



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

Estudo da variação ontogenética do veneno de *Bothrops atrox* por análise proteômica e peptidômica: Identificação de peptídeos potencializadores de bradicinina

Antonio Coutinho Neto

Tese apresentada à Universidade Federal de Rondônia - UNIR, para a obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental.

PORTO VELHO, RO
- 2013 -



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

Estudo da variação ontogenética do veneno de *Bothrops atrox* por análise proteômica e peptidômica: Identificação de peptídeos potencializadores de bradicinina

Antonio Coutinho Neto

Tese apresentada à Universidade Federal de Rondônia - UNIR, para a obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stábeli

PORTO VELHO, RO
-2013-

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA CENTRAL PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Coutinho Neto, Antonio.

C871

Estudo da variação ontogenética do veneno de *Bothrops atrox* por análise proteômica e peptidômica: identificação de peptídeos potencializadores de bradicinina. / Antonio Coutinho Neto. Porto Velho, Rondônia, 2013.

109 f.: il.

Tese (Doutorado em Biologia Experimental) - Núcleo de Saúde (NUSAU), Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2013.

Bibliotecária Responsável: Eliane Gemaque / CRB 11-549

ESTUDO DA VARIAÇÃO ONTOGENÉTICA DO VENENO DE *Bothrops atrox* POR ANÁLISE PROTEÔMICA E PEPTIDÔMICA: IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS POTENCIALIZADORES DE BRADICININA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de Doutor.

Defesa Publica realizada em 26 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. CLÉBERSON DE FREITAS FERNANDES
(Membro Titular - EMBRAPA/RO)

Prof^a. Dr^a. SILVANA MARCUSSI
(Membro Titular - UFLA)

Prof^a. Dr^a. MARTA CHAGAS MONTEIRO
(Membro Titular - UFPA)

Prof. Dr. LEONARDO DE AZEVEDO CALDERON
(Membro Titular - UNIR / FIOCRUZ-RO)

Prof. Dr. RODRIGO GUERINO STÁBELI
(Presidente - Orientador - UNIR / FIOCRUZ-RO)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Isabela, minha esposa, amiga e companheira de todas as horas.

Aos filhos Bernardo e César, por suportarem todas as sobrecargas, adversidades, e principalmente minha ausência. Sem o amor e apoio incondicional, não teria forças para continuar esta jornada tempestuosa.

Amo muito vocês acima de qualquer coisa.

Obrigado por estarem presentes todos os dias na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rodrigo G. Stábeli, pelo exemplo como pesquisador e pessoa. Obrigado pela confiança, apoio e constante incentivo.

Ao Dr. Leonardo A. Calderon, pela sempre prontidão, amizade, orientação e parceria.

Ao Dr. Andreimar M. Soares, chefe do Centro de Estudos em Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio), pela orientação na fase final e conclusiva deste trabalho, contribuindo significativamente para o resultado final desta tese.

A aluna de doutorado Cleópatra Caldeira pela pronta ajuda, em várias das fases operacionais executadas.

Ao amigo Me. Anderson Makoto Kayano que com sua sabedoria e paciência oriental tem sido um verdadeiro companheiro em todas as horas.

A Ma. Kayena Delaix Zaqueo pelo carinho e a amizade conquistada durante este período e pela coleta dos venenos sem os quais o trabalho não seria possível.

Ao Me. Rodrigo Simões Silva pela amizade e o grande auxílio na execução da etapa eletroforética.

Aos amigos do CEBio, Ma. Andréa, Ma. Gizeli, Ma. Rafaela, Marjore, Silvana, Diana, Dr^a. Nelice Serbino, George, Me. João, Me. Leandro Dill, Roniele, Angela, Raires, Dr. César e Me. Angêlo.

Agradeço a minha esposa Isabela, filhos Bernardo e César, aos meus pais, irmão e sogros pelo apoio e confiança em meu trabalho.

Ao Dr. Gustavo H. M. F. Souza pela colaboração e destreza na aquisição de dados com o equipamento Xevo G2 QToF – Waters Technologies do Brazil LTDA / Alphaville - SP.

Agradeço ao Médico Ivo Lauro Dickrow e a Psicóloga Paula dos Reis Bubanz, pela ajuda nesta fase.

Ao Dr. André Lopes Fuly, a Dr^a Thaisa Francille Domingos de Souza e Dr^a Laura Andrade de Moura, pela valiosa colaboração estabelecida, o qual contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Carlos Bloch e ao Me. José Cardoso Filho pela colaboração prestada no início deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FINEP pela bolsa e apoio financeiro do projeto, respectivamente.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para conclusão deste manuscrito.

RESUMO

Os acidentes com serpentes na Amazônia são causados na sua maioria, cerca de 90%, por *Bothrops atrox*, com rápida evolução hemorrágica e morte tecidual. A caracterização ontogenética dos espécimes estudados mostram a relevância do acidente ofídico negligenciado, que produz indivíduos com sequelas ou danos físicos irreparáveis pela ineficácia das terapias utilizadas atualmente. Deste modo, a compreensão das diferenças moleculares entre os venenos de serpentes de uma determinada região geográfica, no caso Porto Velho-RO, são de extrema importância na preparação de bioativos antiofídicos para diminuir os danos e sintomas fisiológicos que a peçonha de serpente causa. Por outro lado, as diferenças protéicas podem contribuir para a descoberta de protótipos de interesse biológico e/ou da medicina. Neste trabalho investigamos a possível variação ontogenética dos venenos de *Bothrops atrox* (adultas, jovens e de filhotes na localidade de Porto Velho-RO) por cromatografia de fase reversa em coluna C-18, cromatografia de exclusão molecular, eletroforese mono e bidimensional, espectrometria de massa (MALDI) e atividades biológicas: miotóxica, hemolítica, hemorrágica, pró-coagulante e coagulante; evidenciando-se a variação ontogenética dos espécimes desta região da Amazônia brasileira. Os venenos de jovens e filhotes analisados apresentaram maior atividade fosfolipásica (hemolítica), hemorrágica, miotóxica, coagulante e atividade pró-coagulante sobre substrato cromogênico, em relação aos indivíduos adultos. As proteínas do veneno desta espécie, apareceram em géis bidimensionais, em condições não redutoras, com bandas protéicas nas faixas moleculares de 92, 52, 37 e 21 kDa. Os perfis cromatográficos destes venenos, mostraram variações quanto aos tempos de retenção e proteínas expressas nas amostras, diferenciando-se dos demais perfis de *Bothrops atrox* já estudados, avaliando a variação geográfica e ontogenética que ocorre com o gênero *Bothrops* distribuído por toda Amazônia legal. Identificou-se por homologia quatro novos peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), nos venenos de *B. atrox* Adulta e Jovem, os quais apresentaram massas de 691,21; 1074,99; 1116,54; 1146,55 e 1384,7386 m/z, sendo o BPP de maior massa sequenciado por sequenciamento *de novo*, para o qual obteve-se os seguintes resíduos de aminoácidos: ZKWPRPGPEIPP, denominado de BAX12.

Palavras chave: *Bothrops atrox*, variação ontogenética, eletroforese bidimensional, cromatografia, venômica, peptídeo potencializador de bradicinina.

ABSTRACT

In Amazon region, the majority of snakebite accidents, next to 90%, are caused mainly by *Bothrops atrox* snakes. The envenomation produced by *B. atrox* is very toxic, evolving fastly to hemorrhage and tissue death leading the victim to serious sequelae or permanent physical damages. In order to understand the differences in the molecular composition between venoms from *B. atrox* in different life stages are extremely important in the efforts to reduce damage and physiological symptoms that snake venoms cause. Furthermore, proteins may contribute for the development of different prototypes of biological interest and / or medicines. In this study we investigated the possible ontogenetic variation of *Bothrops atrox* (adult, youth and newborns in the city of Porto Velho-RO) by reverse phase chromatography, size exclusion chromatography, mono and two-dimensional electroforesis, mass spectrometry (MALDI) and biological activities, such as myotoxic, hemolytic, hemorrhagic, procoagulant and coagulant, in order to evaluate the ontogenetic variability of the specimens from this region of Brazilian Amazonia. Venom proteins visualized in two-dimensional gels in non-reducing conditions showed protein bands of molecular mass ranges of 92, 52, 37 and 21 kDa. The chromatographic profiles of these poisons showed variations in the retention times and protein composition, endorsing ontogenetic variation in *Bothrops atrox*. During preliminary studies we observed variations in protein of the venoms corroborating the ontogenetic intra- and inter-species of snake venoms of *B. atrox*, adult, young and newborn. Four new bradykinin potentiating peptides (BPPs) were identified showing mass of 691.21, 1074.99, 1116.54, 1146.55 and 1384.7386 m/z. The major mass was fragmented and submitted to *de novo*, sequencing, resulting in the following amino acid residues: ZKWPRPGPEIPP, which was named as BAX12.

Keywords: *Bothrops atrox*, ontogenetic, eletrophoresis bidimensional, reverse phase chromatography, venomous, bradykinin-potentiating peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa mostrando localização geográfica dos espécimes de <i>Bothrops atrox</i>	15
Figura 2	Imagem das serpentes <i>B. atrox</i> Adulta, Jovem e Filhote	16
Figura 3	Representação esquemática do sistema de nomenclatura para os íons resultantes da quebra da cadeia de peptídeos	30
Figura 4	Resumo metodológico: Estudo do veneno de <i>Bothrops atrox</i> (adulto, jovem e filhote)	33
Figura 5	Atividade miotóxica dos venenos brutos de <i>B. atrox</i> A, J, F	43
Figura 6	Determinação da atividade hemorrágica mínima dos venenos brutos de <i>B. atrox</i>	44
Figura 7	Avaliação da hemorragia nas peles de camundongos	44
Figura 8	Hidrólise dos fosfolipídios fluorescentes por venenos de <i>B. atrox</i> A, J, F	45
Figura 9	Efeito do pH sobre a atividade da PLA ₂ dos venenos de <i>B. atrox</i> A, J, F	47
Figura 10	Efeitos dos venenos de <i>B. atrox</i> no tempo de coagulação	48
Figura 11	Efeito de inibidores sobre a atividade de coagulação induzida pelo veneno de <i>B. atrox</i> filhote	41
Figura 12	Efeito de inibidores sobre a atividade de coagulação induzida pelo veneno de <i>B. atrox</i> jovem	42
Figura 13	Efeito de inibidores sobre a atividade de coagulação induzida pelo veneno de <i>B. atrox</i> adulta	43
Figura 14	Atividade do veneno de <i>B. atrox</i> filhote sobre substratos sintéticos	44
Figura 15	Atividade do veneno de <i>B. atrox</i> jovem sobre substratos sintéticos	45
Figura 16	Atividade do veneno de <i>B. atrox</i> adulta sobre substratos sintéticos	46
Figura 17	Perfil eletroforético dos venenos brutos de <i>B. atrox</i> em SDS-PAGE monodimensional	47
Figura 18	Perfil eletroforético dos venenos brutos de <i>B. atrox</i> em SDS-PAGE bidimensional	48
Figura 19	Detalhes do gel 2D-SDS-PAGE do grupo D (metaloproteínas)	50
Figura 20	Detalhes do gel 2D-SDS-PAGE do grupos A, L e M (metaloproteínas)	51
Figura 21	Detalhes do gel 2D-SDS-PAGE do grupo C (metaloproteínas)	51

Figura 22	Detalhes do gel 2D-SDS-PAGE do grupo X (svVEGFs)	51
Figura 23	Perfil cromatográfico típico do fracionamento do veneno bruto de <i>B. atrox</i> Adulta com detalhe do gel monodimensional de SDS-PAGE	54
Figura 24	Perfil cromatográfico típico do fracionamento do veneno bruto de <i>B. atrox</i> Jovem com detalhe do gel monodimensional de SDS-PAGE	55
Figura 25	Perfil cromatográfico típico do fracionamento do veneno bruto de <i>B. atrox</i> Filhote com detalhe do gel monodimensional de SDS-PAGE	56
Figura 26	Sobreposição dos cromatogramas de <i>B. atrox</i> adulta (preta), jovem (azul claro) e filhote (vermelho), as linhas cheias demonstram o comprimento de onda de 215nm e pontilhadas 280nm	57
Figura 27	Fracionamento do veneno de <i>B. atrox</i> A em coluna peptide 10/300 GL	58
Figura 28	Fracionamento do veneno de <i>B. atrox</i> J em coluna peptide 10/300 GL	58
Figura 29	Espectro de massa (MALDI-TOF ²) do veneno de <i>Bothrops atrox</i> adulta previamente purificado em sistema HPLC	59
Figura 30	Dissociação induzida por colisão espectro de BPP-BAX12	61
Figura 31	Sequenciamento pelo método <i>De novo</i> , no <i>software pepseq</i> , do peptídeo 1384,7386 m/z	61

TABELAS

Tabela 1	Teor protéico do veneno bruto de <i>Bothrops atrox</i> A, J e F	43
Tabela 2	Avaliação da atividade fosfolipásica dos venenos de <i>B. atrox</i> adulta, jovem e filhote	45
Tabela 3	Hidrólise dos fosfolipídios fluorescentes por venenos de <i>B. atrox</i>	47
Tabela 5	Classificação proteica dos grupos presentes nos venenos de <i>B. atrox</i>	57
Tabela 6	Massas dos cinco novos BPPs da espécie <i>Bothrops atrox</i> de PVH	69
Tabela 7	Alinhamento de sequências entre BPP-BAX12 e Pyroglutamato/peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) sequências de outras espécies do gênero <i>Bothrops</i>	71
Tabela 8	Estrutura primária dos principais peptídeos potenciadores da bradicinina encontradas em diferentes espécies	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE: eletroforese bidimensional.

AA ou aa: Aminoácido.

ACN: Acetonitrila.

ANOVA: Análise de variância

B. atrox **A**: Veneno de *Bothrops atrox* Adulto.

B. atrox **F**: Veneno de *Bothrops atrox* Filhote.

B. atrox **J**: Veneno de *Bothrops atrox* Jovem.

Bj: *Bothrops jararaca*.

BPP: Peptídeo Potencializador de Bradicinina (*bradykinin-potentiating peptides*).

CAPS: ácido Ciclohexil-AminopropaneSulfônico.

CHCA: ácido- α -ciano-4-hidroxicinâmico.

CID: Dissociação Induzida por Colisão (*collision-induced dissociation*).

CK: Creatina-cinase (*creatine-kinase*).

CK-NAC: CK com N-acetil cisteína.

DMC: Dose Mínima Coagulante.

DHIM: Dose Hemolítica Indireta Mínima.

DHM: Dose Hemorrágica Mínima.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

DTT: Ditioneitol.

EC₅₀: Metade da Concentração Máxima Efetiva

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina I.

EDTA: Ácido Etilenodiaminatetracético

ESI: Ionização por eletrospray.

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

i.d: via intradérmica.

i.m: via intramuscular.

IAA: Iodoacetamida

FIE: Focalização Isoelétrica.

