da glândula de veneno. Através de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, foi possível assegurar que, tanto o pró-domínio e os domínios de enzimas maduras estão localizadas principalmente no interior das vesículas secretoras. Muito pouca quantidade de marcação por ouro foi observada no retículo endoplasmático ou Golgi, indicando que as proteínas nascentes não são bem reconhecidos por ambos antissoros.

Nas vesículas secretoras, ambos soros revelaram algumas marcações na glândula do 7º dia do ciclo e o número destas marcações aumentou nas células quiescentes, em particular em tecidos tratados com os soros contra a proteína madura. O acúmulo de SVMPs maduras em vesículas secretoras durante o ciclo de produção do veneno já foi visto (CARNEIRO et al., 2002) e os nossos resultados são consistentes com os dados anteriores. É importante notar que as reações de imunofluorescência e de microscopia eletrônica com o soro anti-jararagina foram sempre mais intensas do que com o anti-PD-Jar. Isso pode ser o reflexo do maior título de anticorpos do soro anti-jararagina e sugerir uma avidéz maior para os seus anticorpos. No entanto, tendo estes dados juntamente com os dados de WB, é evidente que as SVMPs se acumulam nas vesículas secretoras principalmente no seu estado de pró-enzima. Quando secretadas para o lúmen da glândula de veneno, a clivagem do pró-domínio ocorre, resultando em enzimas ativas.

A evidência de que o pró-domínio esteja sendo degradado no lúmen da glândula pode ser o que comprova os dados publicados por Valente e colaboradores (2009) e por Tashima e colaboradores (2012), e talvez os peptídeos gerados a partir desta degradação possam regular de alguma forma a atividade das SVMPs dentro da glândula, atuando juntamente com o pH ácido do lúmen da glândula de veneno e os tripeptídeos de pyrol-glutamato nela existentes, contribuindo para a falta de atividade proteolítica das SVMPs na glândula (ROBEVA et al., 1991; MACKESSY; BAXTER, 2006; MARQUES-PORTO et al., 2008).

Entretanto, o papel do pró-domínio na inativação de SVMPs maduras dentro do lúmen da glândula ainda é uma questão a ser respondida. Nosso grupo de pesquisa está atualmente avaliando a presença no veneno de peptídeos resultantes da digestão de pró-domínios. Estes pequenos peptídeos podem ser capazes de inativar as enzimas temporariamente até que o veneno ativo seja necessário para a captura de presas. Os peptídeos sintéticos construídos de acordo com o motivo *cysteine switch* da adamalisina II foram capazes de inativar a enzima (GRAMS et al., 1996). Por conseguinte, um artigo recente mostrou que um mecanismo similar que ocorre em ADAMs, em que o pró-domínio recombinante da ADAM-9 é um inibidor competitivo da ADAM-9 já processada de humanos, com alta especificidade e alguma importância no controle da doença de Alzheimer (MOSS et al., 2011).

A busca de inibidores específicos para SVMPs, MMPs e ADAMs é um tema fundamental na descoberta de novas drogas para o tratamento de várias doenças, além de acidentes ocasionados por venenos de serpentes. Compreender a ativação dessas enzimas e a possibilidade de utilizar as sequências de pró-domínio como inibidores específicos são as nossas principais questões para estudos posteriores que serão usados para a compreensão de venenos de serpentes e podem ser extrapolados para os tratamentos de picadas de serpentes ou outras patologias em que ADAMs e MMPs estejam envolvidas.

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento desta Tese, podemos dizer que alcançamos dados consistentes para responder algumas dúvidas ainda persistentes quanto ao processamento das SVMPs. O sucesso na produção do soro específico anti-pró-domínio foi uma ferramenta fundamental para tais descobertas e, contando com o auxílio deste soro, verificamos a presença de zimogênios de SVMPs de classe P-I e o pró-domínio livre presente no veneno somente no pico de produção de veneno pelas células secretoras da glândula de veneno. Já em amostras de extratos proteicos das glândulas de veneno, identificamos a presença de zimogênios das três classes de SVMPs. Estes dados foram confirmados com o auxílio da proteômica. Para completar nossos achados, os experimentos de localização celular auxiliaram a responder o que ainda não estava totalmente elucidado.

Tomados em conjunto, os nossos dados mostram que o processamento das SVMPs começa dentro de vesículas secretoras de veneno das células secretoras e ocorre predominantemente no lúmen da glândula de veneno apenas após a secreção das enzimas. Como tal, a ativação das SMVPs difere de ADAMs e MMPs, mas pode ser utilizada como um modelo para o estudo da relevância dos peptídeos resultantes do processamento e degradação do pró-domínio para o controle da atividade de metaloproteinases. Estes dados foram obtidos através do uso de diferentes técnicas bioquímicas, imunoquímicas, moleculares e celulares, tornando assim nosso trabalho bastante amplo e multidisciplinar.

## REFERÊNCIAS\*

ANDERS, A.; GILBERT, S.; GARTEN, W.; POSTINA, R.; FAHRENHOLZ, F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. **FASEB J.**, v. 15 n. 10, p. 1837–1839, 2001.

ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, F. R. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. R.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 6-12.

ASSAKURA, M. T.; SILVA, C. A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M. 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.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4 n. 6, e727, 2010.

BDOLAH, A. The venom glands of snakes and venom secretion. In: LEE, C. Y. (Ed.). **Snake venom**, Handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer Verlag, 1979. v. 52. p. 41-57.

BELLUOMINI, H. E. In: **Venomous Animals and Their Venoms** Eds. W. Bucherl, V. Buckley, V. Deulofeu. New York, Academic Press, V. I, p. 97-117, 1968.

BEN-SHAUL, Y.; LIFSHITZ, S. H.; KOCHVA E. Ultrastructural aspects of secretion in the venom glands of *Vipera palaestinae*. In: DE VRIES, A.; KOCHVA E. (Ed.). **Toxins of animal of plants origin**. London: Gordon and Breach, 1971. p. 87-107.

BERRYMAN, M. A.; RODEWALD, R. D. An enhanced method for post-embedding immunocytochemical staining which preserves cell membrane. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 38, p. 159-170, 1990.

**\*De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHANDARI, P.; GOWRISHANKAR, J. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. **J. Bact.**, v. 179, p. 4403-6, 1997.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v. 62 n. 3, p. 325-372, 1994.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Lett.**, v. 331 n. 1-2, p. 134-140, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. Ed. Brasília, DF, 2009. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 1998. 131 p.

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

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of latin America. **Ithaca and London**, Comstok, 1989. 6. Ed. p. 425.

CARDOSO, J. L. C.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O. S.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, L. S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L.; CHUDZINSKY, A. M.; CASTRO, S. C. B.; KAMIGUTI, A. S.; KELEN, E. M. A.; HIRATA, M. H.; MIRANDOLA, R. M. S.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Randomized comparative Trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. **Q. J. Med.**, v. 86, p. 315-325, 1993.

CARNEIRO, S. M.; ASSAKURA, M. T.; BARRENCE, F. A.; CARDOSO, S. R.; DE MARTINS CAMARGO, A. C.; SESSO, A. Immunolocalization of venom metalloproteases in venom glands of adult and of newborn snakes of *Bothrops jararaca*. **Tissue Cell**, v. 34 n. 6, p. 381-389, 2002.

CARNEIRO, S. M.; PINTO, V. R.; JARED, C.; LULA, L. A.; FARIA, F. P.; SESSO, A. Morphometric studies on venom secretory cells from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) before and after venom extraction. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 569-580, 1991.

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zool. Scripta**, v. 41, n. 2, p. 109-124, 2012.

CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA, M.; VALENTE, R. H.; DOMONT, G. B. Caititu: a tool to graphically represent peptide sequence coverage and domain distribution. **J. Proteomics**, v. 71 n. 4, p. 486-489, 2008.

CASEWELL, N. R. On the ancestral recruitment of metalloproteinases into the venom of snakes. **Toxicon**, v. 60, p. 449-454, 2012.

CLISSA, P. B.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D.; MOTA, I.; TAYLOR, M. J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39 n. 10, p. 1567-1573, 2001.

COSTA, E. P.; SANTOS, M. F. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase-disintegrin, stimulates epithelial cell migration in an in vitro restitution model. **Toxicon**, v. 44 n. 8, p. 861-870, 2004.

DE LUCCA, F. L.; HADDAD, A.; KOCHVA, E.; ROTHSCHILD, A. M.; VALERI, V. Protein synthesis and morphological changes in the secretory epithelium of the venom gland of *Crotalus durissus terrificus* at different times after manual extraction of venom. **Toxicon**, v. 12, n. 4, p. 361-368, 1974.

DÍAZ, C.; VALVERDE, L.; BRENES, O.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 94 n. 3, p. 520-528, 2005.

DUCKERT, P.; BRUNAK, S.; BLOM, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. **Protein Eng. Des. Sel.**, v. 17 n. 1, p. 107-112, 2004.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Mol. Aspects Med.**, v. 29 n. 5, p. 258-289, 2008.

ENDRES, K.; ANDERS, A.; KOJRO, E.; GILBERT, S.; FAHRENHOLZ, F.; POSTINA, R. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. **Eur. J. Biochem.**, v. 270 n. 11, p. 2386-2393, 2003.

ESCALANTE, T.; ORTIZ, N.; RUCAVADO, A.; SANCHEZ, E. F.; RICHARDSON, M.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. **PLoS One**, v. 6 n. 12, e28017, 2011.

FISCHER, W. H.; SPIESS, J. Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84 n. 11, p. 3628-3632, 1987.

FOWLKES, J. L.; WINKLER, M. K. Exploring the interface between metallo-proteinase activity and growth factor and cytokines bioavailability. **Cytok. Grow. Fact. Rev.**, v. 13, p. 277-287, 2002. Review.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v. 275, p. 3016-30, 2008. Review.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. R.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p.13-32.

FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S. F.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, M. K.; HODGSON, W. C.; IGJATOVICK, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, p. 584-588, 2005.

GANS, C.; ELLIOT, W. B. Snake venoms: production, injection and action. **Adv. Oral. Biol.**, v. 3, p. 45-81, 1968.

GOMES, N.; PUORTO, G. Atlas anatômico de Bothrops jararaca Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 55, p. 69-100, 1993.

GOMIS-RÜTH, F. X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. **J. Biol. Chem.**, v. 284 n. 23, p. 15353-15357, 2009.

GOMIS-RÜTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Mol. Biotechnol.**, v. 24 n. 2, p. 157-202, 2003.

GONZALES, P. E.; SOLOMON, A.; MILLER, A. B.; LEESNITZER, M. A.; SAGI, I.; MILLA, M. E. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro-domain. **J. Biol. Chem.**, v. 279 n. 30, p. 31638–31645, 2004.

GRAMS, F.; DIVE, V.; YIOTAKIS, A.; YIALLOUROS, I.; VASSILIOU, S.; ZWILLING, R.; BODE, W.; STÖCKER, W. Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor. **Nat. Struct. Biol.**, v. 3 n. 8, p. 671-675, 1996.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LÉON, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; YAMILETH, A. Trends in snakebite therapy: scientific. Technological and public health considerations. **Curr. Pharm. Desig.**, v. 13, p. 1-16, 2007. Review.

HITE, L. A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308 n. 1, p. 182-191, 1994.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Lett.**, v. 354 n. 1, p. 1-6, 1994.

HOWARD, L.; MACIEWICZ, R. A.; BLOBEL, C. P. Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. **Biochem. J.**, v. 348, p. 21-27, 2000.

HUANG, T. F.; CHANG, M. C.; TENG, C. M. Antiplatelet protease, kistomin, selectively cleaves human platelet glycoprotein Ib. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1158 n. 3, p. 293-299, 1993.

JAMIESON, J. D.; PALADE, G. E. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. **J. Cell Biol.**, v. 34, n. 2, p. 577-596, 1967a.

JAMIESON, J. D.; PALADE, G. E. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. **J. Cell Biol.**, v. 34, n. 2, p. 597-615, 1967b.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34 n. 6, p. 627-642, 1996b.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320 n. 2, p. 635-641, 1996a.

KANG, T.; NAGASE, H.; PEI, D. Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. **Cancer Res.**, v. 62 n. 3, p. 675-681, 2002.

KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: LEE, C. Y. (Ed.). **Snake venom**, Handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer Verlag, 1979. v. 52. p. 159-212.

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

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. **J. Proteome Res.**, v. 10 n. 1, p. 17-33, 2011.

KOCHVA, E. Oral glands of the Reptilia. In: GANS, C. (Ed.). **Biology of the reptilian**. London: Academic Press, 1978. v. 8b. p. 43-161.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65-106, 1987.

KOCHVA, E.; NAKAR, O.; OVADIA, M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **Amer. Zool.**, v. 23, p. 427-430, 1983.

KOO, B. H.; KIM, H. H.; PARK, M. Y.; JEON, O. H.; KIM, D. S. Membrane type-1 matrix metalloprotease-independent activation of pro-matrix metalloprotease-2 by proprotein convertases. **FEBS J.**, v. 276 n. 21, p. 6271-6284, 2009.

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

LEE, E. R.; LAMPLUGH, L.; KLUCZYK, B.; MORT, J. S.; LEBLOND, C. P. Protease analysis by neopeptide approach reveals the activation of MMP-9 is achieved proteolytically in a test tissue cartilage model involved in bone formation. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 54 n. 9, p. 965-980, 2006.

LI, M.; FRY, B. G.; KINI, R. M. Eggs-only diet: its implications for the toxins profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). **J. Mol. Evol.**, v. 60, p. 81-89, 2005b.