IPEPATRO: Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais.

kDa: quilo-Dalton

LAAO: L-aminoácido oxidase

MALDI-TOF: Matriz assistida por dessorção ionização a laser e tempo de voo da massa em espectrometria.

MS: Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry*).

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase.

NBD-PA: 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-il – ácido fosfatídico.

NBD-PC: 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-il – fosfatidilcolina.

NGF: Fator de Crescimento de Nervos.

NL: Não Linear.

pI: ponto Isoelétrico.

PLA₂: Fosfolipase A₂

PM: Peso Molecular.

PMF: Impressão digital de massa peptídica.

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PVH: Porto Velho.

RP: Fase Reversa.

rpm: rotações por minuto.

SA: Ácido Sinapínico.

DP: Desvio Padrão.

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida usando Dodecilsulfato de Sódio.

SNC: Sistema Nervoso Central.

SVMP: Metaloproteinase de veneno de serpente.

svVEGF: Fator de crescimento vascular endotelial de veneno de serpente.

TC: Tempo de Coagulação

TFA: Ácido Trifluoroacético.

U: unidade.

UV: Ultravioleta.

Vh: Volt-hora.

VB: Veneno Bruto.

xg: Força gravitacional.

Z: piroglutamato.

SUMÁRIO

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 – Serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	13
1.2 – Venenos de serpentes: um produto biológico especial	16
1.2.1 – Componentes do veneno	18
1.3 – Peptídeos potencializadores da bradicinina (BPPs – <i>Bradykinin Potentiating Peptides</i>)	24
1.4 – Tecnologia a serviço da Peptidômica de venenos: Espectrometria de Massas ..	27
1.5 – Sequenciamento de peptídeos pelo método <i>De Novo</i>	29
2. OBJETIVO	32
2.1 – Objetivos específicos	32
3. METODOLOGIAS	33
3.1 – Obtenção do veneno	33
3.2 – Dosagem de proteínas	34
3.3 – Ensaio de atividade miotóxica	35
3.4 – Ensaio de atividade hemorrágica	35
3.5 – Ensaio de hemólise indireta	35
3.5.1 – Atividade de fosfolipases A ₂	36
3.6 – Ensaio de coagulação	36
3.6.1 – Atividade hidrolítica sobre substrato cromogênico (pró-coagulante)	37
3.7 – Análise Estatística	37
3.8 – Análise eletroforética	
3.8.1 – Gel Monodimensional (SDS-PAGE)	38
3.8.2 – Gel Bi-dimensional (2-DE)	38
3.9 – Cromatografia em fase reversa	40
3.10 – Cromatografia por exclusão molecular	40
3.11 – Espectrometria de massa	41
3.11.1 – Sequenciamento – método <i>De Novo</i>	41
4. RESULTADOS	43
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS	81
8. APÊNDICE	97
9. ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes do gênero *Bothrops*

As principais serpentes de interesse médico nas Américas pertencem à família Viperidae, sub-família Crotalinae (cascavéis, jararacas e surucucus) (FAN; CARDOSO, 1995; GUTIÉRREZ, 1995; WARRELL, 2004). Dentro deste grupo existem três gêneros que juntos são responsável pela grande maioria dos acidentes ofídicos no Brasil: *Bothrops*, responsáveis por cerca de 90% dos acidentes no território brasileiro (SLOWINSKI; LAWSON, 2002); *Crotalus*, que engloba cinco sub-espécies e apresentam como característica a presença de um chocalho na ponta de sua cauda; e *Lachesis*, representado por uma única espécie (*Lachesis muta*, sendo a maior serpente venenosa das Américas em tamanho (ZUG et al., 2000). As espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, causadoras de acidentes denominados botrópicos, estavam distribuídas em cinco gêneros: *Bothriopsis*, *Bothrocophyas*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis* (FENWICK et al 2009), no entanto Carrasco e colaboradores (2012) reavaliaram a classificação através de estudos da informação filogenética, de diferentes tipos de caracteres morfológicos, o nível de congruência entre diferentes fontes de evidência (morfológica, molecular e ecológica), e o monofiletismo de relacionamentos no interior do grupo *Bothropoides*. Finalmente, depois de avaliar as propostas taxonômicas anteriores, sugeriu-se um rearranjo que retifica a parafilia de *Bothrops* ao atender a estabilidade taxonômica, prevalecendo a nomenclatura *Bothrops*.

No estado de Rondônia encontramos 8 espécies peçonhentas da família Viperidae do gênero *Bothrops*, 1 do gênero *Crotalus* e 1 do gênero *Lachesis*, apresentadas respectivamente: *B. bilineata bilineata*; *B. bilineata smaragdina*; *B. taeniata*; *B. hyoprora*; *B. microphthalmus*; *B. mattogrossensis*; *B. atrox*; *B. brazili*; *Crotalus durissus* e *Lachesis muta* (BERNARDES et al., 2012).

O gênero *Bothrops* (família Viperidae) compreende 37 espécies de jararacas que habitam os continentes americanos desde o México à Argentina (HOGE et al., 1978). Na América do Sul, as espécies *B. atrox*, *B. colombiensis* e *B. jararaca* são clinicamente as mais importantes. A serpente *Bothrops atrox* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na região da Amazônia brasileira (LOPEZ-LOZANO et al., 2002). No Brasil e Venezuela, as espécies de *Bothrops* são responsáveis por mais de 80% de todos os acidentes ofídicos registrados (CAMPBELL e LAMAR, 1989; RENGIFO e RODRIGUEZ-ACOSTA, 2005). No Brasil, somente em 2006, 29.191 casos humanos de acidentes ofídicos foram notificados

ao Ministério da Saúde, entre os quais 19.791 (67,8%) foram devido a espécies de *Bothrops* (BRASIL, 2003). Segundo o levantamento realizado na macrorregião de Porto Velho, foram estudados 92 casos de envenenamentos por serpentes, encaminhados ao Centro de Medicina Tropical do Estado de Rondônia (CEMETRON), no período de setembro de 2008 a setembro de 2010. A grande maioria dos casos era procedente da macrorregião de Porto Velho (84,7%). O principal acidente foi do tipo botrópico com 88 casos (95,6%) seguido de 2 casos laquéticos (2,2%) e 2 casos elapídicos (2,2%) (RORIZ 2011).

Os acidentes por serpentes viperídeas muitas vezes causam sequelas, pois apresentam importante efeito local com evolução rápida, apresentando principalmente edema inflamatório, hemorragia, dor e morte tecidual (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; SILVA et al., 2003). Alguns sistemas ficam fisiopatologicamente comprometidos, causando hemorragias em órgãos distantes do local inicial da lesão, como coração, pulmão, rins e cérebro, e ainda transtornos como agregação de plaquetas, coagulação intravascular, hipotensão, insuficiência respiratória e choque, levando algumas vezes ao óbito em questão de horas (RIBEIRO et al., 1998; MATSUI et al., 2000; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002).

Para algumas espécies do gênero *Bothrops* ocorre uma variação ontogenética na composição da peçonha (KOUYOUMDJIAN; POLIZELLI 1989; RIBEIRO; JORGE 1990; FURTADO et al., 1991; GUERCIO et al., 2006; NÚÑEZ et al., 2009). Explicado pela rápida dispersão e diversificação das serpentes do gênero *Bothrops* na América do Sul pode ter ocorrido por meio de propagações adaptativas em habitats desprovidos de concorrentes da família Viperidae (Fig. 1) (WÜSTER et al., 2002).

A Amazônia brasileira apresenta uma rica fauna de serpentes com aproximadamente 149 espécies registradas (ÁVILA-PIRES et al., 2007). Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que o veneno de *Bothrops* é rico em moléculas altamente complexas com potencial biológico e farmacológico diverso e seletivo, valorizando o estudo proteômico/peptidômico do veneno das serpentes amazônicas (LEWIS e GARCIA, 2003).

Quanto ao hábito alimentar, a maioria das espécies do gênero é generalista, com variação ontogenética, de modo que os exemplares juvenis alimentam-se preferencialmente de presas ectotérmicas (centípedes, lagartos e anfíbios) e os adultos, de presas endotérmicas (roedores e aves). As exceções são *Bothrops cotiara*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops fonsecai* e *Bothrops neuwiedi* que se alimentam exclusivamente de roedores (ANDRADE et al., 1996; MARTINS et al., 2002).

A serpente *Bothrops atrox* (Fig. 2) é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na região da Amazônia brasileira. Em humanos, o envenenamento por mordedura de *B. atrox*

provoca efeitos locais tais como edema, hemorragia e necrose local, além de efeitos sistêmicos, incluindo alterações na coagulação do sangue e vários outros tipos de sangramento distante do local da mordedura. Alteração da hemostasia arterial e trombose são em grande parte causadas por proteinases, especialmente metalo e serinoproteinases que são os principais componentes de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (KAMIGUTI et al., 1996; MATSUI et al., 2000; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002). O aumento da atividade humana em áreas de floresta, a coloração críptica e o comportamento agressivo de *B. atrox* seriam importantes fatores promotores dos acidentes na região amazônica (BORGES et al., 1999). Para a *B. atrox* foram observadas maiores complicações locais e sistêmicas relacionadas ao envenenamento por mordedura de serpente em idade juvenil (MEIER, 1986; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002; SALDARRIAGA et al., 2003).

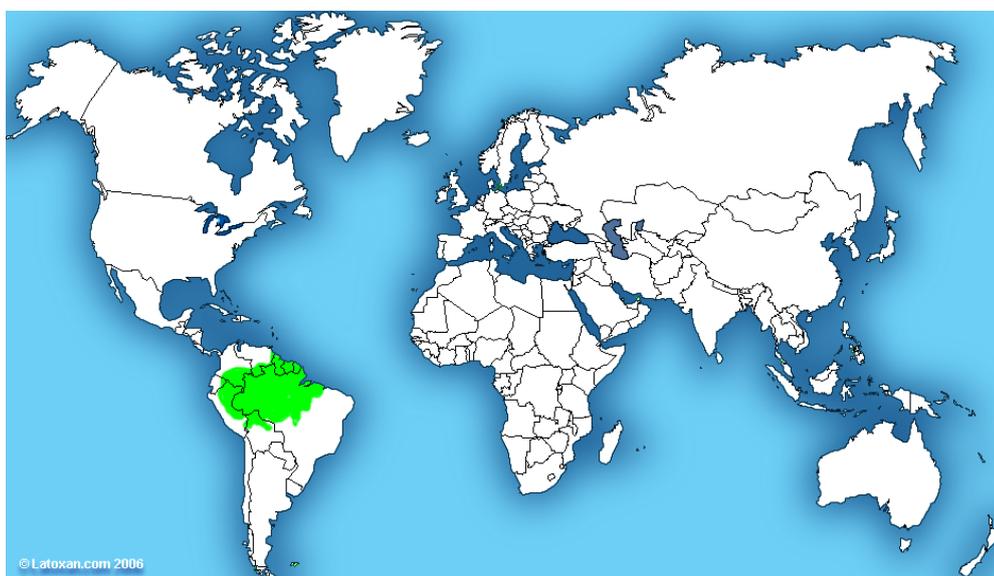


Figura 1. Mapa mostrando localização geográfica dos espécimes de *Bothrops atrox*. Toda extensão amazônica brasileira e nos países Bolívia, Perú, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname e Guiana Francesa (LATOXAN, 2006)

Atualmente o único método de tratamento empregado para acidentes causados por *Bothrops* incide na administração de soro antiofídico ou poliespecífico (BRASIL, 2003). A dose/quantidade de soro antiveneno administrada ao paciente varia conforme a gravidade do episódio, sendo classificados em leve, moderado e grave, de acordo com as manifestações clínicas (CARDOSO et al., 1993). Este tratamento neutraliza eficientemente os efeitos sistêmicos observados, porém pouca neutralização é observada sobre os efeitos locais (GUTIÉRREZ et al., 1981), devido ao rápido desenvolvimento da lesão.



Figura 2. Imagem das serpentes *B. atrox* Adulta, Jovem e Filhote, respectivamente. Animais dos quais foram coletados venenos para os experimentos deste trabalho. A escala apresentada nas imagens tem 15cm. (fonte das fotos: Kayena Delaix Zaqueo (A, J) / Antonio Coutinho Neto (F) - CEBio).

1.2. Venenos de serpentes: um produto biológico especial

Os venenos de serpentes são compostos por diversas toxinas, variam na sua composição bioquímica e perfil farmacológico, sendo responsáveis pelos vários efeitos biológicos apresentados durante o envenenamento, são consequências da presença de componentes adquiridos durante diversas fases evolutivas, o que garantiu uma mistura heterogênea de substâncias de natureza protéica e não-protéica bastante tóxica e eficaz. Os estudos venômicos (proteoma e genoma de venenos) têm permitido o isolamento de proteínas e peptídeos, a fim de caracterizar melhor suas atividades enzimáticas e biológicas, além de elucidar suas estruturas através dos métodos disponíveis. A variação dos compostos ocorre não só entre espécies diferentes, mas também, dentro de uma única espécie e em serpentes de diferentes idades (GUTIÉRREZ et al., 1980; MINTON; WEINSTEIN, 1986; MEIER, 1986; CHIPPAUX et al., 1991; TAN et al., 1993; DALTRY et al., 1996; CAVINATO et al., 1998; KOH et al., 2006).

Os venenos animais evoluíram originando-se um amplo grupo de toxinas peptídicas, para captura da presa e defesa. Contendo componentes direcionados para imobilização e morte de suas presas bem como para facilitar o processo de digestão (HIDER et al., 1991). Cerca de 90 a 95% do peso seco dos venenos de serpentes consiste de proteínas, peptídeos e aminoácidos livres, tanto as frações protéicas quanto as não-protéicas são biologicamente ativas. Os componentes não proteicos podem ser divididos em orgânicos (nucleotídeos, carboidratos, lipídios e aminas biogênicas) e inorgânicos (cátions e ânions) (VARANDA;

GIANNINI, 1999). Essas propriedades revelam os componentes do veneno como modelos de ferramentas biológicas altamente importantes para o estudo dos seus receptores alvo cognatos, muitos dos quais desempenham importantes funções fisiológicas ou estão associados a patologias específicas. Assim, a descoberta de moléculas em venenos com atividade seletiva contra estes receptores representa uma abordagem similar para a busca de novas drogas. Uma parte desses peptídeos tem sido usada *in vivo* para estudos de comprovação de eficácia terapêutica, sendo submetidos a diversos ensaios pré-clínicos ou clínicos no intuito de desenvolver tratamentos para dor, diabetes, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares (LEWIS; GARCIA, 2003; VETTER et al., 2011).