LI, M.; FRY, B. G.; KINI, R. M. Putting the brakes on snake venom evolution: the unique molecular evolutionary patterns of *Aipysurus eydouxii* (marbled sea snake) phospholipase A<sub>2</sub> toxins. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22 n. 4, p. 934-941, 2005a.

LITTLE, J. R.; DONAHUE, H. Spectral properties of proteins and small molecules of immunological interest. **Met. Immunol. Immonochem.**, v. 2, p. 343-364, 1968.

LUM, L.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **J. Biol. Chem.**, v. 273 n. 40, p. 26236-26247, 1998.

LUNA, M. S.; VALENTE, R. H.; PERALES, J.; VIEIRA, M. L.; YAMANOUYE, N. Activation of *Bothrops jararaca* snake venom gland and venom production: A proteomic approach. **J. Proteomics**, v. 94, p. 460-472, 2013.

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

MACKESSY, S. P. Morphology and ultrastructure of the venom gland of the Northern pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. **J. Morphol.**, v. 208, p. 109-128, 1991.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, p. 147-159, 2006.

MARQUES-PORTO, R.; LEBRUN, I.; PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: the metallopeptidases and their intrinsic peptidic

inhibitor. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 147 n. 4, p. 424-433, 2008.

MAYER, G.; HAMELIN, J.; ASSELIN, M. C.; PASQUATO, A.; MARCINKIEWICZ, E.; TANG, M.; TABIBZADEH, S.; SEIDAH, N. G. The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. **J. Biol. Chem.**, v. 283 n. 4, p. 2373-2384, 2008.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. R.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33-61.

MILLA, M. E.; GONZALES, P. E.; LEONARD, J. D. The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 44 n. 3, p. 342-348, 2006.

MODESTO, J. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; NEVES-FERREIRA, A. G.; FRITZEN, M.; OLIVA, M. L.; HO, P. L.; PERALES, J.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. **Biol. Chem.**, v. 386 n. 6, p. 589-600, 2005.

MOSS, M. L.; BOMAR, M.; LIU, Q.; SAGE, H.; DEMPSEY, P.; LENHART, P. M.; GILLISPIE, P. A.; STOECK, A.; WILDEBOER, D.; BARTSCH, J. W.; PALMISANO, R.; ZHOU, P. The ADAM10 pro-domain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. **J. Biol. Chem.**, v. 282 n. 49, p. 35712-35721, 2007.

MOSS, M. L.; POWELL, G.; MILLER, M. A.; EDWARDS, L.; QI, B.; SANG, Q. X.; DE STROOPER, B.; TESSEUR, I.; LICHTENTHALER, S. F.; TAVERNA, M.; ZHONG, J. L.; DINGWALL, C.; FERDOUS, T.; SCHLOMANN, U.; ZHOU, P.; GRIFFITH, L. G.; LAUFFENBURGER, D. A.; PETROVICH, R.; BARTSCH, J. W. ADAM9 inhibition increases membrane activity of ADAM10 and controls  $\alpha$ -secretase processing of amyloid precursor protein. **J. Biol. Chem.**, v. 286 n. 47, p. 40443-40451, 2011.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: Effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, p. 2893-2905, 2007. Review.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; PAINE, M. J.; DENNISON, J. M.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. Processing of pro-tumor necrosis factor-

alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26 n. 9, p. 2000-2005, 1996b.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Evolution of disintegrin cystein-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. **J. Mol. Evol.**, v. 43, p. 263-269, 1996a.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Molecular evolution of phospholipase A<sub>2</sub> and metalloproteinase/disintegrins from venoms of vipers. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, v. 70, p. 173-187, 1997.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Mol. Aspects Med.**, v. 29 n. 5, p. 290-308, 2008.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 841-854, 2003.

OKAMOTO, T.; AKUTA, T.; TAMURA, F.; VAN DER VLIET, A.; AKAIKE, T. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. **Biol. Chem.**, v. 385 n. 11, p. 997-1006, 2004.

ORON, U.; BDOLAH, A. Regulation of protein synthesis in venom gland of viperid snakes. **J. Cell Biol.**, v. 56, p. 1771-1790, 1973.

OTERO, R.; GUTIERREZ, J. M.; MESA, M.B.; DUQUE, E.; RODRIGUES, O.; ARANGO, J. L.; GOMES, F.; TORO, A., CANO, F.; RODRIGUES, L. M.; CARO, E.; MARTINEZ, J.; CORNEJO, W.; GOMEZ, L. M.; URIBE, F. L.; CARDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, p. 1107-1114, 2002.

PAINE, M. J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem.**, v. 267 n. 32, p. 22869-22876, 1992.

PEI, D.; WEISS, S. J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. **Nature**, v. 375 n. 6528, p. 244-247, 1995.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol. Cell Biol.**, v. 82, p. 488-496, 2004.

PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. **Biochemistry**, v. 22, p. 1621-1630, 1983.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol.**, v. 26 n. 8, p. 587-596, 2007.

RAMOS, C. R.; VILAR, M. M.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L.; THAUMATURGO, N.; EDELENYI, R.; ALMEIDA, M.; DIAS, W. O.; DIOGO, M.; TENDLER, M. r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 131-135, 2001.

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

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

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L. C.; THEAKSTON, R. D. G.; WARREL, D. A. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51 n. 8, p. 1440-1448, 2008.

SATO, H.; KINOSHITA, T.; TAKINO, T.; NAKAYAMA, K.; SEIKI, M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. **FEBS Lett.**, v. 393 n. 1, p. 101-104, 1996.

SCHLOMANN, U.; WILDEBOER, D.; WEBSTER, A.; ANTROPOVA, O.; ZEUSCHNER, D.; KNIGHT, C. G.; DOCHERTY, A. J.; LAMBERT, M.; SKELTON, L.; JOCKUSCH, H.; BARTSCH, J. W. The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. **J. Biol. Chem.**, v. 277 n. 50, p. 48210-48219, 2002.

SCHLÖNDORFF, J.; BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. **J. Cell Sci.**, v. 112 n. 21, p. 3603-3617, 1999.

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

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SHIMOKAWA, K.; JIA, L. G.; WANG, X. M.; FOX, J. W. Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 335 n. 2, p. 283-294, 1996.

SHINDE, U.; INOUE, M. Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 11 n. 1, p. 35-44, 2000.

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PEIXOTO, P. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANOMARTINS, I.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.7 n. 9, e. 2442, 2013.

STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 5 n. 3, p. 383-390, 1995.

STÖCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RÜTH, F. X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, v.4 n. 5, p. 823-840, 1995.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1803 n. 1, p. 20-28, 2010.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10 n. 4, p. 851-861, 2005.

TASHIMA, A. K.; ZELANIS, A.; KITANO, E. S.; IANZER, D.; MELO, R. L.; RIOLI, V.; SANT'ANNA, S. S.; SCHENBERG, A. C.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 11 n. 11, p. 1245-1262, 2012.

THEAKSTON, R. D. G.; LOYD-JONES, M. J.; REID, H. A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and anti-venom antibody. **Lancet**, v. 2, p. 639-641, 1977.

THOMAS, G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3 n. 10, p. 753-766, 2002.

THOMAS, R. G.; POUGH, F. H. The effects of rattlesnake venom on the digestion of prey. **Toxicon**, v. 17, p. 221-228, 1979.

VALENTE, R. H.; GUIMARÃES, P. R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A. G.; SOARES, M. R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M. R.; LEÓN, I. R.; ROCHA, S. L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L.; LEÃO, L. I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J. Proteomics**, v. 72 n. 2, p. 241-255, 2009.

VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87 n. 14, p. 5578-5582, 1990.

VIDAL, N.; HEDGES, S. B. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes and amphisbaenians. **C. R. Biologies**, v. 332, n. 2-3, p. 129-139, 2009.

WARRELL, D. A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: Bon, C.; Goyffon, M. (Ed.). **Envenoming and their treatments**. Lyon: Fondation Marcel Mérieux, p. 63-76, 1995.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.

WARSHAWSKY, H.; HADDAD, A.; GONCALVES, R. P.; VALERI, V.; DE LUCCA, F. L. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake

and radioautographic studies of protein formation by the secretory cells. **Am J Anat.**, v. 138, p. 79-119, 1973.

WEWER, U. M.; MORGELIN, M.; HOLCK, P.; JACOBSEN, J.; LYDOLPH, M. C.; JOHNSEN, A. H.; KVEIBORG, M.; ALBRECHTSEN, R. ADAM12 is a four-leafed clover: the excised prodomain remains bound to the mature enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 281 n. 14, p. 9418–9422, 2006.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005. Review.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; GOPALAKRISHNAKONE, P. The global snakebite initiative: an antidote for snakebite. **The Lancet**, v. 375, p. 89-91, 2010.

ZAGO, D. A. **Estudo Morfológico e histoquímico de glândulas salivares relacionadas com a evolução da função venenosa nos ofídios.** 1971. 69 f. Tese (Doutorado em Histologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971.

## ANEXOS

Tabela A1: Peptídeos identificados a partir de bandas de SDS-PAGE referentes aos antígenos isolados por imunoprecipitação de extratos proteicos de glândulas de veneno

<b>Banda 1: glândula coletada no dia zero (quiescente) do ciclo de produção de veneno (~ 60 kDa)</b>							
<b>Proteína*</b>	<b>Número de acesso*</b>	<b>Score**</b>	<b>Peptídeos identificados†</b>	<b>XCorr‡</b>	<b>z</b>	<b>ΔM ppm</b>	<b>MH<sup>+</sup> (Da)</b>
Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3 <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98UF9	15,32	DPCDDAATCK	3,12	2	0,23	1197,43
			NCRDPCCDAATCK	2,83	3	1,87	1627,61
			LHSWVECESGECDDQCR	5,15	3	3,2	2211,83
			YINYKPKQCILNEPLR	2,18	3	2,72	2084,06
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	2,03	3	1,25	1426,58
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	O93523	12,18	<b>ASQLVVTAEQQK</b>	3,47	2	2,23	1301,7
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,26	3	0,14	1450,66
			KIPCAPEDVK	1,72	2	0,79	1156,6
			IPCAPEDVK	1,7	2	1,13	1028,5
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	2,03	3	1,25	1426,58
Metalloproteinase isoform 7 <i>OS=Sistrurus catenatus edwardsii</i>	B0VXU9	9,07	<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,26	3	0,14	1450,66
			DPCDDAATCK	3,12	2	0,23	1197,43
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,69	2	2,16	1358,66
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Gloydus brevicaudus</i>	Q9PVK9	8,97	<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,26	3	0,14	1450,66
			LRPGAQCAEGLCCDQCR	3,67	3	1,59	2050,87
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	2,03	3	1,25	1426,58
Zinc metalloproteinase-disintegrin catroriarin	A2CJE4	3,86	IPCAPEDVK	1,7	2	1,13	1028,5

<i>OS=Crotalus atrox</i>			NPCCDAATCK	2,16	2	0,85	1196,45
<b>Banda 2: glândula coletada no dia zero (quiescente) do ciclo de produção de veneno (~ 50 kDa)</b>							
Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	O93523	31,5	<b>ASQLVVTAEQQK</b>	3,1	2	2,23	1301,7
			DNSPGQNNPCK	2,64	2	0,85	1230,51
			SGSQCGHGDCCCEQCK	2,84	3	1,7	1769,61
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,36	2	2,38	1450,67
			VCSNGHCVDVATAY	2,27	2	1,47	1552,65
			KIPCAPEDVK	2,36	2	1,74	1156,6
			KTDLLTR	1,91	2	0,58	846,5
			MFYSNDDEHK	1,9	2	1,1	1301,51
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	1,87	3	2,86	2100,94
			ITVKPDVDYTLNSFAEWR	3,2	3	3,78	2154,09
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	3,18	4	2,32	2953,15
			IPCAPEDVK	1,96	2	2,91	1028,51
			TDLLTR	1,93	2	2,63	718,41
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops insularis</i>	Q5XUW8	12,99	<b>ASQSNLTPEQQK</b>	2,62	2	0,68	1330,66
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,36	2	2,38	1450,67
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,31	2	3,49	1403,78
			SCIMASTISK	1,95	2	1,95	1113,53
			<b>KVTELPK</b>	1,91	2	2,28	814,5
			<b>GLFSEDYSETHSPDGR</b>	1,85	3	2,29	1959,84
MP_11 SVMP <i>OS=Bothrops neuwiedi</i>	E3UJL3	3,93	<b>ASQSNLTPEQQR</b>	1,98	2	-4,13	1358,66
			SCIMASTISK	1,95	2	1,95	1113,53
Metalloproteinase <i>OS=Echis coloratus</i>	E9JG57	3,92	NPCCDAATCK	2,07	2	1,26	1196,45
			<b>GLFSEDYSETHSPDGR</b>	1,85	3	2,29	1959,84
<b>Banda 1: glândula coletada no dia 4 do ciclo de produção de veneno (~ 60 kDa)</b>							

Proteína*	Número de acceso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	O93523	28,44	YENVEKEDEAPK	3,64	3	1,15	1450,67
			YEDAMQYEFK	3,44	2	0,5	1339,55
			IENDADSTASISACNGLK	3,32	2	1	1865,85
			DYSETHYSPDGR	3,28	2	2,2	1426,59
			ASQLVVTAEEQK	3,39	2	2,13	1301,7
			LSNSEAHAVFK	2,99	2	1,05	1202,61
			SGSQCGHGDCEQCK	2,13	3	0,46	1769,61
			MCGVTQNWK	2,12	2	1,89	1139,49
			DNSPGQNNPCK	2,31	2	2,63	1230,52
KVTALPK	1,82	2	-0,23	756,49			
Zinc metalloproteinase-disintegrin brevilysin-H6 OS= <i>Gloydus brevicaudus</i>	POC7B0	16,07	YEDAMQYEFK	3,44	2	0,5	1339,55
			DYSETHYSPDGR	3,28	2	2,2	1426,59
			SGSQCGHGDCEQCK	2,13	3	0,46	1769,61
			LQGETYLIEPLK	3,09	2	2,53	1403,78
			DNSPGQNNPCK	2,31	2	2,63	1230,52
			KVTALPK	1,82	2	-0,23	756,49
Metalloproteinase 4 OS= <i>Crotalus adamanteus</i>	F8S105	15,3	YENVEKEDEAPK	3,64	3	1,15	1450,67
			YEDAMQYEFK	3,44	2	0,5	1339,55
			IENDADSTASISACNGLK	3,32	2	1	1865,85
			LQGETYLIEPLK	3,09	2	2,53	1403,78
			KVTALPK	1,82	2	-0,23	756,49
Zinc metalloproteinase OS= <i>Bothrops insularis</i>	Q8QG89	11,51	IENDADSTASISACNGLK	3,32	2	1	1865,85
			DYSETHYSPDGR	3,28	2	2,2	1426,59
			LQGETYLIEPLK	3,09	2	2,53	1403,78
			KVTALPK	1,82	2	-0,23	756,49
Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	Q98UF9	10,64	IENDADSTASISACNGLK	3,32	2	1	1865,85

<i>OS=Bothrops jararaca</i>			DYSETHYSPDGR	3,28	2	2,2	1426,59
			YENVEKEDEVPK	2,22	3	-3,18	1478,69
			KVTALPK	1,82	2	-0,23	756,49
Metalloproteinase isoform 1	BOVXU4	7,19	DYSETHYSPDGR	3,28	2	2,2	1426,59
<i>OS=Sistrurus catenatus edwardsii</i>			YENIEKEDEAPK	2,09	3	0,18	1464,68
			KVTALPK	1,82	3	-0,23	756,49
Metalloproteinase	E9JG36	4,33	NPCCDAATCK	2,23	2	1,87	1196,45
<i>OS=Echis carinatus sochureki</i>			YENIEKEDEAPK	2,09	3	0,18	1464,68
<b>Banda 2: glândula coletada no dia 4 do ciclo de produção de veneno (~ 50 kDa)</b>							
Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98SP2	43,46	LRPGAQCAEGLCCDQCR	4,86	3	2,4	2050,87
			IENDADSTASISACNGLK	4,53	2	2,63	1865,85
			LSDSEAHAVFK	3,71	2	2,86	1203,6
			YEDAMQYELK	3,55	2	3,3	1305,57
			FENVEKEDEAPK	3,57	3	2,76	1434,67
			LQGETYLIEPLK	3,17	2	2,62	1403,78
			ASQSNLTPEHQR	2,99	3	1,34	1367,66
			YEDAMQYELK	2,65	2	1,38	1289,57
			RIHQMVNIMK	2,6	3	1,89	1301,68
			KVTALPK	2,23	2	-1,6	756,49
			TDLLNR	2,02	2	3,99	731,4
			ITTNPVEDHCYYHGR	2,01	4	2,22	1958,88
			DNPQCILNK	2,12	2	2,15	1101,53
			KTDLLNR	1,84	2	2,12	859,5
VTALPK	1,61	2	2,25	628,4			
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin	O93523	39,58	IENDADSTASISACNGLK	4,53	2	2,63	1865,89
<i>OS=Bothrops jararaca</i>			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,05	4	3,23	2953,15

			<b>YEDAMQYEFK</b>	3,05	2	-0,14	1339,55
			<b>LSNSEAHAVFK</b>	2,74	2	1,76	1202,61
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	-3,08	1450,66
			SGSQCGHGDCCCEQCK	2,34	3	1,18	1769,61
			KTDLLTR	2,26	2	2,45	846,5
			<b>KVTALPK</b>	2,23	2	-1,6	756,49
			DNSPGQNNPCK	2,28	2	1,15	1230,51
			VCSNGHCVDVATAY	1,96	2	3,04	1552,65
			IPCAPEDVK	1,93	2	2,55	1028,51
			KIPCAPEDVK	2,09	2	1,95	1156,6
			<b>MCGVTQNWK</b>	1,89	2	2,54	1139,5
			<b>ASQLVVTAEEQK</b>	3,75	2	1,48	1301,7
			<b>VTALPK</b>	1,61	2	2,25	628,4
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops insularis</i>	Q5XUW8	34,38	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	4,53	2	2,63	1865,85
			AQCAEGLCCDQCR	3,22	2	4,06	1627,61
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	3,17	2	2,62	1403,78
			<b>YEDAMQYEFK</b>	3,05	2	-0,14	1339,55
			<b>ASQSNLTPEQQK</b>	2,79	2	2,7	1330,66
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	-3,08	1450,66
			<b>KVTELPK</b>	1,98	2	1,45	814,5
			SCIMASTISK	1,98	2	-4,52	1113,52
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,88	3	2,66	1959,84
			<b>LQGETYLIEPLKLPDSEAHAVYK</b>	3,29	4	3,07	2614,38
			SVNVDASLANLEVWSK	2,94	2	2,69	1731,89
			YNSNLNTIR	1,67	2	1,86	1094,56
Metalloproteinase PMMP-2 <i>OS=Protobothrops mucrosquamatus</i>	E9NW27	22,67	<b>LRPGAQCAEGLCCDQCR</b>	4,86	3	2,4	2050,87
			<b>YENIEKEDEAPK</b>	3,6	3	2,93	1464,68
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	3,17	2	2,62	1403,78

			YEDAMQYEFK	3,05	2	-0,14	1339,55
			GLFSEDYSETHYSPDGR	2,88	3	2,66	1959,84
			LQGETYLIEPLKLPDSEAHAVYK	3,29	4	3,07	2614,38
			YENIEK	1,82	2	0,95	795,38
Metalloproteinase 3	F8S104	15,46	YEDAMQYEFK	3,05	2	-0,14	1339,55
OS= <i>Crotalus adamanteus</i>			YENVEKEDEAPK	2,88	3	-3,08	1450,66
			KVTALPK	2,23	2	-1,6	756,49
			GLFSEDYSETHYSPDGR	2,88	3	2,66	1959,84
			LTTGSQCAEGLCCDQCK	2,81	2	2,54	1987,8
			VTALPK	1,61	2	2,25	628,4
Zinc metalloproteinase/disintegrin ussurin	Q7SZD9	13,61	LRPGAQCAEGLCCEQCR	4,05	3	2,46	2064,88
OS= <i>Gloydus ussuriensis</i>			LSDSEAHAVFK	3,71	2	2,86	1203,6
			KVTALPK	2,23	2	-1,6	756,49
			ITTNPPVEDHCYYHGR	2,01	4	2,22	1958,88
			VTALPK	1,61	2	2,25	628,4
Disintegrin acostatin-alpha	Q805F7	5,91	KVTALPK	2,23	2	-1,6	756,49
OS= <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>			NPCCDAATCK	2,07	2	0,45	1196,44
			VTALPK	1,61	2	2,25	628,4
Antihemorrhagic factor BJ46a	Q9DGI0	4,95	SHASLEKPK	2,99	3	1,89	996,54
OS= <i>Bothrops jararaca</i>			EGHAHSHLIQQHVEK	1,96	4	1,65	1749,88

**Banda 3: glândula coletada no dia 4 do ciclo de produção de veneno (~ 30 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin	O93523	11,22	ASQLVVTAEQQK	3,19	2	-3,49	1301,7
OS= <i>Bothrops jararaca</i>			YEDAMQYEFK	3,02	2	1,32	1339,55
			YENVEKEDEAPK	2,96	3	2,03	1450,67
			KVTALPK	2,05	2	-0,07	756,49
Zinc metalloproteinase Bap1	P83512	7,76	YEDAMQYEFK	3,02	2	1,32	1339,55

OS=*Bothrops asper*

			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,96	3	2,03	1450,67
			<b>KVTELPK</b>	1,77	2	1,38	814,5
Zinc metalloproteinase/disintegrin	Q7SZE0	7,72	<b>YEDAMQYEFK</b>	3,02	2	1,32	1339,55
OS= <i>Gloydus saxatilis</i>			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,96	3	2,03	1450,67
			<b>YNSNLDTIR</b>	1,74	2	5,42	1095,54
Gamma-phospholipase A2 inhibitor	A8I4L6	7,64	<b>CIDIVGHR</b>	1,81	2	2,09	969,49
OS= <i>Bothrops jararaca</i>			<b>HEHFPGDIAYNLK</b>	2,95	3	2,11	1540,75
			<b>VFLEISSASLSVR</b>	2,87	2	1,36	1407,78
Zinc metalloproteinase/disintegrin	P18619	6,57	<b>YENIEKEDEAPK</b>	2,3	3	-2,82	1464,68
OS= <i>Protobothrops flavoviridis</i>			<b>YEDAMQYELK</b>	2,22	2	2,36	1305,56
			<b>KVTALPK</b>	2,05	2	-0,07	756,49
Zinc metalloproteinase	Q8QG89	6,25	<b>YEDAMQYELK</b>	2,22	2	2,36	1305,56
OS= <i>Bothrops insularis</i>			<b>KVTALPK</b>	2,05	2	-0,07	756,49
			<b>ASQSNLTPEHQR</b>	1,98	3	1,34	1367,66
Cysteine-rich secretory protein Da-CRPa	F2Q6G0	3,73	<b>SVDFDSESPR</b>	2,09	2	2,13	1138,5
OS= <i>Deinagkistrodon acutus</i>			<b>SVNPTASNMLK</b>	1,64	2	2,16	1177,59

**Banda 1: glândula coletada no dia 7 do ciclo de produção de veneno (~ 50 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase/disintegrin	Q072L5	12,81	<b>LRPGAQCAEGLCCDQCR</b>	4,91	3	1,59	2050,87
OS= <i>Bothrops asper</i>			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,99	2	2,16	1358,66
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,87	3	3,17	1450,67
			<b>IQGETYLIEPLK</b>	2,04	2	3,14	1403,78
Atrolysin e	Q92119	9,66	<b>LRPGAQCAEGLCCDQCR</b>	4,91	3	1,59	2050,87
OS= <i>Protobothrops mucrosquamatus</i>			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,87	3	3,17	1450,67

			KVTALPK	1,88	2	1,3	756,49
Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Gloydus brevicaudus</i>	Q9PVK9	9,62	LRPGAQCAEGLCCDQCR	4,91	3	1,59	2050,87
			YENVEKEDEAPK	2,87	3	3,17	1450,67
			DYSETHYSPDGR	1,84	3	1,64	1426,58
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	O93523	9,49	ASQLVVTAEEQQK	2,9	2	2,41	1301,7
			YENVEKEDEAPK	2,87	3	3,17	1450,67
			DYSETHYSPDGR	1,84	3	1,64	1426,58
			KVTALPK	1,88	2	1,3	756,49
Metalloproteinase 4 OS= <i>Crotalus adamanteus</i>	F8S105	6,79	YENVEKEDEAPK	2,87	3	3,17	1450,67
			LQGETYLIEPLK	2,04	2	3,14	1403,78
			KVTALPK	1,88	2	1,3	756,49
Phospholipase A2 BnSP-7 OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>	Q9IAT9	6,74	TIVCGENNPCLK	3,6	2	2,43	1404,66
			SYGAYGCNCGVLGR	3,14	2	1,85	1533,66
Disintegrin acostatin-alpha OS= <i>Agkistrodon contortrix</i>	Q805F7	3,89	NPCCDAATCK	2,01	2	1,57	1196,45
			KVTALPK	1,88	2	1,3	756,49

**Banda 2: glândula coletada no dia 7 do ciclo de produção de veneno (~ 30 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase OS= <i>Bothrops insularis</i>	Q8QG89	10,37	YEDAMQYELK	3,1	2	2,74	1305,57
			LQGETYLIEPLK	2,54	2	3,14	1403,78
			FENVEKEDEAPK	2,42	3	1,67	1434,67
			DYSETHYSPDGR	2,31	2	2,55	1426,59
Zinc metalloproteinase ACLH OS= <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	Q92032	8,43	YEDAMQYELK	3,1	2	2,74	1305,57
			YENVEKEDEAPK	3,02	3	1,72	1450,67
			DYSETHYSPDGR	2,31	2	2,55	1426,59