A maioria dos venenos compreende uma mistura de proteínas e peptídeos altamente complexa, geralmente com atividades farmacológicas diversas e seletivas, através da interação com alvos moleculares altamente específicos (SHAW, 2005; BOGIN, 2005). Diante desta diversidade, os polipeptídeos de venenos parecem ter evoluído a partir de um número pequeno de estruturas que são particularmente bem ajustadas para atender problemas cruciais de potência e estabilidade. É esta biodiversidade que faz dos polipeptídeos de venenos uma fonte única de precursores e modelos estruturais, dos quais novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos (MARKLAND, 1998; FRY, 1999; LEWIS; GARCIA, 2003). De modo geral os venenos são constituídos de neurotoxinas, cardiotoxinas, citotoxinas, miotoxinas e fatores que alteram a hemostase (incluindo as hemorraginas) (MENDEZ; RIET-CORREA, 1995). Nem todas as proteínas listadas estão presentes qualitativamente no veneno de diferentes espécies e podem variar bastante no veneno de indivíduos da mesma espécie devido a fatores como distribuição geográfica, sazonalidade, habitat, dieta, idade, dimorfismo sexual, interespecífico e intraespecífico (CHIPPAUX et al., 1991; FURTADO et al., 1991). Portanto, nos tratamentos de acidentes ofídicos o conhecimento das variações dos venenos de serpentes é de fundamental relevância para a produção de antivenenos com especificidade e maior eficácia (CHIPPAUX et al., 1991).

A indústria farmacêutica tem reconhecido o enorme potencial inerente a estes peptídeos do veneno e começou a explorar a seletividade e fina sensibilidade ajustada pela evolução (BOGIN, 2005). É este tipo de “arma” de precisão e otimização da estrutura para a função que torna essas moléculas de venenos animais intrigantes para os cientistas, tanto em termos de descoberta de novas funções até a identificação de novos alvos moleculares (SHAW, 2005). Devido ao seu alto grau de especificidade, as toxinas do veneno têm sido cada vez mais usadas como modelos no desenvolvimento de protótipos de fármacos (FERNANDEZ; NESHICH; CAMARGO 2004). Alguns peptídeos biologicamente ativos isolados de venenos

de serpentes podem apresentar de modo geral neurotoxicidade (FRANCISCHETTI et al., 1997; FRY; WUSTER, 2004), cardiotoxicidade (SATORA et al., 2003; TSETLIN; HUCHO, 2004) e inibição da atividade plaquetária (FRY; WUSTER, 2004; SOARES et al., 2005). Um dos exemplos mais bem sucedidos é o Captopril[®], um medicamento anti-hipertensivo derivado de um peptídeo potencializador de bradicinina (BPP), isolado de veneno de *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965; SMITH; VANE, 2003). A família BPP é composta por uma classe de inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA) com diferentes tamanhos moleculares (5-14 resíduos), encontrados em venenos produzidos por serpentes, escorpiões, aranhas e anfíbios (ESCOUBAS et al., 2008). Geralmente, os BPPs têm um resíduo conservado de piroglutamato N-terminal (Z) e dois resíduos consecutivos de prolina na região C-terminal (IANZER et al., 2004; MENIN et al., 2008).

Neste trabalho, investigou-se a atividade de polipeptídeos e peptídeos do veneno da *Bothrops atrox*, serpente predominante na região Amazônica, sendo a principal causadora de acidentes ofídicos graves na América do Sul (LÓPEZ-LOZANO et al., 2002; WARRELL et al., 2004), observando-se a variação quantitativa e qualitativa no perfil molecular dos venenos avaliados.

1.2.1 Classes Proteicas presentes nos venenos do gênero *Bothrops*

A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* contém inúmeras substâncias com estruturas complexas e simples, cuja características e proporção individual variam com a espécie (VARANDA; GIANNINI, 1999), as classes proteicas representam cerca de 90% do peso seco dos componentes orgânicos (BON, 1997), são divididas em metaloproteínas, serinoproteínas, fosfolipases A₂, lectinas, desintegrinas, fatores de crescimento de nervo, fatores de crescimento vascular, peptídeos potenciadores de bradicinina e incluem ainda carboidratos, fosfolipídios e aminas biogênicas (VARANDA; GIANNINI, 1999). Contendo diversas proteínas de interesse, como, enzimas procoagulantes, coagulantes, anticoagulantes, fibrinolíticas, agonistas e antagonistas plaquetários e hemorrágicas (MORITA, 2004). Principalmente na família Viperidae, apresentam abundantes enzimas proteolíticas, que podem ser divididas em dois grupos: metaloproteases e serinoproteases. Caracterizam-se principalmente por causar inflamação aguda, necrose e alterações no sistema hemostático, plenamente ativas, essas enzimas comprometem o sistema hemostático por uma variedade de mecanismos (YONG-HONG, 2003; MORITA, 2004). Também podem ser classificadas de

acordo com o sítio de clivagem das cadeias α ou β do fibrinogênio, em α - ou β -fibrinogenases (BRAUD et al., 2000; MATSUI et al., 2000)

Metaloproteases (SVMPs)

As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) compreendem uma subfamília de enzimas zinco-dependentes de massa molecular variável responsáveis pela mionecrose no local da picada, hemorragias e reações inflamatórias (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989). As SVMPs foram reclassificadas, de acordo com FOX E SERRANO (2008), a classe PI com cerca de 24kDa de massa molecular, foi alterada para PIa, que possuem somente o domínio metaloprotease HEXXHXXGXXH; a classe PII com cerca de 35 kDa, foi subdividida em a, b, c, d, e e; a classe PII possui além do domínio metaloprotease, o domínio desintegrina, a PIIa possui o domínio desintegrina livre, a classe PIIb possui o domínio desintegrina como parte da estrutura da proteína, a classe PIIc é a forma dimérica da PIIb, a classe PIIId representa um precursor de que libera desintegrinas homodiméricas e a PIIe compreende metaloproteases contendo domínio heterodimérico desintegrina. A classe PIII com cerca de 55 kDa, possui além destes dois domínios, o domínio rico em cisteína, que pode ser subdividido em quatro classes, a PIIIa, cujo domínio desintegrina-like e o rico em cisteína não são processados pela proteinase, fazendo parte dela, já na PIIIb, estes domínios são processados e considerados livres, a classe PIIIc é a forma dimérica da PIIIa e a PIIId é a classe que compreende as antigas PIV com cerca de 95kDa, adicionadas de dois domínios lectina-like ligados por pontes de dissulfeto (MACKESSY, 2009). Exemplos de SVMPs isoladas e caracterizadas nos gêneros *Bothrops*, pertencendo às diferentes classes. Classe PI foram isoladas a Neuwiedase de *Bothrops neuwiedi* (RODRIGUES et al., 2000), BaPI (GUTIERREZ et al., 2005) e BH2 (BORKOW et al., 1993) de *Bothrops asper*, BlaH1 de *Bothrops lanceolatus* (STROKA et al., 2005), B-JussuMPII de *Bothrops jararacussu* (MARCUSI et al., 2007), Bothrojaractivase de *Bothrops jararaca* (BERGER et al., 2008), Atroxlysin-I de *Bothrops atrox* peruana (Jergón) (SANCHEZ et al., 2010) e do gênero *Crotalus*, as metaloproteases Ht- a, c, d, e (BJARNASSON E FOX, 1994). Classe PII a B-JussuMP-I de *Bothrops jararacussu* (MAZZI et al., 2006). Classe PIII foram isoladas a Balteragina de *Bothrops alternatus* (GAY et al., 2005), Jararhagina de *Bothrops jararaca* (PAINE et al., 1992), Bothropasina de *Bothrops jararaca* (MANDELBAUM et al., 1982), BaH4 de *Bothrops asper* (FRANCESCHI et al., 2000), Basparina-A de *Bothrops asper* (LORÍA et al., 2003). Algumas SVMPs não apresentam atividade hemorrágica, sendo classificadas como não-hemorrágicas, podem ser destacadas a Bmoo α -I de *Bothrops moojeni*

(BERNARDES et al., 2008), Neuwiedase de *Bothrops neuwiedi* (RODRIGUES et al., 2000), Berythraactivase de *Bothrops erythromelas* (SILVA et al., 2003) e Basparina-A de *Bothrops asper* (LORÍA et al., 2003).

Serinoproteases

As serinoproteases são encontradas em microrganismos, plantas e diversos animais e abundantes nos venenos de serpentes principalmente na família Viperidae, onde constituem aproximadamente 20% do total de proteínas contidas no veneno. Na sua composição apresentam peso molecular aproximadamente de 35 kDa que contém 12 resíduos de cisteína e quantidades variáveis de sítios de glicosilação. São enzimas que apresentam diversas ações no organismo dos seres vivos, em algumas vias de sinalização, diferenciação e desenvolvimento celular e participação da cascata de coagulação. Em viperídeos, as serinoproteases atuam como enzimas similares à tripsina como auxiliar no processo de digestão de proteínas da dieta alimentar e nos elapídeos terrestres agem como proteínas do tipo Fator X. As serinoproteases atuam sobre os componentes de degradação e ativação sanguíneos que estão envolvidos na coagulação e na fibrinólise, ativando o sistema calicreína/cinina ou afetando a agregação plaquetária (HUNG; CHIOU, 2001; KINI, 2005; FOX; SERRANO, 2009). No veneno botrópico são caracterizadas como enzimas que tem atividade do tipo trombina pela ativação dos componentes sanguíneos envolvidos no processo de coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária, que afetam a cascata da coagulação. Apresentam a tríade catalítica como propriedade estrutural que é altamente conservada (Ser₁₉₅, His₅₇ e Asp₁₀₂), que as classificam como serinoproteases (BRAUD et al., 2000; SERRANO; MAROUM, 2005). A serina é especificamente inativada com os fluorfosfato e fluorsulfatos orgânicos tais como o DFP e o PMSF. Estes inibidores reagem somente com a serina do sítio ativo formando um complexo inativo, diisopropilfosforil-enzima, que é estável (FERSHT, 1985).

Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As PLA₂ são enzimas que ocorrem amplamente na natureza em ambas as formas, intra e extracelular. Responsáveis por catalisar a hidrólise de glicerofosfolipídeos formando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, relacionadas à produção de derivados do ácido aracônico. São encontradas em mamíferos exercem papel importante na fertilização, proliferação celular, contração do músculo liso, doenças de hipersensibilidade e inflamação crônica. São também importantes nas funções celulares hidrolizam fosfolipídeos de membrana, gerando precursores de mensageiros como prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e outros importantes

mediadores de fenômenos fisiológicos envolvidos, principalmente, em processos inflamatórios e homeostase da membrana incluindo a manutenção dos “pools” de fosfolípidos celular e reparo da membrana através de deacilação e reacilação (OKA; ARITA, 1991; DENNIS, 1994; da SILVA-GIOTTO et al., 1998; SIX; DENNIS, 2000; KINI, 2003).

Desintegrinas

As desintegrinas são proteínas de baixo peso molecular (5 a 9 kDa), ricas em pontes dissulfeto, derivados derivados de venenos de serpentes, que contem uma sequencia formada por arginina, glicina e ácido aspártico (Arg-Gly-Asp) caracterizando seu sítio ativo, que interagem com integrinas na superfícies da célula (DENINIS et al., 1990; GOULD et al., 1990; NIEWIAROWSKI et al. 1994). As desintegrinas clássicas se ligam através desta sequencia as integrinas (receptores da superfície celular), como exemplo temos a jarastatina encontrada no veneno de *Bothrops jararaca* e insularina no veneno de *Bothrops insularis*. Entre as principais desintegrinas já identificadas nos venenos bothrópicos, encontra-se a jararagina-C, uma proteína de 28 kDa que corresponde aos domínios desintegrina e rico em cisteína da jararagina, uma metaloproteinase isolada de *Bothrops jararaca* (GARCÍA SÁNCHEZ, 2004). Esta desintegrina, que possui a capacidade de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e por adenosina difosfato (SILVA et al., 2003) está constituída por ácido glutâmico, cisteína e ácido aspártico (Glu-Cys-Asp) (JUNQUEIRA, 2005).

L-aminoácido oxidases (LAAOs)

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um "-cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia, apresentam diversas atividades biológicas como: agregação de plaquetas, indução de hemorragia, edema, citotoxicidade e atividade anti-HIV (DU, CLEMETSON, 2002; ZHANG et al., 2003). São enzimas largamente distribuídas em diferentes microrganismos tais como bactérias, fungos, algas verdes e venenos de serpentes. Nestes, supõe-se que sejam toxinas, ainda que seu modo de ação não esteja esclarecido (STABELI et al., 2004).

Lectinas

As famílias ofídicas de modo geral apresentam em suas peçonhas as lectinas do tipo C símile. Algumas lectinas de veneno, assim como as lectinas de plantas, são capazes de se ligar

a carboidratos (BRINKHOUS et al., 1983). Entretanto, uma parte dessas moléculas parecem ter perdido a propriedade de ligar-se a carboidratos sendo denominadas *lectin-like*, por conservarem características estruturais em comum com as “verdadeiras” lectinas. São dependentes de cálcio e são divididas em dois grupos: grupo I – domínio completo e grupo II – domínio incompleto de reconhecimento de carboidratos, com aproximadamente 130 aa por subunidades e massa de 30 kDa. Apresenta grande número de diferentes lectinas e uma quantidade ainda maior de subunidades em um mesmo veneno (ZINGALI et al., 1993; CASTRO et al., 1998).

Fatores de Crescimento (svNGF e svVEGF)

Os fatores de crescimento presentes em venenos são conhecidos há tempos, dentre eles os mais observados são os fatores de crescimento de nervos conhecidos como NGF (*Nerve Growth Factor*) e fatores de crescimento de vasos endoteliais conhecidos como VEGFs (*Vascular Endothelial Growth Factor*), variando a quantidade presente no veneno, sendo os VEGFs presentes em maior quantidade (JUNQUEIRA-de-AZEVEDO et al., 2001). Embora não sejam majoritários, diversas atividades biológicas destas moléculas já foram descritas (KOSTIZA et al., 1996; YAMAZAKI; MORITA, 2006). Os membros da família svNGFs estão classificados em 4 grupos conforme seu arranjo aligomérico: I- formas dimericas não covalentes, com massa molecular variando de 13 a 25 kDa por subunidade; II-formas glicosiladas e de alta massa molecular de aproximadamente 35 kDa; III- formas diméricas, covalentes ligadas, isoladas dos venenos dos venenos de *Bungarus multicinctus* e *Bitis arietans* e IV- formas em que uma das subunidades apresenta atividade arginil-estearase, seu papel fisiológico não está bem esclarecido (KOTIZA; MEIER, 1996;).