**Banda 1: glândula coletada no dia 10 do ciclo de produção de veneno (~ 70 kDa)**

Proteína*	Número de acceso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	O93523	67,8	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	4,76	2	3,15	1865,86
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,73	4	2,57	2953,15
			<b>ASQLVVTAEEQQK</b>	3,64	2	2,41	1301,7
			<b>YEDAMQYEFK</b>	3,53	2	0,59	1339,55
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	3,46	4	2,85	2937,16
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	3,37	2	2,01	1333,75
			<b>LSNSEAHAVFK</b>	3,24	2	1,25	1202,61
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,63	2	1,78	1426,58
			MFYSNDDEHK	2,91	3	2,37	1285,51
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,31	2	3,64	1450,67
			DNSPGQNNPCK	2,65	2	1,74	1230,51
			MFYSNDDEHK	2,64	3	2,89	1301,51
			SGSQCGHGDCEQCK	3,45	3	3,25	1769,61
			KIPCAPEDVK	2,56	2	2,27	1156,6
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	2,55	3	1,87	2084,94
			KDLLTR	2,51	2	2,16	846,5
			IPCAPEDVK	2,47	2	3,74	1028,51
			<b>MCGVTQNWK</b>	2,46	2	2,96	1139,5
			VCSNGHCVDVATAY	2,44	2	3,12	1552,65
			<b>SYEPIKK</b>	1,87	2	1,44	864,48
TDLLTR	1,74	2	2,29	718,41			
ITVKPDVDYTLNSFAEWR	3,9	3	3,61	2154,09			
Zinc metalloproteinase-disintegrin ACLD OS= <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	O42138	23,88	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	4,76	2	3,15	1865,86
			<b>YEDAMQYEFK</b>	3,53	2	0,59	1339,55
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	3,37	2	2,01	1333,75
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,63	2	1,78	1426,58

			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,31	2	3,64	1450,67
			<b>LPDSEAHAVFK</b>	2,75	2	3,25	1213,62
			LTPGSQCADGVCCDQCR	2,53	2	3,74	1983,78
Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3 <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98UF9	22,99	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	4,76	2	3,15	1865,86
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	3,37	2	2,01	1333,75
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,63	2	1,78	1426,58
			<b>ASQLVVTAEQQR</b>	3,26	2	2,97	1329,71
			<b>LPNSEAHAVFK</b>	2,67	2	2,56	1212,64
			VCSNGHCVDVATAY	2,44	2	3,12	1552,65
			<b>YENVEKEDEVPK</b>	2,86	3	0,17	1478,7
Metalloproteinase 4 <i>OS=Crotalus adamanteus</i>	F8S105	21,45	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	4,76	2	3,15	1865,86
			<b>YEDAMQYEFK</b>	3,53	2	0,59	1339,55
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	3,37	2	2,01	1333,75
			<b>LSNSEAHAVFK</b>	3,3	2	2,86	1203,6
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	3,18	2	-5,03	1403,77
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,31	2	3,64	1450,67
Zinc metalloproteinase-disintegrin BjussuMP-1 <i>OS=Bothrops jararacussu</i>	Q1PHZ4	20,15	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	4,76	2	3,15	1865,86
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	3,67	2	3,57	1959,84
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	3,37	2	2,01	1333,75
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	3,18	2	-5,03	1403,77
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,31	2	3,64	1450,67
			<b>LVVTAEQK</b>	1,86	2	1,58	1015,57
Zinc metalloproteinase-disintegrin catroriarin <i>OS=Crotalus atrox</i>	A2CJE4	19,63	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,73	4	2,57	2953,15
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	3,46	4	2,85	2937,16
			NPCCDAATCK	2,87	2	1,67	1196,45
			DNSPGQNNPCK	2,65	2	1,74	1230,51
			SGSQCGHGDCCCEQCK	3,45	3	3,25	1769,61
			IPCAPEDVK	2,47	2	3,74	1028,51

Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin OS= <i>Protobothrops jerdonii</i>	P83912	17,5	DYSETHYSPDGR	3,63	2	1,78	1426,58
			YENVEKEDEAPK	3,31	2	3,64	1450,67
			LPDSEAHAVFK	2,75	2	3,25	1213,62
			YEDTMQYEFK	2,65	2	3,01	1353,56
			YEDTMQYEFK	2,63	2	1,25	1369,56
			LTPGSQCADGLCCDQCR	2,54	2	0,09	1997,79
Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Protobothrops flavoviridis</i>	P20164	14,53	GLFSEDYSETHYSPDGR	3,67	2	3,57	1959,84
			VNGEPVVLHLEK	3,37	2	2,01	1333,75
			YEDTMQYEFK	2,65	2	2,19	1353,56
			YEDTMQYEFK	2,63	2	1,25	1369,56
			YENVEKEEEAPK	2,22	3	1,31	1464,68
Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Trimeresurus gramineus</i>	P15503	12,01	IENDADSTASISACDGLK	5,11	2	-0,25	1866,83
			YEDAMQYEFK	3,53	2	0,59	1339,55
			VNGEPVVLHLEK	3,37	2	2,01	1333,75
Metalloproteinase isoform 3 OS= <i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	BOVXU6	10,85	IENDADSTASISACNGLK	4,76	2	3,15	1865,86
			YENVEKEDEAPK	3,31	2	3,64	1450,67
			MCGVTQTNWK	2,78	2	2,76	1240,54
Metalloproteinase OS= <i>Echis pyramidum leakeyi</i>	E9JGB6	5,28	YENVEKEDEAPK	3,31	2	3,64	1450,67
			CYYHGR	1,97	2	1,55	855,35
Phospholipase A2 BnSP-7 OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>	Q9IAT9	5,18	SYGAYGCNCGVLGR	2,85	2	1,85	1533,66
			TIVCGENNPCLK	2,33	2	2,09	1404,66

**Banda 2: glândula coletada no dia 10 do ciclo de produção de veneno (~ 60 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	O93523	43,3	IENDADSTASISACNGLK	3,95	2	4014	1865,86
			YENVEKEDEAPK	3,87	2	2,8	1450,67
			ASQLVVTAEEQK	3,58	2	3,16	1301,71
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	3,5	4	3,15	2953,75

			SGSQCGHGDCCCEQCK	3,39	3	2,22	1769,61
			<b>YEDAMQYEFK</b>	3,22	2	1,23	1339,55
			<b>LSNSEAHAVFK</b>	3,07	2	-0,57	1202,61
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	2,82	2	1,86	1426,58
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,74	2	1,83	1333,74
			DNSPGQNNPCK	2,4	2	2,63	1230,52
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	2,37	3	2,07	2100,94
			<b>MCGVTQNWK</b>	2,17	2	2,43	1139,5
			KTDLLTR	2,07	2	3,1	846,5
			KIPCAPEDVK	2,02	2	2,38	1156,6
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops asper</i>	Q072L5	25,49	LRPGAQCAEGLCCDQCR	4,82	3	2,4	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	4,14	1865,86
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,87	2	2,8	1450,67
			<b>YEDAMQYEFK</b>	3,22	2	1,23	1339,55
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,75	2	-2,42	1358,66
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,74	2	1,83	1333,74
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,17	3	1,26	1959,83
			<b>KVTELPK</b>	1,98	2	1,08	814,5
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops insularis</i>	Q5XUW8	20,44	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	4,14	1865,86
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,87	2	2,8	1450,67
			<b>YEDAMQYEFK</b>	3,22	2	1,23	1339,55
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,74	2	1,83	1333,74
			<b>ASQSNLTPEQQK</b>	2,52	2	2,24	1330,66
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,17	3	1,26	1959,83
			<b>KVTELPK</b>	1,98	2	1,08	814,5
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98SP2	16,48	LRPGAQCAEGLCCDQCR	4,82	3	2,4	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	4,14	1865,86
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	2,82	2	1,86	1426,58

			VNGEPVVLHLEK	2,74	2	1,83	1333,74
			FENVEKEDEAPK	2,16	3	1,93	1434,67
Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3 <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98UF9	15,22	IENDADSTASISACNGLK	3,95	2	4,14	1865,86
			ASQLVVTAEQQR	3,02	2	2,42	1329,71
			DYSETHYSPDGR	2,82	2	1,86	1426,58
			VNGEPVVLHLEK	2,74	2	1,83	1333,74
			YENVEKEDEVPK	2,69	3	1,96	1478,7
Metalloproteinase PMMP-2 <i>OS=Protobothrops mucrosquamatus</i>	E9NW27	12,76	LRPGAQCAEGLCCDQCR	4,82	3	2,4	2050,87
			YEDAMQYEFK	3,22	2	1,23	1339,55
			YENIEKEDEAPK	2,55	3	-2,75	1464,68
			GLFSEDYSETHYSPDGR	2,17	3	1,26	1959,83
Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin <i>OS=Protobothrops jerdonii</i>	P83912	9,36	YENVEKEDEAPK	3,87	2	2,8	1450,67
			DYSETHYSPDGR	2,82	2	1,86	1426,58
			LTPGSQCADGLCCDQCR	2,68	2	4,07	1997,8

**Banda 3: glândula coletada no dia 10 do ciclo de produção de veneno (~ 50 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	O93523	55,18	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	5,12	4	2,57	2953,15
			IENDADSTASISACNGLK	3,86	2	3,68	1865,86
			SGSQCGHGDCCCEQCK	3,58	3	2,01	1769,61
			YENVEKEDEAPK	3,05	2	2,63	1450,67
			ASQLVVTAEQQK	3,05	2	1,01	1301,7
			MFYSNDDEHK	2,98	3	3,03	1301,51
			YEDAMQYEFK	2,85	2	0,68	1339,55
			VCSNGHCVDVATAY	2,82	2	2,65	1552,65
			LSNSEAHAVFK	2,72	2	1,66	1202,61
			KTDLLTR	2,63	2	2,38	846,5
			DNSPGQNNPCK	2,58	2	-2,33	1230,51

			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,49	2	2,65	1333,75
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,33	2	1,55	1323,55
			<b>MCGVTQNWK</b>	2,15	2	1,46	1139,49
			KIPCAPEDVK	2,11	3	2,15	1156,6
			IPCAPEDVK	2,06	2	3,26	1028,51
			<b>ETYFIEPLK</b>	1,83	2	2,55	1139,6
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops asper</i>	Q072L5	35	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,06	3	2,13	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,86	2	3,68	1865,86
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	3,59	2	3,88	1959,84
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,05	2	2,63	1450,67
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,85	2	0,68	1339,55
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,49	2	2,65	1333,75
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,46	2	2,7	1358,66
			<b>IQGETYLIEPLK</b>	2,37	2	2,97	1403,78
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,33	2	1,55	1323,55
			<b>KVTELPK</b>	1,99	2	-0,42	814,5
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops insularis</i>	Q5XUW8	30,46	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,86	2	3,68	1865,86
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	3,59	2	3,88	1959,84
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,05	2	2,63	1450,67
			<b>ASQSNLTPEQQK</b>	2,98	2	2,52	1330,66
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,85	2	0,68	1339,55
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,49	2	2,65	1333,75
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,37	2	2,97	1403,78
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,33	2	1,55	1323,55
			<b>KVTELPK</b>	1,99	2	-0,42	814,5
Zinc metalloprotease-disintegrin agkihagin <i>OS=Deinagkistrodon acutus</i>	Q1PS45	29,1	<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	3,59	2	3,88	1959,84
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	3,05	2	2,63	1450,67
			<b>LSDSEAHAVFK</b>	2,94	2	2,56	1203,6

			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,85	2	0,68	1339,55
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,49	2	2,65	1333,75
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,46	2	2,7	1358,66
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,33	2	1,55	1323,55
			<b>MCGVTQNWK</b>	2,15	2	1,46	1139,49
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98SP2	28,94	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,06	3	2,13	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,86	2	3,68	1865,86
			<b>FENVEKEDEAPK</b>	3,28	2	2,77	1434,67
			<b>LSDSEAHAVFK</b>	2,94	2	2,56	1203,6
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,49	2	2,65	1333,75
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,37	2	2,97	1403,78
			<b>ASQSNLTPEHQR</b>	2,18	2	2,35	1367,66
			IHQMVNIMK	1,91	2	1,81	1145,58
Zinc metalloproteinase <i>OS=Bothrops insularis</i>	Q8QG89	26,54	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,86	2	3,68	1865,86
			<b>FENVEKEDEAPK</b>	3,28	2	2,77	1434,67
			<b>LSDSEAHAVFK</b>	2,94	2	2,56	1203,6
			TDTVSTPVSGNELLEAGE	2,66	2	4,01	1818,86
			<b>VNGEPVVLHLEK</b>	2,49	2	2,65	1333,75
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,37	2	2,97	1403,78
			<b>ASQSNLTPEHQR</b>	2,18	2	2,35	1367,66
			IHQMVNIMK	1,91	2	1,81	1145,58
Metalloproteinase PMMP-2 <i>OS=Protobothrops mucrosquamatus</i>	E9NW27	25,18	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,06	3	2,13	2050,87
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	3,59	2	3,88	1959,84
			<b>YENIEKEDEAPK</b>	2,89	3	2,43	1464,68
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,85	2	0,68	1339,55
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,37	2	2,97	1403,78
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,33	2	1,55	1323,55
Zinc metalloproteinase/disintegrin VMP-II	C9E1R9	24,56	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,06	3	2,13	2050,87

OS=*Crotalus viridis viridis*

IENDADSTASISACNGLK	3,86	2	3,68	1865,86
GLFSEDYSETHYSPDGR	3,59	2	3,88	1959,84
YEDAMQYEFK	2,85	2	0,68	1339,55
VNGEPVVLHLEK	2,49	2	2,65	1333,75
YEDAMQYEFK	2,33	2	1,55	1323,55
MCGVTQNWK	2,15	2	1,46	1139,49

Zinc metalloproteinase/disintegrin

POC6E4

22,6

OS=*Protobothrops jerdonii*

GLFSEDYSETHYSPDGR	3,59	2	3,88	1959,84
YENIEKEDEAPK	2,89	3	2,43	1464,68
YEDAMQYEFK	2,85	2	0,68	1339,55
VNGEPVVLHLEK	2,49	2	2,65	1333,75
LQGETYLIEPLK	2,37	2	2,97	1403,78
YEDAMQYEFK	2,33	2	1,55	1323,55

Metalloproteinase

E9JG57

17,26

OS=*Echis coloratus*

GLFSEDYSETHYSPDGR	3,59	2	3,88	1959,84
YENIEKEDEAPK	2,89	3	2,43	1464,68
VNGEPVVLHLEK	2,49	2	2,65	1333,75
NPCCDAATCK	2,22	2	1,87	1196,45

Zinc metalloproteinase/disintegrin

P15503

12,73

OS=*Trimeresurus gramineus*

IENDADSTASISACDGLK	5,06	2	1,05	1866,84
YEDAMQYEFK	2,85	2	0,68	1339,55
VNGEPVVLHLEK	2,49	2	2,65	1333,75
YEDAMQYEFK	2,33	2	1,55	1323,55

Antihemorrhagic factor BJ46a

Q9DGI0

5,89

OS=*Bothrops jararaca*

SHASLEKPK	3,29	3	1,71	996,54
EGHAHSHLIQQHVEK	2,6	3	2,7	1749,88

**Banda 1: glândula coletada no dia 21 do ciclo de produção de veneno (~ 60 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase/disintegrin	Q072L5	16	LRPGAQCAEGLCCDQCR	4,65	3	-1,89	2050,86
OS= <i>Bothrops asper</i>			ASQSNLTPEQQR	3,15	2	3,06	1358,67

			YENVEKEDEAPK	2,97	3	1,47	1450,67
			YEDAMQYEFK	2,36	2	1,23	1339,55
Zinc metaloproteinase-disintegrin bothropasin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	O93523	15,8	ASQLVVTAEQQK	3,25	2	2,13	1301,7
			YENVEKEDEAPK	2,97	3	1,47	1450,67
			YEDAMQYEFK	2,36	2	1,23	1339,55
			LSNSEAHAVFK	2,19	2	1,56	1202,61
			SGSQCGHGDCEQCK	2,16	3	1,18	1769,61
Zinc metaloproteinase-disintegrin HF3 <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98UF9	5,98	NCRDPCCDAATCK	3,47	3	0,86	1627,6
			YENVEKEDEVPK	2,51	3	2,58	1478,7
<b>Banda 2: glândula coletada no dia 21 do ciclo de produção de veneno (~ 50 kDa)</b>							
Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metaloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98SP2	31,64	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,22	3	1,95	2050,87
			IENDADSTASISACNGLK	4,58	2	2,17	1865,85
			FENVEKEDEAPK	3,77	3	1,8	1434,67
			YEDAMQYELK	3,31	2	2,18	1305,56
			LSDSEAHAVFK	2,84	2	2,05	1203,6
			ASQSNLTPEHQR	2,28	3	2,21	1367,66
			LQGETYLIEPLK	3,26	2	1,92	1403,78
			RIHQMVNIMK	2,39	3	1,47	1301,68
			DNPQCILNK	2,1	2	0,82	1101,53
			KTDLLNR	1,9	2	2,12	859,5
Zinc metaloproteinase-disintegrin bothropasin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	O93523	23,68	IENDADSTASISACNGLK	4,58	2	2,17	1865,85
			YENVEKEDEAPK	2,85	3	1,59	1450,67
			SGSQCGHGDCEQCK	2,72	3	1,59	1769,61
			DNSPGQNNPCK	2,4	2	1,64	1230,51

			KTDLLTR	1,98	2	2,81	846,5
			KIPCAPEDVK	2,24	2	2,48	1156,6
			<b>ASQLVVTAEEQK</b>	2,92	2	0,82	1301,7
			IPCAPEDVK	2,13	2	2,91	1028,51
			VCSNGHCVDVATAY	1,86	2	2,26	1552,65
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops asper</i>	Q072L5	20,71	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,22	3	1,95	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	4,58	2	2,17	1865,85
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,85	3	1,59	1450,67
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,6	3	3,59	1959,84
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,21	2	2,16	1358,66
			<b>IQGETYLIEPLK</b>	3,26	2	1,92	1403,78
Zinc metalloproteinase atrolisin-D <i>OS=Crotalus atrox</i>	P15167	9,9	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	4,58	2	2,17	1865,85
			<b>YEDAMQYELK</b>	3,31	2	2,18	1305,56
			YNSDLNTIR	2,02	2	5,86	1095,54
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Protobothrops flavoviridis</i>	P18619	9,16	<b>YEDAMQYELK</b>	3,31	2	2,18	1305,56
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,6	3	3,59	1959,84
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	3,26	2	1,92	1403,78
Zinc metalloprotease VMP1 <i>OS=Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>	B7U492	8,76	<b>YEDAMQYELK</b>	3,31	2	2,18	1305,56
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,85	3	1,59	1450,67
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,6	3	3,59	1959,84
Group III snake venom metalloproteinase <i>OS=Echis ocellatus</i>	E9KJX7	6,97	<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,6	3	3,59	1959,84
			KIPCAPEDVK	2,24	2	2,48	1156,6
			IPCAPEDVK	2,13	2	2,91	1028,51

\*Conforme o banco de dados SwissProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))

\*\* Conforme o algoritmo SEQUEST®, utilizado na plataforma *Proteome Discoverer*<sup>™</sup> 1.3.0.339 (Thermo Scientific)

†Peptídeos em negrito são correspondentes ao pró-domínio

‡Conforme o algoritmo SEQUEST®

Tabela A2: Peptídeos identificados a partir de bandas de SDS-PAGE referentes aos antígenos isolados por imunoprecipitação de amostras de veneno

**Banda 1: amostra de veneno coletada no dia 7 do ciclo de produção de veneno (~50 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	P30431	25,3	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHK	4,85	4	3,15	2953,15
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	1,91	1450,67
			SGSQCGHGDCCCEQCK	2,48	3	1,9	1769,61
			DNSPGQNNPCK	2,83	2	2,24	1230,51
			VCSNGHCVDVATAY	2,44	2	3,2	1552,65
			KIPCAPEDVK	2,02	3	2,71	1156,6
			MFYSNDDEHK	2,36	3	1,63	1301,51
			IPCAPEDVK	1,83	2	2,43	1028,51
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	1,93	3	1,55	2100,93
			GMVLPGTK	1,68	2	2,35	818,44
Phospholipase A2 BnSP-7 OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>	Q9IAT9	21,93	SYGAYGCNCGVLGR	4,1	2	1,78	1533,66
			DKTIVCGENNPCLK	3,21	3	1,64	1647,78
			MILQETGKNPAK	3,1	2	3,11	1345,71
			TIVCGENNPCLK	2,95	2	2,26	1404,66
			YHLKPFCK	2,1	3	3,8	1092,57
			AVAICLR	1,66	2	1,77	802,46
			YSYSWK	1,6	2	2,09	833,38
			LTGCDPK	1,61	2	0,75	790,37
			ENLGTYNK	1,59	2	1,56	938,45
MP_III2 SVMP OS= <i>Bothrops neuwiedi</i>	E3UJL1	21,75	LHPWVECESGECCGQCR	6,11	3	2,73	2163,85
			SEC DIAESCTGQSAQCPTDD FHK	4,75	3	3,27	2643,05
			QKPQCILNEPLR	2,8	3	3,93	1495,8

			NPCCDATTCK	2,61	2	2,57	1226,46
			AGNVCRPQR	1,78	3	2,5	1057,53
			TDIVSPPVCGNELLEMGEEDCGSPR	3,7	3	0,25	2937,24
Batroxstatin-2	C5H5D3	19,48	DECDMADLCTGR	3,79	2	-5,03	1458,52
OS= <i>Bothrops atrox</i>			AAKDECDMADLCTGR	3,49	3	2,87	1728,7
			AAKDECDMADLCTGR	3,25	3	2,85	1712,7
			FKGAGTECR	2,22	2	2,36	1025,48
			GMVLPGTK	1,68	2	2,35	818,44
			GAGTECRAAKDECDMADLCTGR	2,76	3	-2,57	2459,99
			LVLVADYIMYLK	2,3	2	2,85	1456,81
Zinc metalloproteinase-disintegrin scutiarin	A2CJE2	16,44	ASMSECDPAEHCTQSSECPADV FHK	4,85	4	3,15	2953,15
OS= <i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>			NPCCDAATCK	2,76	2	2,08	1196,45
			SGSQCGHGDCCCEQCK	2,48	3	1,9	1769,61
			DNSPGQNNPCK	2,83	2	2,24	1230,51
			IPCAPEDVK	1,83	2	2,43	1028,51
			GMVLPGTK	1,68	2	2,35	818,44
Zinc metalloprotease-disintegrin halysase	Q8AWI5	12,37	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	1,91	1450,67
OS= <i>Gloydius halys</i>			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	3,04	2	2,25	1358,66
			FKGAGTECR	2,22	2	2,36	1025,48
			LYCIDSSPANK	2,56	2	1,77	1267,6
			GMVLPGTK	1,68	2	2,35	818,44
Zinc metalloproteinase Bap1	P83512	7,85	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	1,91	1450,67
OS= <i>Bothrops asper</i>			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	3,04	2	2,25	1358,66
			YNSNLNTIR	1,93	2	1,86	1094,56
Metalloproteinase 11	F8S112	6,87	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	1,91	1450,67
OS= <i>Crotalus adamanteus</i>			IPCAPEDVK	1,83	2	2,43	1028,51
			CILNEPLR	2,16	2	3,15	1014,54
Metalloproteinase isoform 1	B0VXU4	6,83	FKGAGTECR	2,22	2	2,36	1025,48

OS= <i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>			VCSNGHCVDVATAY	2,44	2	3,2	1552,65
			GLCCDQCR	2,18	2	2,09	1068,4
L-amino-acid oxidase	Q6TGQ8	6,03	SAGQLYEESLQK	3,2	2	0,6	1352,67
OS= <i>Bothrops moojeni</i>			HDDIFAYEK	2,83	2	1,3	1137,52
Zinc metalloproteinase atroxlysin-1	P85420	5,3	KTDLLNRK	2,08	3	1,4	987,59
OS= <i>Bothrops atrox</i>			TDLLNRK	1,73	2	2,4	859,5
			TDLLNR	1,49	2	1,82	731,4
Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin	P83912	5,29	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	1,91	1450,67
OS= <i>Protobothrops jerdonii</i>			LTPGSQCADGLCCDQCR	2,4	2	2,48	1997,79
Metalloprotease	Q9YI19	4,79	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	1,91	1450,67
OS= <i>Gloydius halys</i>			NPQCILNEPLR	1,91	2	2,69	1353,69
Metalloproteinase 10	F8S111	4,53	DEDIGMVLPGTK	2,31	2	0,86	1290,62
OS= <i>Crotalus adamanteus</i>			FKGAGTECR	2,22	2	2,36	1025,48
C-type lectin BiL	Q6QX33	4,45	EFCVELVSDTGYR	2,9	2	2,81	1574,72
OS= <i>Bothrops insularis</i>			DFSWEWTDR	1,55	2	3,76	1241,52
Zinc metalloproteinase-disintegrin BjussuMP-1	Q1PHZ4	4,4	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,88	3	1,91	1450,67
OS= <i>Bothrops jararacussu</i>			GDKYFYCR	1,51	2	1,89	1108,49
Metalloproteinase	E9JG27	3,6	IPCAPEDVK	1,83	2	2,43	1028,51
OS= <i>Echis carinatus sochureki</i>			MPQCILK	1,77	2	1,94	905,46

**Banda 2: amostra de veneno coletada no dia 7 do ciclo de produção de veneno (~45 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin	P30431	36,06	SGSQCGHGDCEQCK	3,49	3	2,73	1769,61
OS= <i>Bothrops jararaca</i>			IPCAPEDVK	2,56	2	3,03	1028,51
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,5	3	1,53	1450,67
			MFYSNDDEHK	2,82	2	2,13	1301,51
			MFYSNDDEHKGMLVPGTK	2,85	3	2,16	2100,94

			MFYSNDDEHK	1,96	2	2,66	1285,51
			KIPCAPEDVK	1,98	2	0,48	1156,6
			KTDLLTR	1,78	2	3,89	846,5
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	6,19	3	2,41	2937,16
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,92	3	4,29	2953,16
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	2,8	3	3,01	2084,94
			VCSNGHCVDVATAY	2,23	2	1,23	1552,65
Glutaminyl-peptide cyclotransferase OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q9YIB5	26,95	MASTPHPPGAR	2,32	2	3,35	1137,55
			NLNDLGLLNNYSSER	3,47	2	4,13	1721,85
			LIFFDGEEAFVR	3,34	2	3,28	1442,73
			HPVEDDHIPFLR	3,2	3	2,78	1474,74
			VWHTMEDNEENLDKPTIDNLSK	2,53	4	1,1	2644,22
			YPGSPGSYAVR	2,37	2	1,56	1153,56
			WSPSDSLYGSR	2,05	2	1,86	1254,57
			HLVIACHYDSK	2,01	3	2,72	1342,66
			LEAIER	1,98	2	2,74	730,41
			MWQNDLHPILIER	1,89	3	2,06	1680,85
			RHPVEDDHIPFLR	1,79	4	1,39	1630,84
Zinc metalloproteinase-disintegrin VAP2A OS= <i>Crotalus atrox</i>	A4PBQ9	25,61	SGSQCGHGDCCEQCK	3,49	3	2,73	1769,61
			IPCAPEDVK	2,56	2	3,03	1028,51
			<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,5	3	1,53	1450,67
			MFYSNEDEHK	1,94	2	2,46	1315,52
			KTDLLTR	1,78	2	3,89	846,5
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	6,19	3	2,41	2937,16
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,92	3	4,29	2953,16
			VCSNGHCVDVATAY	2,23	2	1,23	1552,65
Zinc metalloproteinase-disintegrin scutiarin OS= <i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	A2CJE2	21,94	SGSQCGHGDCCEQCK	3,49	3	2,73	1769,61
			NPCCDAATCK	2,84	2	2,08	1196,45