Os VEGFs são proteínas diméricas que se ligam a receptores do tipo tirosina-quinase, envolvidos em vários processos de neovascularização como vasculogênese e angiogênese (TAKHASHI et al., 2004; YAMAZAKI; MORITA, 2006). O primeiro relato sobre moléculas semelhantes aos VEGF em venenos de serpentes (svVEGF) foi relatado no veneno da serpente *Vipera aspis* por Komori e Sugihara (1990b), eles verificaram uma atividade hipotensora da molécula que recebeu a denominação de *Hipotensive Factor* (HF). Posteriormente sua estrutura primária foi determinada, notou-se grande similaridade com proteínas da família dos VEGFs humanos (KOMORI et al., 1999). Em 2001 quando isolados da serpente *Bothrops insularis*, através do cDNA de suas glândulas, Junqueira-de-Azevedo e colaboradores identificaram uma forma ativa de svVEGF capaz de promover um aumento da permeabilidade vascular. Os svVEGFs funcionam como dímeros e cada cadeia compreende aproximadamente

de 110 a 122 resíduos de aminoácidos. O motivo de cisteína, característico da família de proteínas VEGF, é completamente conservada em svVEGFs e a identidade da sequência com VEGF165 humano é de próximo de 50%. svVEGFs podem contribuir para o aumento da toxicidade no envenenamento, mas apresentam características biológicas individuais refletindo divergências na classificação da serpente hospedeira (GASMI et al., 2002; TAKASHI et al., 2004; TAKHASHI; SHIBUYA, 2005)

Proteínas Secretadas Ricas em Cisteínas (CRISPs – *Cysteine Rich Secretary Proteins*)

Venenos de serpente com proteínas secretadas rica em cisteína (CRISPs) são proteínas de 23-26 kDa com um elevado teor de resíduos de cisteína (16) formando oito pontes dissulfeto. CRISPs são comuns em venenos de serpentes e têm sido detectados em transcriptômica (JUNQUEIRA-de-AZEVEDO et al., 2002; VALENTE, et al., 2009; NEIVA et al., 2009) e proteômica (CALVETE et al., 2009b; GUTIERREZ et al., 2007; VALENTE, et al., 2009, NÚÑEZ et al., 2009; ALAPE-GIRON et al.; 2009) estudos de venenos *Bothrops*, onde conta para 0,5-2% e 0-3,6% de genes de Venenos com toxinas, respectivamente. De acordo com esses estudos, foram detectados cinco *Expressed Sequence Tag* (ESTs), com a proteína (0,4% de toxina transcrita) para CRISP em glândula de veneno de *B. alternatus*. Embora o papel de veneno batatas fritas permanece mal compreendido, vários membros desta família quadra de uma variedade de canais iônicos, incluindo canais de Ca^{2+} tipo L, canais iônicos cíclicos de nucleotídeo-dependentes, os canais de voltagem ativado K^+ (1.3Kv), de alta condutância Ca^{2+} , canais de K^+ ativado (BCA) e o rianodina sensível, do canal de Ca^{2+} intracelular. Peichoto e colaboradores (PEICHOTO et al., 2009) têm mostrado recentemente que a CRISP, a partir do veneno da América do Sul *colubrid Philodryas patagoniensi* causa a mionecrose. Uma vez que a mionecrose é uma importante resposta local pelo envenenamento por *Bothrops spp.*, incluindo *B. alternatus*, é possível que as CRISPs possam contribuir para esta atividade.

Peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPPs) e Peptídeos Natriuréticos tipo-C

O estudo dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento e a caracterização molecular de toxinas do veneno da serpente *B. jararaca* resultou em muitas contribuições científicas em estudos dos antihipertensivos ou BPPs e dos peptídeos natriuréticos do tipo-C (IANZER et al., 2004).

Os BPPs são ricos em resíduos de prolina, possuem um ácido piroglutâmico na porção N-terminal e geralmente uma sequência Ile-Pro-Pro, inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina I (ECA I) e angiotensina II (ECA II) (Ferreira 1965, 1970, 1996).

Os peptídeos natriuréticos do tipo-C apresentam estrutura similar a peptídeos natriuréticos do tipo A e B de mamíferos (que são hormônios peptídicos liberados por células do tecido cardíaco em resposta a eventos de sobrecarga cardíaca) e atuam sobre o tônus vascular, mediando processos de vasodilatação (LEE; BURNETT-JR, 2007). O precursor dos BPPs é também precursor do peptídeo natriurético do tipo C (CNP) que é expresso em regiões de controle neuroendócrino no cérebro da serpente, identificaram e clonaram um precursor do peptídeo natriurético tipo C do cérebro da serpente *B. jararaca* (HAYASHI et al., 2003). Várias dessas moléculas foram descritas em serpentes como *B. jararaca* e *B. insularis*, servindo como modelo para o desenho de uma nova geração de drogas com potencial no tratamento da hipertensão (FERNANDEZ et al., 2004).

1.3. Peptídeos potencializadores da bradicinina (BPPs – *Bradykinin Potentiating Peptides*)

Os Peptídeos de venenos de serpentes são fontes biológicas muito ricas, mas até agora pouco explorados principalmente para a descoberta de novas drogas (GEORGIEVA et al., 2008). Alguns peptídeos do veneno têm semelhanças estruturais e funcionais aos seus homólogos humanos (CALVETE et al., 2009). Eles se ligam a alvos vitais que influenciam os processos fisiológicos, como a coagulação do sangue e hemostasia nos sistemas cardiovascular e nervoso (GEORGIEVA et al., 2008). Considerando a especificidade de alvo elevada, tamanho pequeno, a estabilidade estrutural e a relativa facilidade de síntese química, os peptídeos tornam-se alternativas promissoras aos medicamentos contemporâneos. Os componentes de veneno podem ser usados diretamente ou como protótipos de drogas para o tratamento de doenças que não respondem a terapias correntemente disponíveis (GEORGIEVA et al., 2008; CALVETE et al., 2009). Alguns destes compostos já encontraram aplicação pré-clínica ou clínica para o tratamento da hipertensão, doenças cardiovasculares, esclerose múltipla, diabetes e dor (LEWIS; GARCIA 2003). Um exemplo bem conhecido é o uso do peptídeo potencializador de bradicinina (BPP), isolado a partir do veneno de *Bothrops jararaca*, que serviu como protótipo para o primeiro inibidor, oralmente ativo da enzima de conversão da angiotensina (ECA), BPP com o nome captopril® (NG; VANE 1970, ONDETTI et al., 1971; CUSHMAN; ONDETTI 1999), os peptídeos

natriuréticos (PN) e as sarafotoxinas (SRTXs) também exercem efeitos profundos sobre o sistema cardiovascular (HODGSON; ISBISTER 2009). Desde a descoberta do captopril, vários compostos relacionados são descritos, tais como zofenopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, ramipril, tandolapril, perindopril, espirapril, rentiapril, alacepril, benzapril, quinapril, moexipril e cilazapril foram desenvolvidos como inibidores da ECA em função da estrutura base do captopril para o desenho de drogas e são usados com sucesso como fármacos anti-hipertensivos (PATCHETT et al., 1980; PETRILLO et al., 1983; CUSHMAN; ONDETTI, 1999; MUNAWAR et al., 2011). Os BPPs são conhecidos por inibir a ECA, que são enzimas responsáveis pela inativação da conversão da angiotensina I para o potente vasoconstritor angiotensina II, bem como para a degradação da bradicinina. Portanto, BPPs impedem o efeito hipertensivo da angiotensina II e potenciam o efeito hipotensor da bradicinina na circulação. Entretanto, é interessante notar que nem todos os BPPs são bons inibidores de ECA (HAYASHI; CAMARGO, 2005).

Os BPPs foram encontrados em muitos venenos de serpentes das espécies: *Bothrops* (FERREIRA; ROCHA e SILVA, 1965; CINTRA et al., 1990; MURAYAMA et al., 1997; FERREIRA et al., 1998; HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2004; HAYASHI; CAMARGO, 2005; NUNEZ et al., 2009; COUTINHO-NETO et al., 2013), *Agkistrodon* (KATO; SUZUKI, 1970; TOMINAGA; STEWART, 1975; CHI et al., 1985; YANOSHITA et al., 1999; MURAYAMA et al., 2000), *Bitis* (FRANCISCHETTI et al., 2004; CALVETE et al., 2007), *Crotalus* (GRAHAM et al., 2005), *Lachesis* (SOARES et al., 2005), *Naja* (EL-SAADANI; EL-SAYED, 2003), *Trimeresurus* (HIGUCHI et al., 1999; JIA et al., 2003) e gêneros *Vipera* (KOMORI; SUGIHARA, 1990a). Além disso, foram descritos BPPs de escorpião (FERREIRA et al., 1993; MEKI et al., 1995; ZENG et al., 2000) e venenos de aranha (FERREIRA et al., 1996), bem como a partir de secreções da pele da rã *Phyllomedusa hypochondrialis* (CONCEIÇÃO et al., 2006).

A análise de peptídeos do veneno de serpente, demonstrou especificidade na subfamília (Viperinae/Crotalinae) na composição do peptidoma do veneno de serpentes da família Viperidae. Em contraste com os venenos Crotalinae, o peptidoma do veneno de serpentes Viperinae contém inibidores do tipo *Kunitz* (inibidor de tripsina). A fosforilação de um resíduo de serina nos BPPs, demonstrada pela primeira vez no caso dos peptídeos do veneno de *Bothrops jararacussu*, pode desempenhar um papel importante na regulação das interações BPP-ECA. Além disso, os venenos de *Bothrops jararacussu* e *Vipera ammodytes meridionalis* são ricas fontes de novos inibidores da ECA. Há uma homologia entre BPPs do

veneno de uma serpente Viperidae e PNs do veneno de cobras Elapidae (MUNAWAR et al., 2011).

Estudos de estrutura-função de relacionamento realizadas em BPPs provenientes das cascavéis *Crotalus durissus terrificus* têm mostrado que a presença de um ácido piroglutâmico (Pyr) e um resíduo de prolina, em cada extremidade do peptídeo não foi suficiente para assegurar a sua atividade característica biológica (GOMES et al., 2007). Isto sugere ainda que BPPs poderiam ser uma ampla família de inibidores de enzimas como se pensava inicialmente (MENIN et al., 2008). Há um padrão estrutural geral para BPPs maiores do que nove aminoácidos: EX-nPXPXIPP. Os BPPs mais curtos, sem o IPP tri-peptídeo, são mais suscetíveis a enzimas de hidrólise (FERREIRA; BARTELT; GREENE 1970; FREER; STEWART 1971). Além disso, de acordo com dados da literatura, que a partir desta sequência "curta", é analisada a sequência C-terminal PXIPP que é crucial para a inibição da enzima alvo, a ECA (CUSHMAN et al., 1973; IANZER et al., 2004).

A evolução molecular de cada toxina de veneno parece ter sido necessária para o desempenho toxicológico do veneno, que depende do efeito sinérgico de todas as toxinas resultantes na sinfonia de envenenamento caracterizado pela ruptura da homeostase sistêmica da presa (LEWIS; GARCIA, 2003). Por outro lado, demonstrou-se que a concepção estrutural de diversas toxinas conhecidas, evoluídas a partir de moléculas endógenas do animal venenoso (FRY et al., 2006) a partir de derivados que são claramente motivos arquitetônicos distintos, de modo a adaptar-se à diferentes alvos, tais como os canais iônicos, enzimas e receptores, definindo assim uma estratégia especial no envenenamento (LEWIS; GARCIA, 2003). A biodiversidade de toxinas animais, em particular os peptídeos de venenos tornam-se relativas fontes únicas de oportunidades e modelos estruturais, a partir do qual novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos. Um exemplo clássico é o captopril® (CAMARGO et al., 2012).

Como descrito, o veneno de *Bothrops jararaca* (Bj) age em alvos no sistema cardiovascular da presa, não só por ação de serino-proteases semelhantes a calicreína, mas também pelo efeito de BPPs. Especificamente, o veneno de *B. jararaca* apresenta várias BPPs (FERREIRA; BARTELT; GREENE 1970; ONDETTI; CUSHMAN 1981; MURAYAMA et al., 1997; HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2004; ZELANIS et al., 2010), no entanto, não é totalmente conhecido se os efeitos cardiovasculares dos diferentes peptídeos ricos em prolina são exclusivamente devido à inibição da ECA. A ECA tem um papel fundamental na fisiologia cardiovascular, porque tem uma dupla ação, o bloqueio da liberação do potente vasoconstritor angiotensina II, e inativa o peptídeo hipotensor bradicinina (ONDETTI e

CUSHMAN, 1981). Essas considerações, com foco para os estudos de biologia molecular dos oligopeptídeos ricos em prolina, tem o objetivo de relacionar a estrutura de seu precursor com as conhecidas proteínas/peptídeos participantes da fisiologia cardiocirculatória (CAMARGO et al., 2012).

Curiosamente, a origem genética destes peptídeos revelou as sequências de sete oligopeptídeos ricos em prolina expressos também no interior da porção N-terminal do peptídeo natriurético tipo-C da proteína precursora na glândula de veneno da Bj (MURAYAMA et al., 1997) e no SNC (HAYASHI et al., 2003). Os BPPs contidos no precursor cerebral da Bj são fortes inibidores *in vitro* das ECAs, mostrando valores de Ki (constante de inibição) na gama nanomolar, e também potenciadores dos efeitos Bk como observado em bioensaios do músculo liso, e em experiências *in vivo* (HAYASHI et al., 2003). Nos estudos de hibridação *in situ* revelou-se a presença de mRNAs de BPPs de Bj precursoras em regiões distintas do cérebro de Bj. As atividades bioquímicas e cardiovascular dos BPPs do cérebro de Bj (HAYASHI; CAMARGO, 2005) e peptídeo natriurético tipo-C (RUBATTU et al., 2008), a sua presença dentro do mesmo precursor do regulador neuroendócrino do peptídeo natriurético tipo-C, e a sua expressão em regiões do cérebro da serpente, em correlação com as funções neuroendócrinas, sugerem fortemente que estes peptídeos pertençam a uma nova classe de peptídeos bioativos endógenos (HAYASHI; CAMARGO, 2005). A ação inibitória destes peptídeos vasoativos sobre a ECA é responsável em grande parte pela frequente hipotensão que o envenenamento botrópico tem como característica, inibindo a geração do peptídeo angiotensina II, potente vaso contritor e a inativação do peptídeo hipotensor, conhecido como bradicinina.

1.4. Tecnologia a serviço da Peptidômica de Venenos: Espectrometria de Massa

A análise proteômica, definida como sendo o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar (quali e quantitativamente) um proteoma, trata-se de uma área interdisciplinar da ciência, a qual agrega principalmente química, biologia e informática (TYERS; MANN, 2003; AEBERSOLD; MANN, 2003). Na separação de um aminoácido (aa) da sequência peptídica padrão ou universal utilizam-se reações químicas específicas a partir de grupos amino terminal seguido pelo isolamento e análise de fragmentos de aa's (ENG et al., 1994). Para tal fim, dois tipos de resultados são usados. O primeiro usa a informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint* – PMF), enquanto o segundo faz uso de resultados obtidos pela fragmentação de

peptídeos individuais previamente detectados (SADYGOV et al., 2004). Muitas técnicas, no entanto, são limitadas (AMOTT et al., 1993). Com eficácia limitada na química do processo impedem a determinação sequencial completa de AA's de uma proteína a partir de quantidades pequenas (ENG et al., 1994), por exemplo, a técnica utilizando dodecil sulfato de sódio em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) apresenta um elevado grau de resolução (BUTCHER et al., 2003), mas tem uma precisão de apenas 5% em relação a massa do analito (AMOTT et al., 1993).