			IPCAPEDVK	2,56	2	3,03	1028,51
			MFYSNEDEHK	1,94	2	2,46	1315,52
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	6,19	3	2,41	2937,16
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,92	3	4,29	2953,16
Acutolysin e2	C7E3Q3	19,67	MFYSNDDEHK	2,82	2	2,13	1301,51
OS= <i>Deinagkistrodon acutus</i>			MFYSNDDEHK	1,96	2	2,66	1285,51
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	6,19	3	2,41	2937,16
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,92	3	4,29	2953,16
			DDSPGQNNPCK	1,98	2	2,43	1231,5
			MFYSNDDEHKG	1,8	2	1,51	1358,53
MP_III1 SVMP	E3UJL0	15,26	NPCCDAATCK	2,84	2	2,08	1196,45
OS= <i>Bothrops neuwiedi</i>			LHPWVECESGECCGQCR	5,41	3	1,46	2163,84
			SECDAESCTGQSAQCPTDDFK	4,72	3	2,64	2643,04
			QKPQCILNEPLR	2,29	3	-1,22	1495,8
MP_III2 SVMP	E3UJL1	14,18	LHPWVECESGECCGQCR	5,41	3	1,46	2163,84
OS= <i>Bothrops neuwiedi</i>			SECDAESCTGQSAQCPTDDFK	4,72	3	2,64	2643,04
			QKPQCILNEPLR	2,29	3	-1,22	1495,8
			AGNVCRPQR	1,76	2	1,62	1057,53
Phospholipase A2 BnSP-7	Q9IAT9	11,88	DKTIVCGENNPCLK	3,28	3	1,97	1647,78
OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>			TIVCGENNPCLK	3,07	2	2,52	1404,66
			MILQETGKNPAK	2,06	3	0,68	1345,71
			YHLKPFCK	1,82	3	3,04	1092,56
			ENLGTYNK	1,65	2	2,08	938,45
Acocostatin	F8RTZ7	9,24	AAKDECDMADLCTGR	4	3	2,45	1728,7
OS= <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>			DECDMADLCTGR	3,44	2	1,25	1458,53
			AAKDECDMADLCTGR	1,8	3	1,46	1712,7
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-2	Q0NZX9	8,33	NCRDPCCDAATCK	1,85	3	0,97	1627,6
OS= <i>Bothrops jararaca</i>			SECDAESCTGQSAQCPTDDFK	4,72	3	2,64	2643,04

			AGNVCRPQR	1,76	2	1,62	1057,53
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ OS= <i>Bothrops jararaca</i>	P81824	6,39	LGVHSIK	1,77	2	0,64	753,46
			DDVLDKDIMLIR	2,38	3	3,28	1461,76
			INILDHAVCR	2,23	2	1,31	1210,63
Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin OS= <i>Protobothrops jerdonii</i>	P83912	6,04	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,5	3	1,53	1450,67
			LTPGSQCADGLCCDQCR	3,55	2	3,03	1997,79
L-amino-acid oxidase OS= <i>Bothrops moojeni</i>	Q6TGQ8	5,26	HDDIFAYEK	2,75	2	0,12	1137,52
			SAGQLYEESLQK	2,51	2	-0,66	1352,66
Metalloprotease OS= <i>Gloydius halys</i>	Q9YI19	4,92	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,5	3	1,53	1450,67
			NPQCILNEPLR	2,42	2	2,78	1353,69
Metalloproteinase 10 OS= <i>Crotalus adamanteus</i>	F8S111	4,67	IPCAPQDVK	2,39	2	1,26	1027,52
			DEDIGMVLPGTK	2,28	2	1,42	1290,62
Zinc metalloprotease-disintegrin halysase OS= <i>Gloydius halys</i>	Q8AWI5	4,56	<b>YENVEKEDEAPK</b>	2,5	3	1,53	1450,67
			LYCIDSSPANK	2,06	2	1,58	1267,6
Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3 OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q98UF9	4,09	NCRDPCCDAATCK	1,85	3	0,97	1627,6
			VCSNGHCVDVATAY	2,23	2	1,23	1552,63
Platelet aggregating serine peptidase OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q6URK9	3,31	LGVHSIK	1,77	2	0,64	753,46
			FICPNK	1,54	2	2,34	778,39

**Banda 3: amostra de veneno coletada no dia 7 do ciclo de produção de veneno (~37 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ OS= <i>Bothrops jararaca</i>	P81824	26,7	KDDVLDKDIMLIR	4,32	3	3,9	1589,86
			KDDVLDKDIMLIR	3,86	3	2,02	1573,86
			DDVLDKDIMLIR	3,76	3	2,05	1445,76
			DDVLDKDIMLIR	3,21	3	2,02	1461,76
			LGVHSIK	2,61	2	1,37	753,46
			KPALYTK	2,02	2	1,84	820,49

			INILDHAVCR	2,54	3	3,59	1210,64
			KKDDVLDK	2,54	3	1,16	960,53
			DIMLIR	1,83	2	2,49	776,43
Platelet aggregating serine peptidase <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q6URK9	24,68	KNDVLDKDIMLIR	4,87	3	2,26	1572,88
			NDVLDKDIMLIR	3,59	3	2,13	1444,78
			INILNHAVCR	2,67	2	2,53	1209,65
			KNDVLDKDIMLIR	2,54	2	3,64	1588,87
			LGVHSIK	2,61	2	1,37	753,46
			KNDVLDK	2,45	2	1,73	831,45
			NDVLDKDIMLIR	2,45	2	3,46	1460,78
			DIMLIR	1,83	2	2,49	776,43
			KKNDVLDK	1,66	2	1,44	959,55
Snake venom serine protease <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q5W959	15,26	NDDALDKDLMLVR	2,83	3	2,58	1533,76
			IMGWGSITPIQK	2,73	2	-2,06	1346,71
			KTLNQDEQTR	2,59	3	1,9	1232,62
			TLNQDEQTR	2,43	2	1,63	1104,52
			TNPDVPHCANINLLDDAVCR	3,05	3	2,59	2294,07
			AAYPELPAEYR	1,63	2	3,33	1279,63
Phospholipase A2 BnSP-7 <i>OS=Bothropoides pauloensis</i>	Q9IAT9	15,26	SYGAYGCNCGVLGR	3,88	2	0,82	1533,65
			TIVCGENNPCLK	3,06	2	1,13	1404,66
			MILQETGK	2,03	2	1,48	935,48
			AVAICLR	2,01	2	1,85	802,46
			DKTIVCGENNPCLK	2,56	3	0,86	1647,78
			ENLGTYNK	1,72	2	1,37	938,45
Snake venom serine protease 3 <i>OS=Protobothrops jerdonii</i>	Q9DF66	10,53	VLNEDEQTRDPK	3,27	3	2,86	1443,71
			TLCAGILQGGK	1,86	2	3,26	1117,6
			DKDIMLIR	2,01	2	1,63	1019,5
			DIMLIR	1,83	2	2,49	776,43

			VMGWGK	1,55	2	-0,78	693,33
Zinc metalloproteinase-disintegrin catroriarin <i>OS=Crotalus atrox</i>	A2CJE4	10,15	NPCCDAATCK	2,58	2	1,16	1196,45
			DNSPGQNNPCK	2,16	2	1,64	1230,51
			SGSQCGHGDCEQCK	2,13	3	2,84	1769,61
			IPCAPEDVK	1,68	2	2,43	1028,51
			GNYYGYCR	1,6	2	1,52	1052,42
Thrombin-like enzyme asperase <i>OS=Bothrops asper</i>	Q072L6	9,84	VLNEDEQTRDPK	3,27	3	2,86	1443,71
			IMGWGTISPTK	2,49	2	2,86	1206,62
			VSDYTEWIK	2,41	2	2,01	1140,55
			SIIAGNTAAACPP	1,68	2	2,87	1242,61
Plasminogen activator-like protein <i>OS=Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>	E5L0E5	9,54	IMGWGTISPTK	2,49	2	2,86	1206,62
			LDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVSVC	3,21	3	4,32	2889,45
			DKDIMLIR	2,01	2	1,63	1019,55
			DIMLIR	1,83	2	2,49	776,43
Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	P30431	9,47	DNSPGQNNPCK	2,16	2	1,64	1230,51
			SGSQCGHGDCEQCK	2,13	3	2,84	1769,61
			KIPCAPEDVK	1,91	2	-2,8	1156,59
			IPCAPEDVK	1,68	2	2,43	1028,51
			GNYYGYCR	1,6	2	1,52	1052,42
Snake venom serine protease homolog <i>OS=Bothrops jararacussu</i>	Q7T229	8,99	VSDYTEWIR	2,67	2	2,03	1168,56
			IMGWGTISPTK	2,49	2	2,86	1206,62
			SIIAGNTDVTCP	2	2	2,87	1344,65
			DIMLIR	1,83	2	2,49	776,43
Snake venom serine protease <i>OS=Bothrops insularis</i>	Q8QG86	7,92	TLCAGVLQGGK	2,05	2	1,22	1103,58
			KPALYTK	2,02	2	1,84	820,49
			DKDIMLIR	2,01	2	1,63	1019,55
			DIMLIR	1,83	2	2,49	776,43
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-1	Q0NZY0	6,52	LTPGSQCADGLCCDQCR	4,24	3	1,98	1997,79

OS= <i>Bothrops jararaca</i>			RGQGIYYCR	2,28	2	0,68	1172,56
Thrombin-like enzyme kangshuanmei	P85109	5,9	VIGGDECNINEHR	2,04	2	2,53	1512,68
OS= <i>Gloydus brevicaudus</i>			KPALYTK	2,02	2	1,84	820,49
			DIMLIR	1,83	2	2,49	776,43
MP_I1 SVMP	E3UJL3	4,66	YNSNLNTIR	2,59	2	2,09	1094,56
OS= <i>Bothrops neuwiedi</i>			ASQSNLTPEQQR	2,07	2	2,25	1358,66

**Banda 4: amostra de veneno coletada no dia 7 do ciclo de produção de veneno (~ 17 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Phospholipase A2 BnSP-7	Q9IAT9	32,27	TIVCGENNPCLK	2,85	2	2,78	1404,66
OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>			SYGAYGCNCGVLGR	2,8	2	2,65	1533,66
			MILQETGKNPAK	3,09	2	2,21	1345,71
			MILQETGK	2,19	2	1,62	919,49
			MILQETGK	2,14	2	2,98	935,48
			ENLGTYNK	1,82	2	1,95	938,45
			ENLGTYNKK	1,8	2	1,6	1066,55
			KLTGCDPK	1,79	2	2,11	918,47
			AVAICLR	1,76	2	1,47	802,46
			CCYVHK	1,99	2	2,28	866,36
			ELCECDK	1,77	2	1,99	953,37
			DKTIVCGENNPCLK	3,86	2	0,54	1647,78
			DRYSYSWK	2,25	3	1,93	1104,51
			YHLKPFCK	2,16	3	0,86	1092,56
Phospholipase A2 homolog 2	Q9I834	26,64	DKTIVCGENNSCLK	4,05	2	3,36	1637,76
OS= <i>Bothrops moojeni</i>			TIVCGENNSCLK	3,47	2	1,92	1394,64
			MILQETGKNPAK	3,09	2	2,21	1345,71
			MILQETGK	2,19	2	1,62	919,49
			ENLDTYNKK	2,14	2	1,42	1124,55

			MILQETGK	2,14	2	2,98	935,48
			KLTGCDPK	1,79	2	2,11	918,47
			AVAICLR	1,76	2	1,47	802,46
			CCYVHK	1,99	2	2,28	866,36
			ELCECDK	1,77	2	1,99	953,37
			DRYSYSWK	2,25	3	1,93	1104,51
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops asper</i>	Q072L5	23,13	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,82	3	2,93	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,16	2	2,11	1865,85
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,93	2	1,14	1339,55
			CTGQSADCPR	2,36	2	1,03	1151,45
			YNSNLNTIR	1,91	2	0,86	1094,55
			GDNPDDRCTGQSADCPR	3,22	3	2,67	1920,76
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,01	3	3,03	1959,84
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	1,71	2	2,61	1358,66
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98SP2	18,86	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,82	3	2,93	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,16	2	2,11	1865,85
			IHQMVNIMK	2,39	3	-0,2	1145,58
			DNPQCILNK	1,83	2	-1,17	1101,53
			KTDLLNR	1,82	2	1,55	859,5
			HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK	3,84	4	1,48	2739,16
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops insularis</i>	Q5XUW8	17,74	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,16	2	2,11	1865,85
			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,93	2	1,14	1339,55
			CTGQSADCPR	2,36	2	1,03	1151,45
			YNSNLNTIR	1,91	2	0,86	1094,55
			GDNPDDRCTGQSADCPR	3,22	3	2,67	1920,76
			SVNVDasLANLEVWSK	2,14	2	3,18	1731,89
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,01	3	3,03	1959,84
Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin	P30431	15,51	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,16	2	2,11	1865,85

OS= <i>Bothrops jararaca</i>			<b>YEDAMQYEFK</b>	2,93	2	1,14	1339,55
			DNSPGQNNPCK	2,73	2	1,34	1230,51
			MFYSNDDEHK	2,35	3	1,35	1301,51
			KIPCAPEDVK	2,04	2	1,95	1156,6
			VCSNGHCVDVATAY	2,29	2	0,37	1552,65
Disintegrin basilicin	P31981	14,89	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,82	3	2,93	2050,87
OS= <i>Crotalus basiliscus</i>			AGEECDGSPANPCCDAATCK	3,49	2	2,08	2329,82
			CTGQSADCPR	2,36	2	1,03	1151,45
			GDNPDDRCTGQSADCPR	3,22	3	2,67	1920,76
Disintegrin cereberin	P31985	14,19	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,82	3	2,93	2050,87
OS= <i>Crotalus oreganus cerberus</i>			CTGQSADCPR	2,36	2	1,03	1151,45
			GDNPDDRCTGQSADCPR	3,22	3	2,67	1920,76
			EAGEECDGSPANPCCDAATCK	2,79	2	2,42	2458,87
Bothroinsularin subunit alpha	P0C929	13,24	WSDGSSVSYENVVGR	4,48	2	2,54	1641,75
OS= <i>Bothrops insularis</i>			MNWADAER	2,57	2	1,25	1008,42
			MNWADAER	2,39	2	-0,72	992,42
			IQSSDLYAWIGLR	3,8	2	4,58	1521,81
Phospholipase A2 homolog Cax-K49	Q8UVZ7	10,19	MILQETGK	2,19	2	1,62	919,49
OS= <i>Crotalus atrox</i>			ENLDTYNKK	2,14	2	1,42	1124,55
			MILQETGK	2,14	2	2,98	935,48
			NPITSYGIYGCNCGVGSR	1,96	2	-2,18	1974,87
			AVAICLR	1,76	2	1,47	802,46
Bothroinsularin subunit beta	P0C930	7,79	FEWSDGSDLSYK	3,08	2	2,47	1433,62
OS= <i>Bothrops insularis</i>			DCPPDWSSYEGSCYR	2,84	2	4,56	1878,71
			MNWEDAER	1,88	2	-0,28	1022,42
Disintegrin ussuristatin-1	Q7LZI5	7,37	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,01	3	2,19	2064,88
OS= <i>Gloydus ussuriensis</i>			CTGQSADCPR	2,36	2	1,03	1151,45

C-type lectin 6 OS= <i>Crotalus adamanteus</i>	F8S0Z0	5,36	RPYCTVMVVK FTSMWIGLK RPYCTVMVVK	1,94 1,73 1,69	2 2 2	1,4 3,06 1,55	1268,65 1098,56 1252,65
Zinc metalloproteinase-disintegrin catroriarin OS= <i>Crotalus atrox</i>	A2CJE4	4,81	DNSPGQNNPCK NPCCDAATCK	2,73 2,08	2 2	1,34 1,57	1230,51 1196,45

**Banda 1: amostra de veneno coletada no dia 10 do ciclo de produção de veneno (~ 65 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Phospholipase A2 BnSP-7 OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>	Q9IAT9	12,67	SYGAYGCNCGVLGR DKTIVCGENNPCLK TIVCGENNPCLK AVAICLR YHLKPFCK	3,61 2,89 2,62 1,78 1,77	2 3 2 2 3	2,01 1,97 2,35 2,38 4,72	1533,66 1647,78 1404,66 802,46 1092,57
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-1 OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q0NZY0	9,78	LTPGSQCADGLCCDQCR QNGVTIPCAR GQGIYYCR RGQGIYYCR FKGAGTECR	2,65 1,95 1,81 1,75 1,61	2 2 2 3 2	3,15 3,3 3 1,97 2,12	1997,79 1115,56 1016,46 1172,56 1025,48
Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	P30431	9,06	DNSPGQNNPCK KTDLLTR KIPCAPEDVK IPCAPEDVK	2,72 2,07 2,02 2,24	2 2 3 2	1,15 2,6 3,34 3,03	1230,51 846,5 1156,6 1028,51
Phospholipase A2 homolog 2 OS= <i>Bothrops asper</i>	P24605	8,46	SYGAYGCNCGVLGR TIVCGENNSCLK AVAICLR	3,61 3,06 1,78	2 2 2	2,01 3,49 2,38	1533,66 1394,64 802,46
L-amino-acid oxidase OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>	B5AR80	7,98	SAGQLYEESLQK HDDIFAYEK	3,36 2,92	2 2	0,42 1,62	1352,66 1137,52

			EVTVTYQTSAK	1,69	2	2,63	1226,62
Zinc metalloproteinase-disintegrin catroriarin OS= <i>Crotalus atrox</i>	A2CJE4	7,54	DNSPGQNNPCK	2,72	2	1,15	1230,51
			NPCCDAATCK	2,58	2	1,06	1196,45
			IPCAPEDVK	2,24	2	3,03	1028,51
Acocostatin OS= <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	F8RTZ7	4,88	DECDMADLCTGR	3,27	2	2,76	1458,53
			FKGAGTECR	1,61	2	2,12	1025,48
Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3 OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q98UF9	4,44	NCRDPCDAATCK	2,83	3	1,65	1627,61
			FKGAGTECR	1,61	2	2,12	1025,48
Metalloproteinase isoform 7 OS= <i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	B0VXU9	4,12	<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,51	2	2,61	1358,66
			FKGAGTECR	1,61	2	2,12	1025,48
Zinc metalloproteinase atroxlysin-1 OS= <i>Bothrops atrox</i>	P85420	3,83	KDLLNR	2	2	1,9	859,5
			TDLLNR	1,83	2	2,15	731,4
Phospholipase A2 Cax-K49 OS= <i>Crotalus atrox</i>	Q8UVZ7	3,62	AVAICLR	1,78	2	2,38	802,46
			NPITSYGIYGCNCGVGSR	1,84	2	1,9	1974,88

**Banda 2: amostra de veneno coletada no dia 10 do ciclo de produção de veneno (~ 50kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	O93523	36,21	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	3,98	4	2,65	2953,15
			<b>ASQLVVTAEQK</b>	3,63	2	-2,56	1301,7
			SGSQCGHGDCEQCK	3,47	3	1,28	1769,61
			MFYSNDDEHK	2,92	3	4,3	1301,51
			MFYSNDDEHK	2,71	3	1,8	1285,51
			DNSPGQNNPCK	2,58	2	1,94	1230,51
			KIPCAPEDVK	2,48	2	2,59	1156,6
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	2,25	3	2,51	2100,94
			KDLLTR	2,41	2	2,96	846,5
			VCSNGHCVDVATAY	2,22	2	-4,43	1552,64
			ITVKPDVDYTLNSFAEWR	3,35	3	3,01	2154,09

			IPCAPEDVK	2,42	2	3,38	1028,51
			TDLLTR	1,79	2	2,46	718,41
L-amino-acid oxidase (Fragment) OS= <i>Bothrops moojeni</i>	Q6TGQ8	14,53	SAGQLYEESLQK	3,8	2	1,5	1352,67
			HDDIFAYEK	2,91	2	0,44	1137,52
			ETDYEEFLEIAK	2,83	2	2,48	1486,69
			LPTSMYQAIQEK	2,68	2	2,3	1424,71
			DPGVLEYPVKPSEVGK	2,3	3	2,21	1713,9
Metalloproteinase PMMP-2 OS= <i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	E9NW27	7,99	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,63	3	2,31	2050,87
			<b>YENIEKEDEAPK</b>	2,35	3	2,5	1464,68
Batroxstatin-1 (Fragment) OS= <i>Bothrops atrox</i>	C5H5D2	7,88	KYIELVIVADNVMVK	3,22	3	4,69	1749,99
			YLIDNRPPCILNIPLR	2,75	3	2,78	1967,09
			QNGVTIPCAR	1,92	2	3,73	1115,56
Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q98SP2	7,75	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,63	3	2,31	2050,87
			KTDLLNR	2,12	2	1,9	859,5
Batroxstatin-2 OS= <i>Bothrops atrox</i>	C5H5D3	6,54	DECDMADLCTGR	3,37	2	2,09	1458,53
			LVLVADYIMYLK	3,17	2	2,52	1456,81
Phospholipase A2 BnSP-7 OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>	Q9IAT9	5,73	SYGAYGCNCGVLGR	3,68	2	0,9	1533,65
			TIVCGENNPCLK	2,05	2	2,17	1404,66
Zinc metalloprotease-disintegrin halysase OS= <i>Gloydus halys</i>	Q8AWI5	5,12	<b>ASQSNLTPEQQR</b>	3,05	2	2,79	1358,66
			LYCIDSSPANK	2,07	2	1,77	1267,6
Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3 OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q98UF9	5	NCRDPCCDAATCK	2,78	3	1,2	1627,61
			VCSNGHCVDVATAY	2,22	2	-4,43	1552,64
Metalloproteinase OS= <i>Echis carinatus sochureki</i>	E9JG36	4,97	NPCCDAATCK	2,62	2	2,18	1196,45
			<b>YENIEKEDEAPK</b>	2,35	3	2,5	1464,68
Group III snake venom metalloproteinase OS= <i>Echis ocellatus</i>	E9KJZ6	4,77	<b>YENIEKEDEAPK</b>	2,35	3	2,5	1464,68
			IPCAPEDVK	2,42	2	3,38	1028,51

Metalloproteinase isoform 1 OS= <i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	B0VXU4	4,57	<b>YENIEKEDEAPK</b>	2,35	3	2,5	1464,68
			VCSNGHCVDVATAY	2,22	2	-4,43	1552,64
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-1 OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q0NZY0	4,34	LTPGSQCADGLCCDQCR	2,42	2	3,21	1997,79
			QNGVTIPCAR	1,92	2	3,73	1115,56
<b>Banda 3: amostra de veneno coletada no dia 10 do ciclo de produção de veneno (~ 45 kDa)</b>							
<b>Proteína*</b>	<b>Número de acesso*</b>	<b>Score**</b>	<b>Peptídeos identificados†</b>	<b>XCorr‡</b>	<b>z</b>	<b>ΔM ppm</b>	<b>MH<sup>+</sup> (Da)</b>
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	O93523	44,44	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHK	5,26	4	2,73	2953,15
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	3,15	1865,86
			DNSPGQNNPCK	3,22	2	2,24	1230,51
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,14	2	2,89	1426,59
			SGSQCGHGDCEQCK	3,35	3	3,77	1769,61
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHK	4,14	4	1,6	2937,15
			MFYSNDDEHK	2,71	3	2,87	1285,51
			VCSNGHCVDVATAY	2,54	2	3,36	1552,65
			IPCAPEDVK	2,6	2	2,67	1028,51
			MFYSNDDEHK	3,16	3	2,47	1301,51
			KIPCAPEDVK	2,24	2	3,43	1156,6
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	2,21	4	0,73	2100,93
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	1,82	3	3,63	2084,94
			KTDLLTR	2,05	2	3,24	846,5
			TDLLTR	2,05	2	2,72	718,41
Zinc metalloproteinase-disintegrin VMP-III OS= <i>Crotalus viridis viridis</i>	C9E1R8	38,51	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHK	5,26	4	2,73	2953,15
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	3,15	1865,86
			<b>YEDAMQYELK</b>	3,33	2	2,18	1305,56
			DNSPGQNNPCK	3,22	2	2,24	1230,51
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,14	2	2,89	1426,59

			SGSQCGHGDCEQCK	3,35	3	3,77	1769,61
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,14	4	1,6	2937,15
			<b>YEDAMQYELK</b>	2,88	2	1,95	1289,57
			VCSNGHCVDVATAY	2,54	2	3,36	1552,65
			IPCAPEDVK	2,6	2	2,67	1028,51
			KDLLTR	2,05	2	3,24	846,5
			TDLLTR	2,05	2	2,72	718,41
Zinc metalloproteinase/disintegrin <i>OS=Bothrops jararaca</i>	Q98SP2	32,75	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,55	3	1,86	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	3,15	1865,85
			<b>YEDAMQYELK</b>	3,33	2	2,18	1305,56
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,14	2	2,89	1426,59
			<b>ASQSNLTPEHQ</b>	2,93	3	1,47	1367,66
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,79	2	2,44	1403,78
			<b>YEDAMQYELK</b>	2,88	2	1,95	1289,57
			<b>LSDEAHAVFK</b>	1,99	3	2,35	1203,6
			TDLLNR	1,95	2	4,32	731,4
			KDLLNRK	2,09	3	1,03	987,59
			IHQMVNIMK	2,16	2	2,23	1145,58
Acurhagin <i>OS=Deinagkistrodon acutus</i>	Q6Q274	29,91	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	5,26	4	2,73	2953,15
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,14	2	2,89	1426,59
			SGSQCGHGDCEQCK	3,35	3	3,77	1769,61
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,14	4	1,6	2937,15
			MFYSNDDEHK	2,71	3	2,87	1285,51
			MFYSNDDEHK	3,16	3	2,47	1301,51
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	2,21	2	1,91	2100,93
			<b>LSDEAHAVFK</b>	1,99	3	2,35	1203,6
			MFYSNDDEHKGMVLPGTK	1,82	3	3,63	2084,94
			DDSPGQNNPCK	2,13	2	2,03	1231,5