Em dias não muito distantes, para sequenciar uma proteína pelo método de degradação de Edman necessitava-se de quantidades consideráveis e moléculas purificadas, uma técnica conhecida e muito utilizada. No entanto, este método falha completamente se a proteína for acetilada em seu grupo amino terminal ou se este for bloqueado, pois esta reação requer grupos aminos terminais livres. A Espectrometria de Massas (MS) substituiu a degradação de Edman, isso porque a técnica de MS é muito mais sensível e pode fragmentar peptídeos em segundos ao invés de horas ou dias. Além disto, a MS não requer proteínas e peptídeos purificados e não apresenta dificuldades na identificação de proteínas modificadas ou bloqueadas (STEEN et al., 2004). A partir das inovações como Espectrometria de Massas com ionização *electrospray* (ESI), os íons são submetidos a uma célula de colisão onde ocorre a dissociação por colisão indutiva (CID), sob estas condições, os fragmentos peptídicos criam características “precursoras” de sequências de aa's específicos (ENG et al., 1994; TABB et al., 2003; SYKA et al., 2004). Com o desenvolvimento das fontes de MALDI e ESI em MS obteve-se a determinação de massa molecular de proteínas com alta precisão, em picomoles e análises de sequências de peptídeos em pequenas quantidades de amostra (AMOTT et al., 1993). Espectrômetros de massas possuem sensibilidade elevada, podem medir a massa de proteínas completas com precisão, mas, no entanto, para realizar o sequenciamento utilizam-se peptídeos, por apresentarem maior sensibilidade a estas moléculas (STEEN et al., 2004).

Esse método de sequenciamento relatado incorpora a modificação química de Edman e a detecção por MALDI-TOF, mas muitas técnicas de MS fazem uso de MS/MS (ENG et al., 1994). Usando uma descrição simplista e abrangente, cabível para a maior parte dos equipamentos comercialmente disponíveis, os peptídeos ionizados são acelerados para uma região do espectrômetro preenchida com um gás inerte (hélio, argônio ou nitrogênio) proporcionando, assim, a colisão entre os peptídeos ionizados e as moléculas do gás inerte. Como resultado, a energia translacional transferida em cada colisão é convertida em energia interna (CANTÚ et al., 2008). As vantagens das técnicas de MS incluem sensibilidade, rapidez e aplicação a misturas complexas. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos, a

MS tem sido destacada não apenas para estudos de estruturas primárias de proteínas, mas também como a tecnologia central para o campo de proteômica. A tecnologia de sequenciamento de peptídeos pode agora rapidamente gerar uma longa lista de proteínas identificadas a partir de praticamente qualquer fonte de material de proteína. Facilitando a identificação de polipeptídios a MS tem sido cada vez mais empregada, muitos pesquisadores agora podem submeter amostras e receber uma lista de proteínas identificadas por MS (STEEN et al., 2004).

1.5. Sequenciamento pelo método *De Novo*

Uma limitação em relação ao sequenciamento *de novo* reside no fato de que a primeira é passível de ser realizada principalmente para identificar peptídeos oriundos de organismos que tiveram seu genoma sequenciado, de modo que todos os peptídeos possíveis sejam conhecidos. Em menor grau, também são acessíveis os proteomas de organismos já submetidos a estudos transcriptômicos, bem como os proteomas de organismos cujos genes possuam grande similaridade aos de organismos com informações genéticas disponíveis (STEEN; MANN, 2004). A fragmentação de peptídeos por espectrometria de massas para a posterior análise de sua sequência de aminoácidos é comumente realizada por meio do processo de dissociação induzida por colisão CID, também referida por alguns autores como dissociação ativada por colisão (*collision activation dissociation* – CAD). Apesar de outras metodologias para a fragmentação de peptídeos, tais como *Electron Capture Dissociation* (ECD); *Electron Transfer Dissociation* (ETD) terem sido desenvolvidas, CID é sem dúvida a mais largamente empregada, além de ser o método mais frequentemente aplicado nos espectrômetros de massas disponíveis (TABB et al., 2003; SYKA et al., 2004; CANTÚ et al., 2008)

A interpretação de espectros MS/MS consiste principalmente em apontar diferenças de massa entre íons de fragmentos abundantes provenientes de clivagens ao longo da cadeia peptídica (PAPAYANNOPOULOS, 1995). A nomenclatura para os íons resultantes das quebras ao longo da cadeia peptídica foi inicialmente proposta por Roepstorff e Fohlman em 1984, posteriormente modificada por Biemann em 1988 (Fig. 4) e complementada por Johnson e colaboradores (1988) de modo a incluir íons resultantes de quebras adicionais nas cadeias laterais. Portanto, essa nomenclatura é baseada no fato de que somente são detectados fragmentos que possuam carga. Se essa carga for retida por um fragmento N-terminal, o íon é denominado **a**, **b** ou **c**. De maneira análoga, se a carga for retida por um fragmento C-

terminal, o íon é denominado x , y ou z . Um algarismo arábico subscrito indica o número de grupamentos R contidos no fragmento (JOHNSON, MARTIN et al., 1987; JOHNSON, MARTIN et al., 1988).

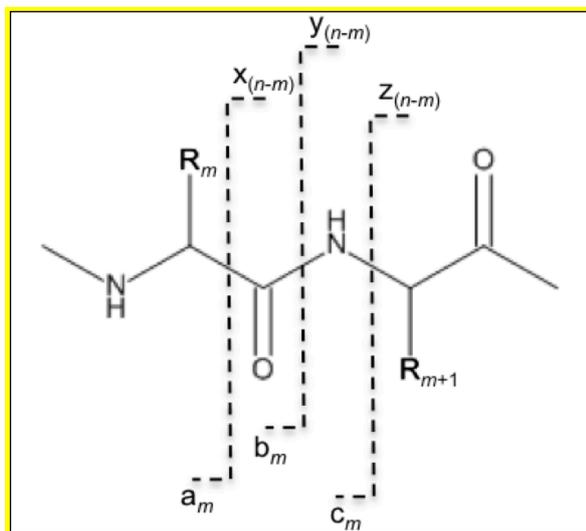


Figura 3. Representação esquemática do sistema de nomenclatura para os íons resultantes da quebra da cadeia de peptídeos. A partir do N-terminal do precursor, os íons são consecutivamente denominados a_m , b_m e c_m , onde m representa o número de grupos R contidos no fragmento. De maneira similar, a partir do C-terminal do precursor, os íons são consecutivamente denominados x_{n-m} , y_{n-m} e z_{n-m} , onde n representa o número total de grupos R (ou de resíduos) do precursor e m representa o número de grupos R contidos no fragmento a , b ou c correspondente, cujas massas auxiliam na dedução do peptídeo (ROEPSTORFF; FOHLMAN, 1984; BIEMANN, 1988; JOHNSON, MARTIN et al., 1988; CANTÚ et al., 2008).

É necessário também mencionar que íons ‘satélite’, originados a partir da perda adicional de NH_3 ou H_2O , também podem ser produzidos. Esses íons são designados, por exemplo, $a_m - NH_3$ ou $y_{(n-m)} - H_2O$. Ademais, a fragmentação amino-terminal e carbóxi-terminal do mesmo aminoácido produz os íons ‘imônios’ ($HN=CH-R$), cuja massa é 27 u menor que a massa de seus respectivos resíduos protonados. Vale notar que caso não seja possível visualizar o imônio de um resíduo em particular, isso não necessariamente significa que o mesmo esteja ausente (PAPAYANNOPOULOS, 1995; STEEN; MANN, 2004).

Na última década, a espectrometria de massa (MS / MS) surgiu como uma tecnologia de escolha para alto rendimento proteômico. A precisão e resolução de espectrômetros de massa são parâmetros fundamentais que traçar uma linha entre o que é possível e o que é impossível em MS / MS com base em proteômica hoje. Instrumentos como os Quadrupolo *Time-of-flight* espectrômetros (*QToF*) de massa são capazes de precisão na gama de umas poucas partes-por-milhões (SIUZDAK 2003). Esforços contínuos para melhorar a resolução de massa recentemente resultaram no desenvolvimento de técnicas de avanço da

transformação de *Fourier* MS, incluindo instrumentos magneto-base de ressonância ciclotron de íon (ICR) e de armadilhas eletrostáticas de transformação de *Fourier* (FT) "Orbitraps", que melhora a resolução de 2 a 3 ordens de grandeza, em comparação com espectrômetros de massa convencionais. Surgimento da espectrometria de massa com precisão anuncia uma nova era em proteômica e torna possível resolver os problemas que antes eram fora do alcance das técnicas tradicionais da MS (MARSHALL e HENDRICKSON, 2002; OLSEN et al., 2005).

Espectrometria de massa de precisão, abre a porta para a análise proteômica melhorada e novos algoritmos. Por exemplo, com a resolução de massa maior, torna-se possível detectar muito mais tipos de fragmentos de íons que estatisticamente seriam normalmente indistinguíveis de ruído com instrumentos *ion-trap* de baixa resolução. Mais importante ainda, a precisão MS ajuda a eliminar problemas que dificultam a análise dos dados de instrumentos de baixa resolução. Ao explorar o fenômeno de peptídeos homeométricos (peptídeos diferentes com conjuntos quase idênticos de picos *b* e *y*) com precisão baixa de dados, limita severamente sequenciamento *de novo*. Com alta precisão de dados, peptídeos homeométricos são extremamente raros, tornando o sequenciamento peptídeo preciso. Houve o desenvolvimento recente de técnicas computacionais que podem resolver o problema de peptídeos homeométricos separando *b* e escadas *y* usando uma combinação de métodos, como a correlação entre MS^2 e MS^3 espectros, ou usando ainda técnicas de fragmentação complementares, como CAD e Berna ECD e Goldberg utilizada numa abordagem de otimização com vista a atingir esta separação. Bandeira e colaboradores (2006) utilizaram pares de espectros (por exemplo, a partir de uma versão modificada e não modificada do mesmo peptídeo) para separar *b* e *y*, nas escalas. (ZHANG et al., 2000; BERN et al, 2005; SAVITSKI et al., 2005; BANDEIRA et al., 2006).

Nesta análise é importante enfatizar que os pares de íons *a/x*, *b/y* e *c/z* serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas menos energéticas, espera-se que a formação do par de fragmentos *-b/-y* seja mais frequente que os demais pares de fragmentos, facilitando muito a interpretação dos espectros (CANTÚ et al., 2008).

Logo, esta ferramenta proporciona a elucidação das sequencias e N-terminais de peptídeos e proteínas isolados e favorece o estudo de venenos de serpentes.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a variação ontogenética da composição química do veneno de serpentes filhotes, jovens e adultas da espécie *Bothrops atrox* da região de Porto Velho-RO e caracterizar bioquimicamente a fração peptídica do veneno desta espécie, na busca de peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs).

2.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil protéico/peptídico dos venenos de *B. atrox* adultas, jovens e filhotes por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC);
- Caracterizar as classes protéicas/peptídicas dos venenos de *B. atrox* adultas, jovens e filhotes por eletroforeses mono e bi-dimensional;
- Avaliar os efeitos tóxicos e biológicos dos venenos brutos das serpentes adultas, jovens e filhotes de *B. atrox* e correlacioná-los com as análises proteômicas;
- Identificação dos peptídeos isolados por espectrometria de massa em MALDI-TOF²;
- Sequenciamento pelo método *De novo* dos peptídeos BPPs isolados dos venenos de *B. atrox*.

3. METODOLOGIAS

O resumo das metodologias estão demonstradas de forma esquemática na figura 4, e serão detalhadas logo em seguida.

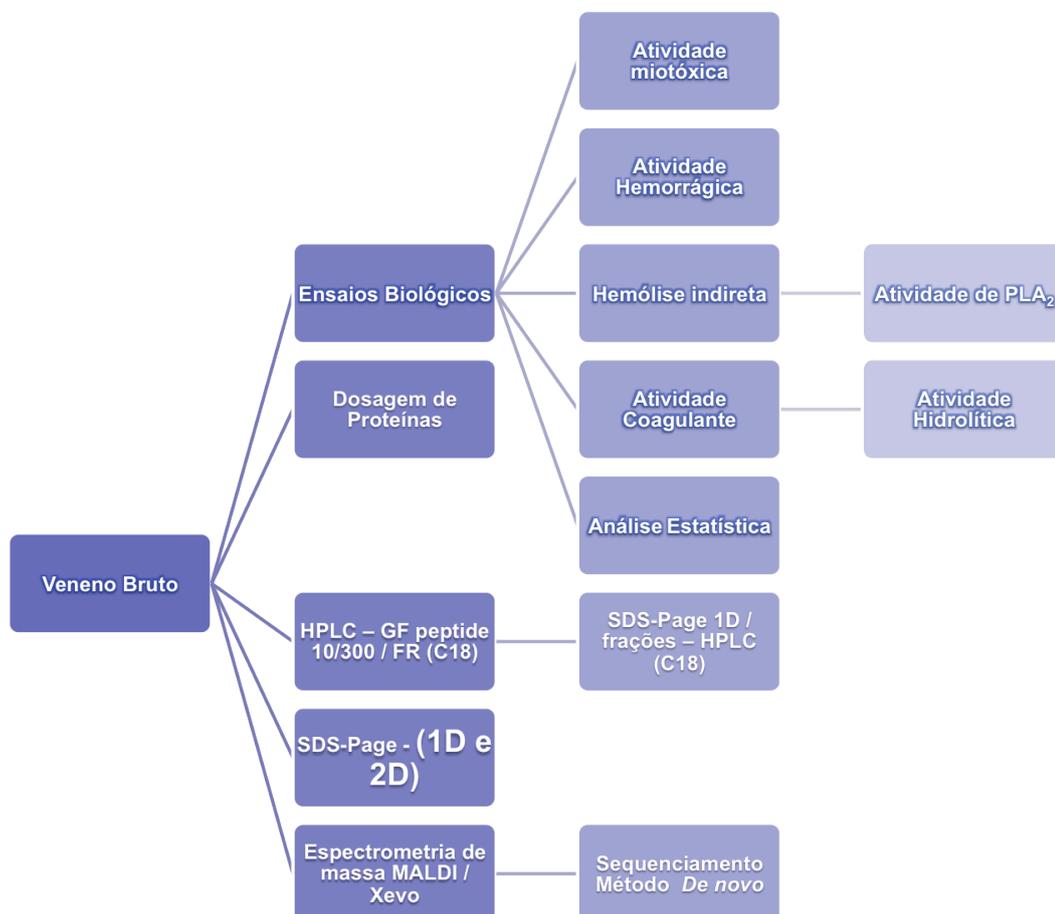


Figura 4. Resumo metodológico do estudo do veneno de *Bothrops atrox* (adulto, jovem e filhote).

3.1. OBTENÇÃO DO VENENO

O veneno bruto da espécie *Bothrops atrox* foi obtido do Serpentário da FIOCRUZ/RO, a partir de amostras coletadas de vários exemplares adultos, jovens e filhotes. Estas espécimes foram oriundas da área abrangida pela Amazônia Ocidental no Planalto Sul-Amazônico, na região de Porto Velho-RO, respectivamente separados, com a licença número 27131-1 do IBAMA e do CGEN – licença número 010627/2011-1. As coletas dos venenos foram realizadas de forma a separar os animais por tamanho/idade. As serpentes foram

classificadas adultas (A = 22 serpentes) quando acima de 65 cm de comprimento (SAZIMA, 2002). Os filhotes (F = 19 serpentes), característicos visualmente por seu pequeno tamanho e cauda clara, as jovens (J = 17 serpentes), ficaram em média com tamanho entre 40 e 50 cm. Os *pools* dos venenos dos espécimes foram obtidos e armazenados seguindo os grupos acima citados, respectivamente. As amostras de venenos foram coletadas por massagem manual da glândula de veneno, em placas de petri/beckers limpos com cobertura plástica, segundo metodologia de extração tradicional, com auxílio de gás carbônico (CO₂) ou gelo seco para a sedação dos animais, estratégia utilizada no Instituto Butantan. Após as extrações, os venenos foram aliquotados e estocados em geladeira a 4°C até o momento de sua utilização.

O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do IPEPATRO/FIOCRUZ-RO (CEUA), em 06 de junho de 2012, sob o número 2012/1, atendendo as normas de cuidados com animais.

3.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas totais presentes nos extratos proteicos das amostras foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976). O método está fundamentado na coloração apresentada pelo *Coomassie Brilliant Blue G-250* (sigma), que pode ser vermelho ou azul. Para as medidas espectrofotométricas, aliquotou-se a amostra em uma cubeta juntamente com reagente de Bradford na proporção de 1:10 (v/v). O reagente de Bradford consiste em uma mistura de azul de *Coomassie G-250* a 0,01% (m/v), 4,75% (v/v) de etanol e 8,5% (v/v) de ácido fosfórico. Após 5 minutos de reação, a forma vermelha é convertida para a forma azul quando o *Coomassie* reage com proteína. Determinou-se a absorvância das amostras em 595 nm, usando espectrofotômetro UV/Vis. Esta reação ocorre em aproximadamente 2 minutos e permanece estável por cerca de uma hora. Deduzida a concentração por comparação com uma curva de calibração feita normalmente com albumina bovina (Sigma).

Utilizando-se a albumina bovina da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, USA) como padrão (2 mg/mL). Para isso, criou-se uma curva analítica de calibração na faixa de concentração entre 0,06125 a 2,0 mg/mL, com o mesmo tampão usado nas diluições das amostras.

Utilizou-se 0,02 mL de veneno bruto de *B. atrox* A, J e F, previamente preparadas em solução de 1 mg/mL de água ultra pura e submetidos a análise de proteína pelo método.

3.3. ENSAIO DE ATIVIDADE MIOTÓXICA

Utilizou-se o método de quantificação de níveis séricos da enzima creatino-cinase (CK), que é liberada após uma lesão muscular (GUTIÉRREZ et al., 1980). Grupos de cinco camundongos machos suíços (28-32 g) foram injetados 50 µL no músculo gastrocnêmio direito (n=5) com veneno bruto de *B. atrox* A, J e F/50 µg em solução fisiológica estéril. Após 3h, o sangue foi coletado via plexo ocular, em tubos capilares heparinizados e centrifugado em centrífuga de micro-hematócrito (Fanem-210iec) por 3 min a 16.099,2xg para a separação do plasma. A quantidade de CK foi então determinada usando 5 µL de plasma incubados durante 2 min a 37 °C, com 0,5 mL de reagente de acordo com o protocolo de CK-NAC cinética da Labtest. A atividade foi expressa em U/L, 1 unidade correspondente para a produção de 1 µmol NADH/minutos (SOARES et al., 2000a;b; 2001a;b). Os venenos foram preparados para apresentarem concentração final de 50 µg em 50µL.

3.4. ENSAIO DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Utilizou-se quatro grupos com cinco camundongos fêmeas Swiss (28-32g), que foram injetados via intradérmica (i.d) no dorso, na dose de 50 µg em 50 µL veneno bruto de *B. atrox* A, J e F dissolvidos em 1 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%). Os controles receberam 50 µL de solução fisiológica em condições idênticas. Duas horas mais tarde, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e as áreas hemorrágicas foram medidas, de acordo com o método de Gutiérrez e colaboradores (1985; 1988a). A atividade hemorrágica foi expressa em milímetros quadrados.

3.5. ENSAIO DE HEMÓLISE INDIRETA

O método descrito por Gutiérrez e colaboradores (1988a;b), modificado de Habermann e HARDT (1972) consiste na coleta de sangue humano com seringa citratada, centrifugação por 10 minutos a 1500 xg, e descarte do plasma. Os eritrócitos são lavados com solução fisiológica salina 0,15 M (0,9%) por 4 vezes. Prepara-se a solução: 0,3 mL de papa de hemácias + 0,3 mL de gema de ovo diluído 1:4 em solução salina 0,15 M + 0,25 mL CaCl₂ 0,01 M. Junta-se a esta a solução de agarose 0,8 % (em 50 mL PBS pH 7,4) e aplica-se em placas de Petri. Faz-se orifícios suficientes na placa, com distância aproximadamente de 3 cm e aplicam-se as amostras. Os resultados são representados pelo raio ou pela área mm² (cm) do

halo de hemólise formado. foi seguido utilizando géis de agarose-hemácias-gema de ovo. A atividade hemolítica indireta foi expressa em milímetros. Foram aplicados 3 μ L nos poços tanto para o controle quanto para as amostras de venenos brutos de *B. atrox* A, J e F, o controle negativo foi solução fisiológica e água deionizada.

3.5.1. ATIVIDADE DE FOSFOLIPASES A₂

A atividade foi avaliada por meio da hidrólise de fosfolipídios sintéticos fluorescentes a partir de 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-il – fosfatidilcolina (NBD-PC) e 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-il – ácido fosfatidico (NBD-PA) como substrato. O ensaio foi realizado em um Espectro fluorofotometro (Shimadzu, RF-5301PC), com comprimentos de onda de excitação e emissão de 460 e 534, respectivamente. A atividade enzimática foi avaliada durante 250 segundos à temperatura ambiente, após a adição de cada substrato (3,3 μ g/mL, concentração final) num meio de reação contendo 50 mM de Tris-HCl com 8 mM de CaCl₂, pH 7,5 e concentrações diferentes de cada um dos venenos de *B. atrox*. A influência do pH foi avaliada por incubação dos venenos de serpentes com soluções tampão de pH diferentes de valores de 3, 5-11 por 5 minutos, então a reação foi iniciada pela adição de substrato, como descrito acima (RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008). Esta atividade foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly da Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói-RJ.

3.6. ENSAIO DE COAGULAÇÃO

O ensaio de coagulação foi realizado utilizando 200 μ L de plasma humano citratado incubados em 100 μ L do “pool” de veneno na concentração de 1,0 mg/mL. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 37°C e o tempo de formação da rede de fibrina foi cronometrado. Para cada amostra de veneno, o teste foi realizado em duplicata, sendo considerada a média dos valores obtidos.

A atividade de coagulação de venenos de *B. atrox* foi determinada usando um coagulômetro modelo *Amelung KC4A* (Labcon, Alemanha) e em um Leitor de Microplacas (Molecular Devices, modelo VersaMax Tunable), com o *software SoftMax Pro 5*. Diferentes concentrações de venenos de *B. atrox* foram misturadas com solução de fibrinogênio bovino (2 mg/mL) ou com plasma humano normal citratado (doados pelo banco de sangue do Hospital Universitário Antônio Pedro, UFF), e a quantidade de veneno capaz de coagular o

fibrinogênio ou plasma em 60 segundos foi denotada como Dose Coagulante Mínima (DCM) (SELISTRE et al., 1990). O veneno de *B. atrox* foi também previamente incubado com benzamidina (5 mM e 10 mM), PMSF (1 mM e 3 mM) ou com EDTA (5 mM e 10 mM) durante 30 min à temperatura ambiente, em seguida, a mistura foi adicionada ao fibrinogênio do plasma e o tempo de coagulação medido. Os experimentos controles foram realizados por incubação de veneno com solução salina, em vez de inibidores. Esta atividade foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. André Fuly e colaboradores da UFF– Niterói –RJ.

3.6.1. ATIVIDADE HIDROLÍTICA SOBRE SUBSTRATO CROMOGÊNICO (PRÓ-COAGULANTE)

A capacidade dos venenos de *B. atrox* para hidrolisar substratos cromogênicos S-2238 (para a enzima trombina-símile) e S-2288 (para serina proteases) (0,5 mM, concentração final), foi testada em um leitor de microplacas *Thermomax* (Molecular Devices, EUA) monitorizada a 405 nm durante 20 minutos a 37 °C. Inibidores (5 e 10 mM de PMSF; 1 e 3 mM de benzamidina) foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com venenos de *B. atrox*, e, em seguida, a reação enzimática foi desencadeada por adição de S-2238 ou S-2288. Os controles foram realizadas por incubação de venenos de *B. atrox* com solução salina (CHOMOGENIX 2000; SANT’ANA et al., 2008). Esta atividade foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. André Fuly da UFF – Niterói –RJ.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos utilizados para análise foram o teste paramétrico ANOVA, para a análise dos resultados dos perfis proteicos, e o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, para análise comparativa dos resultados das atividades coagulantes e caseinolítica. Por fim, o pós teste utilizado foi *Dunn’s* e *Tukey* para identificação dos grupos que apresentaram diferenças significativas, com o auxílio dos programas *GraphPad Instat* (Programs GraphPad Instattm, version 2.01) ou *Origintm* (version 5.0).

As diferenças foram consideradas significativas utilizando-se um erro tipo α igual ou menor que 0,05.

Nos testes de coagulação e atividade da PLA₂, os resultados são expressos como médias \pm SEM obtidos com o número indicado de experiências realizadas. A significância

estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi avaliada usando o teste t Student e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.8. ANÁLISE ELETROFORÉTICA

3.8.1. SDS-PAGE Monodimensional

O SDS-PAGE foi realizado como descrito por Laemmli (1970), com modificações. Aproximadamente 10 μL de proteína/peptídeo (200 μg) provenientes do veneno bruto de *B. atrox* foram aplicados em gel descontínuo com dimensões de 90 x 70 x 0,7 mm. A amostra foi concentrada previamente em banho-seco a 100°C por 10 minutos. O sistema foi formado por gel concentrador a 4% (m/m) de acrilamida e tampão de Tris-HCl a 1 mol L⁻¹ (pH=6,8) e gel separador a 12,5% (m/m) de acrilamida e tampão de Tris-HCl a 1,5 mol L⁻¹ (pH=8,8). A solução de tampão de corrida empregada no preenchimento dos reservatórios da cuba foi composta por Tris-Base a 0,06 mol L⁻¹, glicina a 0,5 mol L⁻¹ e SDS a 0,15% (m/v). Na corrida eletroforética foi fixada a voltagem de 150V, 150mA, 30W por gel, até que o frente percorresse todo o gel.

Ao término da separação das proteínas o gel foi lavado com água deionizada durante 5 min. para a remoção do excesso de SDS. Em seguida, o mesmo foi submetido à solução fixadora, com 50% (v/v) de etanol, 12% (v/v) de ácido acético glacial e água deionizada qsp para 200mL, por 1 hora e posteriormente à coloração durante 4 horas, sob leve agitação, usando solução de azul de *Coomassie* G-250 a 1% (m/v) preparado com 45% (v/v) de etanol, 45% (v/v) de água deionizada e 10% (v/v) de ácido acético glacial. Utilizando o protocolo do manual da GE (2004).

3.8.2. SDS-PAGE Bidimensional (2D-PAGE)

Na etapa de primeira dimensão, as proteínas da amostra são separadas por focalização isoeétrica, em fitas de 13 cm com valores de pH variando entre 3 a 10 de forma não linear. Estas fitas contêm gel de poliacrilamida, onde o gradiente de pH é formado pela presença de anfólitos (MANUAL GE, 2004). Para a reidratação das fitas, aplicou-se 250 μL de amostra (400 μg de proteínas mais solução de reidratação) em uma canaleta do aparato sobre o qual as fitas foram colocadas. Neste passo ocorre a separação física das proteínas em função dos seus respectivos pontos isoeletricos (pI) (IPG - *immobilized pH gradient*) submetidas a voltagem crescente. As amostras foram tratadas com *clean up kit*. A reidratação do gel das fitas ocorreu

a temperatura ambiente por cerca de 12 horas. Após este período, as fitas são colocadas no sistema focalizador nas seguintes condições: (1) passo de 500 V até acúmulo de 500 Vh, (2) gradiente de 500 a 1000 V até acúmulo de 800 Vh, (3) gradiente de 1000 a 8000 V até acúmulo de 11300 Vh e (4) passo de 8000 V até acúmulo de 3000 Vh (GE, 2004). O programa foi executado durante 5,5 h, porém o tempo da última etapa pode ser prolongado, caso, durante a execução do programa inicial, a amostra não tenha atingido o final da fita, este fato foi observado pela linha de azul de bromofenol.

Utilizou-se o aparelho *Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit* da GE para realizar a focalização das *strips* 2D. Ao término da focalização, as fitas foram equilibradas em duas etapas. Na primeira delas, utilizou-se 10 mL da solução contendo 6 mol.L⁻¹ de uréia, 2% de SDS (m/v), 30% de glicerol (v/v), 50 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,8), 0,002% de azul de bromofenol e 1% de DTT (m/v) para cada fita. Na segunda etapa, utilizou-se a mesma solução, porém, neste caso, substituiu-se o DTT por 2,5% de iodoacetamida (m/v) (GE, 2004). Cada etapa de equilíbrio da fita foi executada por 15 minutos, sob leve agitação.

Na etapa de segunda dimensão, as proteínas focalizadas são submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação em função de suas massas moleculares específicas. O Peso molecular (PM) utilizado foi o *Color Plus Prestained Protein Marker – Broad Range (7-175 kDa)* (P7709S). Realizou-se a confecção de géis a 12,5% para eletroforese SDS-PAGE mono e bidimensional, as condições das corridas foram 150-200V, 150mA, 30W, onde seguiu-se o protocolo do manual da GE (2004) durante aproximadamente cinco horas e meia.

Depois deste período, lavou-se o gel com água deionizada. Em seguida, as proteínas foram fixadas utilizando uma solução contendo ácido acético a 12% (v/v) e etanol a 50% (v/v) durante 1 hora. Removeu-se a solução fixadora e lavou-se o gel novamente com água deionizada durante 10 minutos, sob agitação, por 3 vezes. Cada ponto (proteína) visualizado no gel pode ser considerado como uma coordenada ortogonal de uma proteína que migrou especificamente em função de seu ponto isoelétrico (eixo x) e sua massa molecular (eixo y). A coloração dos géis mono e bidimensional foi realizada com *Coomassie Blue Green 250-G*, conforme manual da GE (2004). Por fim, escaneou-se os géis, com equipamento *Image Scanner (Amershan Bioscience)*.