Zinc metalloproteinase-disintegrin catroriarin OS= <i>Crotalus atrox</i>	A2CJE4	21,36	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	5,26	4	2,73	2953,15
			DNSPGQNNPCK	3,22	2	2,24	1230,51
			SGSQCGHGDCEQCK	3,35	3	3,77	1769,61
			ASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFK	4,14	4	1,6	2937,15
			NPCCDAATCK	2,79	2	1,87	1196,45
			IPCAPEDVK	2,6	2	2,67	1028,51
Zinc metalloproteinase-disintegrin brevilysin-H6 OS= <i>Gloydius brevicaudus</i>	P0C7B0	19,87	DNSPGQNNPCK	3,22	2	2,24	1230,51
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,14	2	2,89	1426,59
			SGSQCGHGDCEQCK	3,35	3	3,77	1769,61
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,79	2	2,44	1403,78
			VCSNGHCVDVATAY	2,54	2	3,36	1552,65
			IPCAPEDVK	2,6	2	2,67	1028,51
Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Bothrops asper</i>	Q072L5	19,59	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,55	3	1,86	2050,87
			<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	3,15	1865,86
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	3,11	2	2,7	1358,66
			<b>IQGETYLIEPLK</b>	2,79	2	2,44	1403,78
			YNSNLNTIR	1,87	2	2,31	1094,56
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,31	3	4,06	1959,84
MP_III2 SVMP OS= <i>Bothrops neuwiedi</i>	E3UJL1	17,42	LHPWVECESGECCGQCR	5,48	3	2,65	2163,85
			SECDAESCTGQSAQCPTDDFK	4,7	3	3,61	2643,04
			NPCCDATTCK	2,79	2	1,87	1226,46
			QKPQCILNEPLR	2,66	3	-0,67	1495,8
			AGNVCRPQR	1,8	2	1,27	1057,53
Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Bothrops insularis</i>	Q5XUW8	16,88	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	3,15	1865,86
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,99	2	2,24	1330,66
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,79	2	2,44	1403,78
			YNSNLNTIR	1,87	2	2,31	1094,56

			<b>LQGETYLIEPLKLPDSEAHAVYK</b>	2,97	4	3,16	2614,38
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,31	3	4,06	1959,84
Metalloproteinase PMMP-2 OS= <i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	E9NW27	13,62	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,55	3	1,86	2050,87
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,79	2	2,44	1403,78
			<b>LQGETYLIEPLKLPDSEAHAVYK</b>	2,97	4	3,16	2614,38
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,31	3	4,06	1959,84
Glutaminyl-peptide cyclotransferase OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q9YIB5	13,57	HPVEDDHIPFLR	2,49	3	2,47	1474,74
			RHPVEDDHIPFLR	2,27	4	2,06	1630,84
			YPGSPGSYAVR	2,79	2	3,88	1153,56
			NPVFPVYFLNTAR	2,12	2	5,07	1537,82
			LIFFDGEEAFVR	2,1	2	4,89	1442,73
			WSPSDSLYGSR	1,81	2	1,86	1254,57
Zinc metalloproteinase-disintegrin TSV-DM OS= <i>Viridovipera stejnegeri</i>	Q2LD49	13,52	<b>YEDAMQYELK</b>	3,33	2	2,18	1305,56
			<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,14	2	2,89	1426,59
			<b>YEDAMQYELK</b>	2,88	2	1,95	1289,57
			LYCIDSSPANK	2,4	2	2,06	1267,6
			NMPQCILK	1,76	2	3,74	1019,5
Metalloproteinase 7 OS= <i>Crotalus adamanteus</i>	F8S108	13,11	<b>IENDADSTASISACNGLK</b>	3,95	2	3,15	1865,86
			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	3,11	2	2,7	1358,66
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,31	3	4,06	1959,84
			GAGTECRAAKDECDMADVCTGR	1,96	3	-2,72	2445,97
			NMPQCILK	1,76	2	3,74	1019,5
Batroxstatin-2 OS= <i>Bothrops atrox</i>	C5H5D3	11,43	DECDMADLCTGR	3,56	2	-5,28	1458,52
			DECDMADLCTGR	2,76	2	0,53	1442,53
			GAGTECRAAKDECDMADLCTGR	2,28	3	-0,78	2459,99
			LVLVADYIMYLK	2,84	2	2,68	1456,81
Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Protobothrops flavoviridis</i>	P18619	11,31	<b>YEDAMQYELK</b>	3,33	2	2,18	1305,56
			<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,79	2	2,44	1403,78

			<b>YEDAMQYELK</b>	2,88	2	1,95	1289,57
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,31	3	4,06	1959,84
Zinc metalloproteinase-disintegrin bothrojarin-2 OS= <i>Bothrops jararaca</i>	Q0NZX9	9,53	SECDIAESCTGQSAQCPTDDFHK	4,7	3	3,61	2643,04
			GEECDCGSPR	3,04	2	1,83	1166,42
			AGNVCRPQR	1,8	2	1,27	1057,53
Batroxstatin-3 OS= <i>Bothrops atrox</i>	C5H5D4	8,4	YLISHTPQCILNEPLR	3,81	3	2,42	1954,02
			KYTHNLIDIR	2,32	3	2,31	1272,7
			YTHNLIDIR	2,27	3	1,18	1144,61
Snake venom serine protease OS= <i>Bothrops insularis</i>	Q8QG86	8,04	NMSDEKDKDIMLIR	2,49	3	2,25	1739,83
			SVANDDEVIR	1,91	2	2,56	1117,55
			FICPNK	1,82	2	1,95	778,39
			IYLGIHAR	1,81	3	0,24	942,55
Zinc metalloproteinase/disintegrin ussurin OS= <i>Gloydius ussuriensis</i>	Q7SZD9	7,88	<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,14	2	2,89	1426,59
			LRPGAQCAEGLCCEQCR	2,75	3	2,28	2064,88
			<b>LSDSEAHAVFK</b>	1,99	3	2,35	1203,6
Zinc metalloprotease-disintegrin halysase OS= <i>Gloydius halys</i>	Q8AWI5	7,83	<b>ASQSNLTPEQQR</b>	3,11	2	2,7	1358,66
			LYCIDSSPANK	2,4	2	2,06	1267,6
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,31	3	4,06	1959,84
Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Bothrops jararaca</i>	P31989	7,55	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,55	3	1,86	2050,87
			ENPQCILNK	2	2	1,44	1115,55
Metalloproteinase isoform 1 OS= <i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	B0VXU4	7,47	<b>DYSETHYSPDGR</b>	3,14	2	2,89	1426,59
			VCSNGHCVDVATAY	2,54	2	3,36	1552,65
			GAGTECRAAKDDCDMADVCTGR	1,79	3	-3,01	2415,96
Group III snake venom metalloproteinase OS= <i>Echis ocellatus</i>	E9KJX7	7,15	IPCAPEDVK	2,6	2	2,67	1028,51
			KIPCAPEDVK	2,24	2	3,43	1156,6
			<b>GLFSEDYSETHYSPDGR</b>	2,31	3	4,06	1959,84
Metalloproteinase isoform 7 OS= <i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	B0VXU9	6,67	<b>ASQSNLTPEQQR</b>	3,11	2	2,7	1358,66
			GAGTECRAAKDDCDMADVCTGR	1,79	3	-3,01	2415,96

			NMPQCILK	1,76	2	3,74	1019,5
Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin <i>OS=Protobothrops jerdonii</i>	P83912	4,99	<b>DYSETHYSPDGR</b> LTPGSQCADGLCCDQCR	3,14 1,84	2 2	2,89 3,27	1426,59 1997,79
Phospholipase A2 BnSP-7 <i>OS=Bothropoides pauloensis</i>	Q9IAT9	4,82	TIVCGENNPCLK SYGAYGCNCGVLGR	2,21 2,61	2 2	1,91 3,13	1404,66 1533,66
Phospholipase A2 homolog 2 <i>OS=Bothrops asper</i>	P24605	4,82	SYGAYGCNCGVLGR TIVCGENNSCLK	2,61 2,21	2 2	3,13 3,14	1533,66 1394,64
Group III snake venom metalloproteinase <i>OS=Echis ocellatus</i>	E9KJZ6	4,44	IPCAPEDVK TDIVSPPVCGNELLEK	2,6 1,84	2 2	2,67 2,56	1028,51 1770,89

**Banda 4: amostra de veneno coletada no dia 10 do ciclo de produção de veneno (~ 37 kDa)**

Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Snake venom serine protease homolog <i>OS=Bothrops jararacussu</i>	Q7T229	11,49	IMGWGTISPTK	2,87	2	1,14	1206,62
			SIIAGNTDVTCP	2,35	2	0,96	1344,64
			VSDYTEWIR	2,19	2	0,77	1168,56
			TLCAGILEGGK	2,16	2	0,95	1118,58
			WDKDIMLIR	1,92	3	-0,54	1205,63
Zinc metalloproteinase BITM02A <i>OS=Bothrops insularis</i>	Q8QG89	7,67	<b>LQGETYLIEPLK</b>	2,83	2	1,23	1403,77
			<b>ASQSNLTPEHQR</b>	2,55	3	-1	1367,66
			<b>FENVEKEDEAPK</b>	2,29	3	-0,24	1434,67
Zinc metalloproteinase-disintegrin scutiarin <i>OS=Crotalus scutulatus scutulatus</i>	A2CJE2	7,29	NPCCDAATCK	2,57	2	-0,17	1196,44
			IPCAPEDVK	1,82	2	2,43	1028,51
			GNYYGYCR	1,47	2	2,57	1052,42
			GMVLPGTK	1,43	2	1,16	818,44
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ <i>OS=Bothrops jararaca</i>	P81824	6,71	INILDHAVCR	2,66	2	0,4	1210,63
			LGVHSIK	2,12	2	-4,7	753,45

			KPALYTK	1,94	2	-0,91	820,49
Snake venom serine protease HS114	Q5W959	5,31	IMGWGSITPIQK	2,88	2	1,11	1346,71
OS= <i>Bothrops jararaca</i>			NDDALDKDLMLVR	2,43	3	0,43	1533,75
Batroxstatin-2	C5H5D3	3,58	DECDMADLCTGR	2,14	2	2,42	1458,53
OS= <i>Bothrops atrox</i>			GMVLPGTK	1,43	2	1,16	818,44
<b>Banda 5: amostra de veneno coletada no dia 10 do ciclo de produção de veneno (~ 17 kDa)</b>							
Proteína*	Número de acesso*	Score**	Peptídeos identificados†	XCorr‡	z	ΔM ppm	MH <sup>+</sup> (Da)
Bothroinsularin subunit alpha	P0C929	16,99	WSDGSSVSYENVVGR	4,02	2	0,75	1641,75
OS= <i>Bothrops insularis</i>			MNWADAER	2,47	2	0,04	1008,42
			MNWADAER	2,35	2	-0,47	992,42
			CFALEK	1,54	2	-1,45	767,37
			IQSSDLYAWIGLR	3,32	2	3,46	1521,81
			DCPSDWSPYQYCYK	3,29	2	-2,96	1925,74
Phospholipase A2 BnSP-7	Q9IAT9	16,4	SYGAYGCNCGVLGR	2,99	2	-5,63	1533,64
OS= <i>Bothropoides pauloensis</i>			TIVCGENNPCLK	3,38	2	3,74	1404,66
			MILQETGK	2,03	2	0,11	935,48
			ENLGTYNK	1,88	2	0,59	938,45
			AVAICLR	1,6	2	0,1	802,46
			YHLKPFCK	2,28	3	1,28	1092,56
			MILQETGKNPAK	2,25	3	2,85	1345,71
Zinc metalloproteinase	Q8QG89	11,28	KTDLLNR	2,06	2	0,48	859,5
OS= <i>Bothrops insularis</i>			ENPQCILNK	2,04	2	0,57	1115,55
			KSHDNAQLLTNTDFGPTIGLAYVGTMC	2,65	4	2,92	3395,59
			DPK				
			KTDLLNRK	2,39	3	1,95	987,59
			IHQMVNIMK	2,13	3	1,63	1145,58
Bothroinsularin subunit beta	P0C930	9,6	FEWSDGSDLSYK	3,24	2	0,93	1433,62

OS= <i>Bothrops insularis</i>			MNWEDA EK	2,04	2	-0,28	1022,42
			LEYFVCEFQA	2,37	2	3,95	1305,58
			DCPPDWSSYEGSCYR	1,96	2	3,13	1878,71
Phospholipase A2 2	P84397	9,28	CCYVHDCCYGK	3,19	3	0,86	1521,53
OS= <i>Bothrops insularis</i>			VAALCFQDNK	3,02	2	1,35	1165,56
			LDLYTYSK	1,67	2	0,57	1002,51
			NLWQFGR	1,39	2	0,12	920,47
MP_IIa SVMP	E3UJM0	7,96	LRPGAQCAEGLCCDQCR	5,23	3	1,95	2050,87
OS= <i>Bothrops neuwiedi</i>			<b>ASQSNLTPEQQR</b>	2,73	2	1,98	1358,66
C-type lectin 6	F8S0Z0	5,56	FTSMWIGLK	2,18	2	-0,38	1098,56
OS= <i>Crotalus adamanteus</i>			RPYCTVMVVK	1,84	2	1,88	1268,65
			RPYCTVMVVK	1,54	2	0,77	1252,65
Zinc metalloproteinase-disintegrin catroriarin	A2CJE4	4,22	IPCAPEDVK	2,13	2	4,21	1028,51
OS= <i>Crotalus atrox</i>			NPCCDAATCK	2,09	2	1,16	1196,45

\*Conforme o banco de dados SwissProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))

\*\* Conforme o algoritmo SEQUEST®, utilizado na plataforma *Proteome Discoverer*™ 1.3.0.339 (Thermo Scientific)

†Peptídeos em negrito são correspondentes ao pró-domínio

‡Conforme o algoritmo SEQUEST®