3.9. CROMATOGRAFIA EM FASE REVERSA

Solubilizou-se 5 mg do veneno bruto de *Bothrops atrox* A em 100 µL de solução de solubilização 95% de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% e 5% de acetonitrila (ACN) 99,9%. O material insolúvel foi removido por centrifugação (*Eppendorff* 5804R) a 13.000xg durante 10 min e temperatura ambiente. Para o fracionamento das proteínas do veneno aplicou-se o solubilizado em uma coluna cromatográfica C18 Discovery 100RP (250 x 4 mm, tamanho de partícula 5 microns), equilibrada previamente com 0,1% de TFA em água ultra pura (eluente A) e ACN 99,9% (eluente B). A detecção do perfil cromatográfico dos constituintes protéicos e peptídicos solúveis do veneno foi obtida usando-se a cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) no aparelho ÄKTA purifier™ da GE. A velocidade de fluxo para eluição dos constituintes foi de 1,0 mL/min, no seguinte gradiente do eluente B: 5% por 10 min, de 5-15% por 20 min, de 15-45% por 120 min, de 45-70% por 20 min e de 70-100% por 10 min, como previamente descrito (CALVETE et al., 2009). As amostras foram monitoradas em comprimentos de onda em 215 e 280 nm, recolhidas manualmente, secas em um *Speed-Vac* e armazenadas em freezer -20°C. A abundância relativa (% das proteínas do veneno total) das diferentes classes de proteínas nos venenos foi estimada a partir da relação da soma das áreas dos picos de inversão de fases cromatográficas contendo proteínas da mesma família com a área total de proteínas do veneno. Seguiu-se o mesmo procedimento para as amostras de veneno de serpentes J e F.

3.10. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR

Cerca de 50 mg de veneno bruto de *Bothrops atrox* A foram solubilizados em 1 mL de tampão Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4. O material insolúvel foi removido por centrifugação (*Eppendorff* 5804R) a 13.000xg durante 10 min. a temperatura ambiente. O solubilizado foi aplicado em uma coluna de Superdex Peptide 10/300 GL, previamente equilibrada com o mesmo tampão, no aparelho ÄKTA purifier™ da GE. As amostras foram eluídas em um fluxo de 1 mL/min, monitoradas em comprimentos de onda de 215 e 280 nm, liofilizadas e armazenadas em freezer -20°C. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra de veneno de *B. atrox* J.

3.11. ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa foi realizada no equipamento de espectrometria de massa por dessorção assistida por ionização a laser da matriz MALDI, com dois analisadores TOF (AXIMA TOF-TOF Shimadzu Biotech). As amostras foram preparadas em ácido trifluoracético 0,1% (TFA), e aplicadas na placa do aparelho, adicionou-se a matriz de ionização ácido- α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) para baixa massa e ácido sinapínico (SA) para alta massa. Após a secagem das amostras na placa, esta foi elevada à câmara de vácuo do aparelho AXIMA TOF-TOF e analisadas (MANUAL SHIMADZU, 2008).

Os espectros foram obtidos em modo ESI-MS de íon positivo com uma massa Qq-*oa*TOF híbrido Espectrômetro-Xevo G2 QToF MS (Waters, Manchester, UK). ESI-MS típicos foram realizados em modo positivo nas seguintes condições: temperatura da fonte 80 °C, capilar 2,8 kV de tensão, em cone de tensão de 35 V, com um conversor de modo analógico para modo de resolução digital (ADC), detector a 2825 V anteriormente ajustado com solução Leucina-encefalina (Leu-Enk) a 2 ng/mL. O instrumento foi calibrado automaticamente com solução de iodeto de sódio através do *IntelliStart*, parte integrante do *software* de aquisição de 4.1V *MassLynx* (Waters, Manchester, UK) (SOUZA et al., 2008). As amostras foram ressuspensas em frasco com uma solução que continha partes iguais de água e de metanol com 0,1% de ácido fórmico para cada amostra a proceder a análise ESI(+)-MS. Estas soluções foram em seguida injetadas com fluxo de 500 nL/min, utilizando-se o sistema de fluido instalado no painel Xevo QToF G2 MS controlado pelo *software IntelliStart* página sintonia MS. Todos os espectros de MS foram adquiridos ao longo da 50-2000 m/z. MS/MS de aquisição foi realizado utilizando o quadrupolo com uma discriminação elevada para cada m/z de interesse. A energia de colisão foi aplicada ao íon precursor selecionado e uma dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation* – CID) na célula de colisão *T-Wave* preenchida com gás argônio. Foi aplicada 25 eV à célula, dependendo da colisão no íon precursor, apresentando dissociação característica (SOUZA et al., 2008).

3.11.1 SEQUENCIAMENTO – método *De Novo*

O modelo utilizado para sequenciamento *de novo* é descrito por vários autores (ROEPSTORFF; FOHLMAN 1984; BIEMANN 1988; JOHNSON; MARTIN et al., 1988; PAPAYANNOPOULOS 1995; STEEN; MANN 2004; CANTÚ et al., 2008). Para sequenciar proteínas é preciso obter o espectro MS/MS de seus peptídeos. Isso significa 2 etapas de MS

acopladas. Depois de fazer o MS da molécula inteira, esta é fragmentada dentro do aparelho por colisão com gases. A ligação peptídica se quebra formando fragmentos típicos, como os íons *b* e *y* mostrados na figura 4, que terão massas diferentes de acordo com o radical R de cada aminoácido. Os fragmentos são então separados e analisados por MS. O método tem como base a análise da fragmentação por espectrometria de massas e sua precisão varia de acordo com o tipo de ensaio ms/ms, podendo iniciar-se da N-terminal (*b*) ou do C-terminal (*y*). Utilizou-se o *software MxEnt 3* (Waters, Manchester, UK) e transferido para o *PepSeq BioLynx software*, utilizou-se ainda *Microsoft Excel* dados com até 120 contagens, a fim de proceder a avaliação manual. A identificação dos mais comuns íons de peptídeos de diagnóstico dos fragmentos (*a*⁺, *b*⁺, *y*⁺ -tipo), observada atualmente em colisões de baixa energia e íons *immonium*, foi obtida manualmente para seqüenciamento *de novo* de peptídeos, utilizando o programa *Microsoft Excel* com os dados de massa monoisotópica frequentes e resíduos de aminoácidos menos frequentes, os grupos terminais e as modificações pós-traducionais para a utilização da espectrometria de massas calculadas usando as seguintes massas atômicas do isótopo mais abundante dos elementos: C = 12.0000000, H = 1.0078250, N = 14.0030740, O = 15.9949146, F = 18.9984033, P = 30.9737634, S = 31.9720718, CL = 34.9688527, Br = 78,9183361. Fragmentos com intensidades superiores a 200 contagens e precisão de massa entre 0 a ± 17 ppm, de acordo com a equação abaixo, foram utilizados para a seqüenciamento *de novo* para peptídeo.

$$\text{Exatidão de massa (ppm)} = 1.000.000 \times (\text{massa teórica} - \text{massa medida}) / \text{massa teórica}$$

Aplicação *MassSeq* e da análise por seqüenciamento *de novo* são ferramentas de interpretação do pacote de *software BioLynx*, utilizado de forma a confirmar a análise manual, utilizando os seguintes parâmetros de seqüenciamento para peptídeos: M/z tolerância de 0,03 para peptídeos e fragmentos e limiar de intensidade de 0,003% (COUTINHO-NETO et al., 2013).

4. RESULTADOS

Dosagem de proteínas

Após a pesagem de 1 mg de cada veneno, verificou-se que as amostras, apresentaram 953,0; 937,0 e 884,0 $\mu\text{g/mL}$ de proteína nos venenos brutos de *B. atrox* adulta, jovem e filhote, respectivamente (tabela 1).

Tabela 1. Teor protéico do veneno bruto de *Bothrops atrox* adulto, jovem e filhote.

Veneno bruto (mg)	Proteínas totais ($\mu\text{g/mL}$)*	Recuperação (%)
<i>B. atrox</i> A	1,0	95,3
<i>B. atrox</i> J	1,0	93,7
<i>B. atrox</i> F	1,0	88,4

* Dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

4.2. Atividades Biológicas e Enzimáticas

Ensaio de atividade miotóxica

A atividade miotóxica, dosada pela liberação de CK, produto de degradação muscular, apresentou-se mais ativa no veneno de *B. atrox* F que nas amostras de J e A, sendo este aproximadamente 5 vezes maior, apresentando valores de atividade 1610 U/L (Fig. 5). O controle utilizado foi solução fisiológica que apresentou 180 U/L.

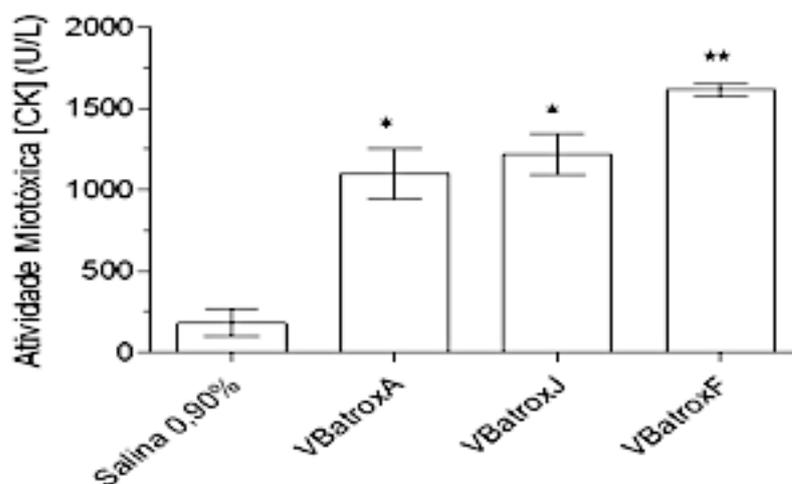


Figura 5. Atividade miotóxica de 50 μg dos venenos brutos de *B. atrox* A, J e F, medidos por dosagem da CK. Os 50 μg de veneno bruto em 50 μL foram injetados por via i.m. no músculo gastrocnemius de camundongos (28-32 g). Como controle NaCl 0,9% (50 μL). Realizou-se o procedimento para os três grupos de serpentes. Os resultados foram expressos pela média \pm SD (n=5). A análise estatística foi feita por ANOVA e comparação múltipla por Turkey's sendo $p < 0,01$.

Ensaio de atividade hemorrágica

Nos ensaio de avaliação o potencial hemorrágico, o veneno de F foi mais ativo. A Figura 6 mostra o efeito hemorrágico do veneno bruto de *B. atrox* (50 μg). O resultado foi um alto grau de hemorragia nos animais que receberam o veneno de F, a área média foi de $511 \pm 66,11 \text{ mm}^2$, contra médias entre $234 \pm 44,15$ e $249 \pm 31,16 \text{ mm}^2$ de J e A, respectivamente. O controle negativo com salina (NaCl 0,154 M) não apresentou hemorragia.

Na Figura 7 podemos observar os halos hemorrágicos produzidos pelo veneno de F, que induziu maior hemorragia, cerca de 2 vezes maior em relação ao veneno bruto de A e J.

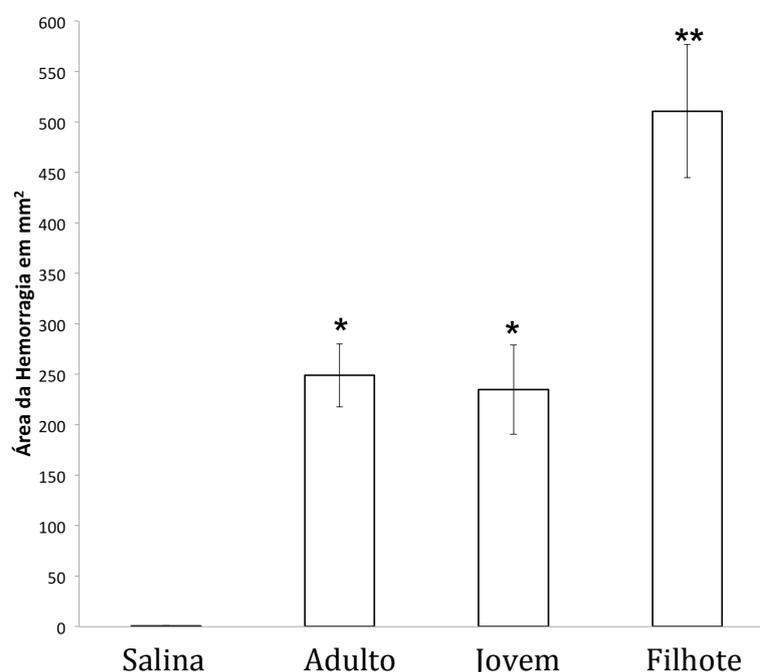


Figura 6. Determinação da atividade hemorrágica mínima dos venenos brutos de *B. atrox*. Aplicou-se 50 μg em 50 μL de salina das diferentes amostras dos venenos brutos (A, J e F), sendo estes injetados via i.d. no dorso de camundongos (28-32 g). A hemorragia foi quantificada através da média da área dos halos hemorrágicos. Os resultados foram expressos pela média $\text{mm}^2 \pm \text{DP}$ ($n=5$).

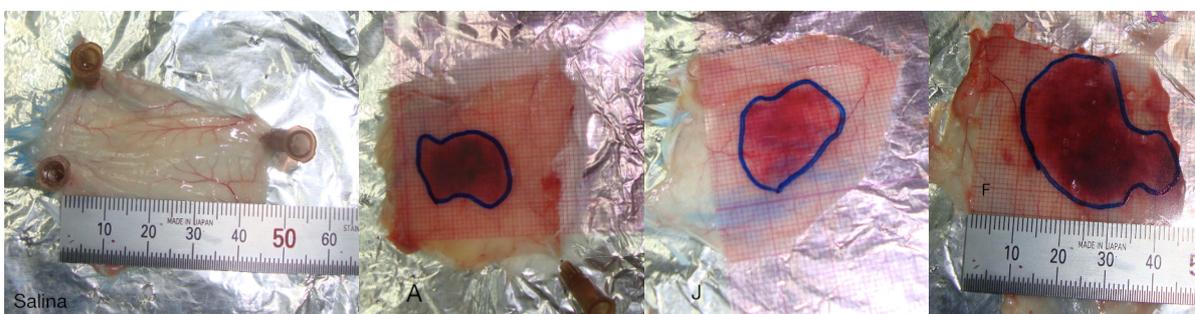


Figura 7. Avaliação da hemorragia nas peles de camundongos. Efeito hemorrágico produzido por 50 μg de venenos brutos de A, J e F, injetados via i.d. no dorso de camundongos (28-32 g). Após 2 h, os animais foram submetidos à eutanásia e as peles removidas para análise.

Ensaio de hemólise indireta

Os venenos testados em placas contendo agarose mostraram halos de hemólise consideráveis importantes, apresentando diâmetros maiores que 10 mm. O maior halo foi apresentado pelo veneno de J, medindo 20 mm. Os outros venenos apesar de apresentarem halos menores também foram responsáveis por hemólise positiva. O controle salino, a água ultra pura e a BPP sintética, não apresentaram atividade hemolítica, sendo, portanto controles negativos (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da atividade fosfolipásica dos venenos de *B. atrox* adulta, jovem e filhote.

Amostras	Halo de hemólise*	
	Ø mm	Dose (1 µg/µL)**
<i>B. atrox</i> A	15	3µL
<i>B. atrox</i> J	20	3µL
<i>B. atrox</i> F	17	3µL
Soro fisiológico	0	3µL
H ₂ O ultra pura	0	3µL

* A placa de agarose contendo eritrócitos humanos e gema de ovo. Aplicou-se 3 µL de veneno de *B. atrox*, A, J, F, e dos controles negativos, a solução salina 0,154 M (soro fisiológico) e água ultra pura.

** quantidade de veneno bruto por µL aplicada;

Atividade de fosfolipases A₂

Fosfolipase A₂ (PLA₂) atividade foi avaliada através da hidrólise de fosfolipídios fluorescentes sintéticos, NBD-PC e NBD-PA. O ensaio foi realizado utilizando um espectrofluorímetro (Shimadzu, RF-5301PC) com excitação e emissão de comprimentos de onda de 460 e 534, respectivamente. A atividade enzimática foi avaliada durante 250 segundo, à temperatura ambiente, após a adição de cada substrato (3,3 µg/ml, concentração final) num meio de reação contendo 50 mM de Tris-HCl, com 8 mM de CaCl₂ e pH 7,5, nas diferentes concentrações de cada um dos venenos de *B. atrox*.

A influência do pH foi avaliada por incubação dos venenos das serpentes por 5 minutos utilizando tampões com diferentes valores de pH (3,5 – 11), em seguida avaliou-se a atividade da PLA₂, pela adição de substratos, conforme descrito acima.

Todos os três grupos avaliados de venenos de *B. atrox*, sendo de filhotes, jovens e adultos, respectivamente, hidrolisaram os fosfolipídios fluorescentes NBD-PC (Fig. 8A) e

NBD-PA (Fig. 8B), mas com doses diferentes como observado na figura 8. NBD-PC pareceu ser o substrato mais hidrolisado pelos venenos. Também observou-se que o veneno de Filhote de *B. atrox* foi mais potente do que os outros venenos sobre ambos NBD-PC e NBD-PA substratos (Tabela 3).

Todos os venenos de *B. atrox* foram capazes de hidrolisar PC-NBD dentro de um intervalo de pH estreito (6,0-11) (Figura 9), apresentando um pH ótimo de cerca de 7,5.

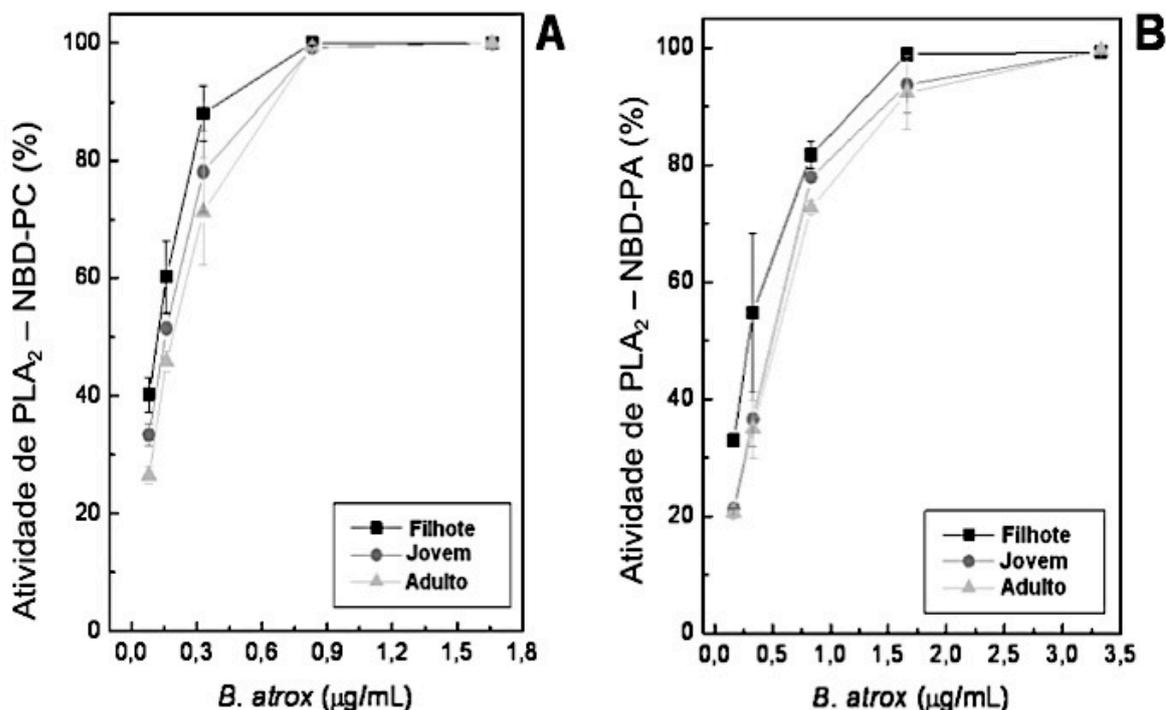


Figura 8. A hidrólise dos fosfolipídios fluorescentes por venenos de *B. atrox*. Atividade de PLA₂ do veneno de serpentes *B. atrox* (filhotes, jovens e adultos) sobre os fosfolipídios fluorescentes (3,3 µg/mL) NBD-PC (painel A) ou NBD-PA (Painel B) após 250 segundos de reação a pH 7,5. Os dados estão expressos como médias ± SEM de uma experiência individual (n = 3).

Tabela 3. Hidrólise dos fosfolipídios fluorescentes por venenos de *B. atrox*.

Veneno de <i>B. atrox</i>	PLA ₂ Atividade EC ₅₀ (µg/mL)*	
	NBD-PC	NBD-PA
Filhotes	0,125	0,300
Jovens	0,165	0,485
Adultos	0,200	0,540

* EC₅₀ representa a concentração efetiva de venenos capazes de exercer 50% da atividade da PLA₂ sobre os substratos fluorescentes após 250 segundos de reação.

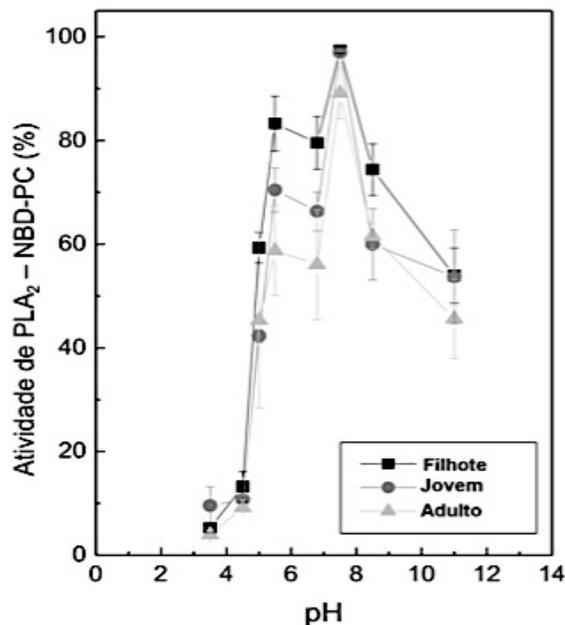


Figura 9. Efeito do pH sobre a atividade da PLA₂ dos venenos de *B. atrox* A, J, F. Efeito do pH na hidrólise do NBD-PC (3,3 µg / µL) de 0,33 µg / µL dos venenos de *B. atrox* (filhotes, jovens e adultos) após 250 segundos de reação. Os dados estão expressos como médias ± SEM de uma experiência individual (n = 2).

Ensaio de coagulação

O efeito do veneno bruto *B. atrox* na coagulação do sangue, foi investigado. Todos os três venenos de *B. atrox* avaliados (filhotes, jovens e adultos) apresentaram atividade pró-coagulante de maneira dependente da concentração, como ilustrado na redução do tempo de coagulação do plasma humano no painel A e fibrinogênio de bovino no painel B (Fig. 10). A DCM em plasma foi de 1,2 µg/mL, 5,3 µg/mL, 9,7 µg/mL para os venenos de *B. atrox* de filhotes, jovens e adultos, respectivamente. Quando o fibrinogênio foi testado, a DCM foi de 3,2 µg/mL, 3,8 µg/mL, 4,7 µg/mL para os venenos de *B. atrox* filhote, jovens e adultos, respectivamente. Os venenos de *Bothrops atrox* apresentaram atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, provavelmente liberando fibrinopeptídeo A através da degradação da cadeia A α , em baixas concentrações (0,6 µg/mL), tendo em vista que a atividade foi observada após poucos segundos de reação do substrato com o veneno. Ficando evidente o melhor resultado para o veneno de filhotes.

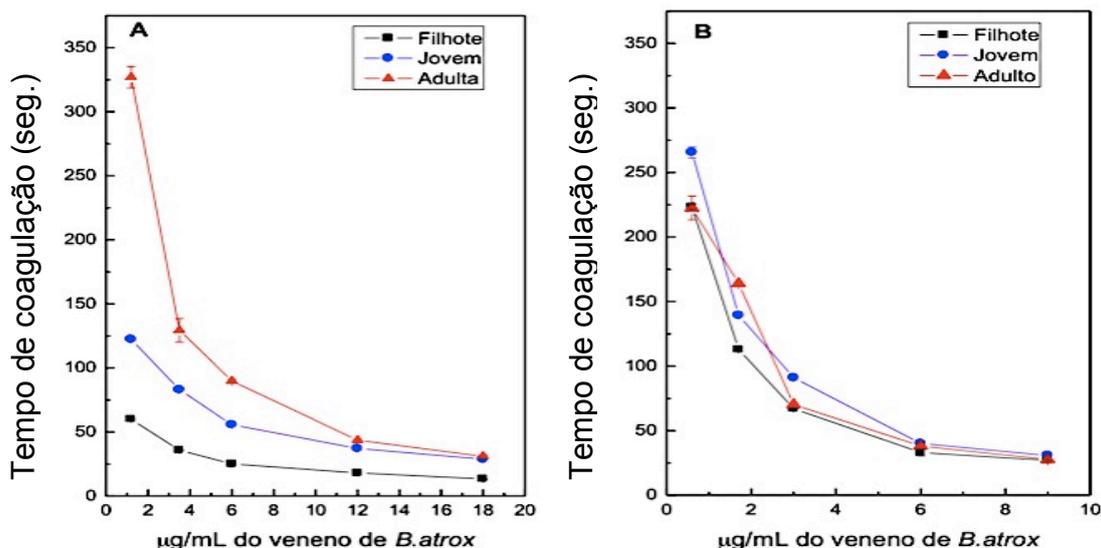


Figura 10. Efeitos dos venenos de *B. atrox* no tempo de coagulação. Efeitos de diferentes concentrações de *B. atrox* (1,2-18 µg/mL de F (■), J (●) e A (▲)) testados no plasma (Painel A) e também no fibrinogênio (0,6-9 µg/mL (Painel B)). Dados expressos como média ± DP de duas experiências individuais (n = 3).

Como mostra a figura 11 os inibidores foram incubados previamente durante 30 minutos à temperatura ambiente com 1,2 µg/mL de veneno de *B. atrox* filhote para coagulação do plasma (fig. 11A) e com 3 µg/mL de veneno de *B. atrox* filhote para a coagulação do fibrinogênio (Fig. 11B), em seguida, o tempo da coagulação foi medido.

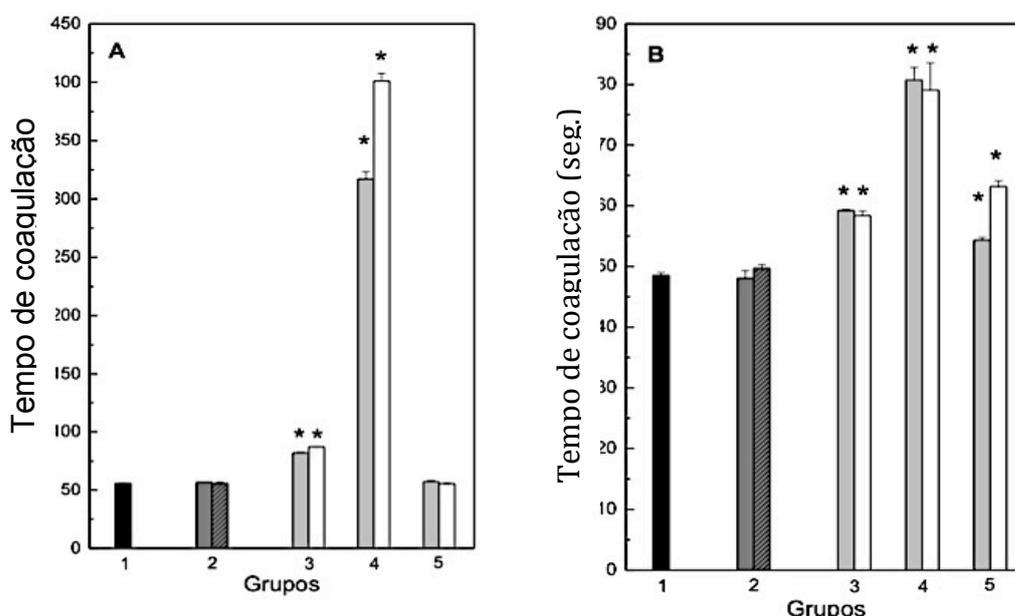


Figura 11. Efeito de inibidores sobre a atividade de coagulação induzida pelo veneno de *B. atrox* filhote. Grupo 1: veneno de *B. atrox* filhote com NaCl (1), Grupo 2: veneno de *B. atrox* filhote com 1% de DMSO (coluna cinzenta) e DMSO a 3% (coluna branca), Grupo 3: Benzamidina 5 mM (coluna cinzenta) e 10 mM (coluna branca) e Grupo 4: EDTA 5mM (coluna cinza) e 10mM (coluna branca); Grupo 5: PMSF 1mM (coluna cinza) e 3mM (coluna branca). Dados expressos como média ± DP de dois experimentos individuais (n = 3). *O nível de significância (p < 0,05), quando comparado aos grupos 1 e 2.

Os inibidores foram capazes de inibir a coagulação do plasma e fibrinogênio (Fig. 12) induzida pelo mveneno de *B. atrox* jovem, exceto PMSF. Os inibidores foram incubados previamente durante 30 minutos à temperatura ambiente com 6 µg/mL de veneno de *B. atrox* jovem para a coagulação do plasma (Fig. 12A) e de 4,8 µg/mL de veneno de *B. atrox* jovem para a coagulação do fibrinogênio (Fig. 12B), em seguida, o tempo da coagulação foi medido.

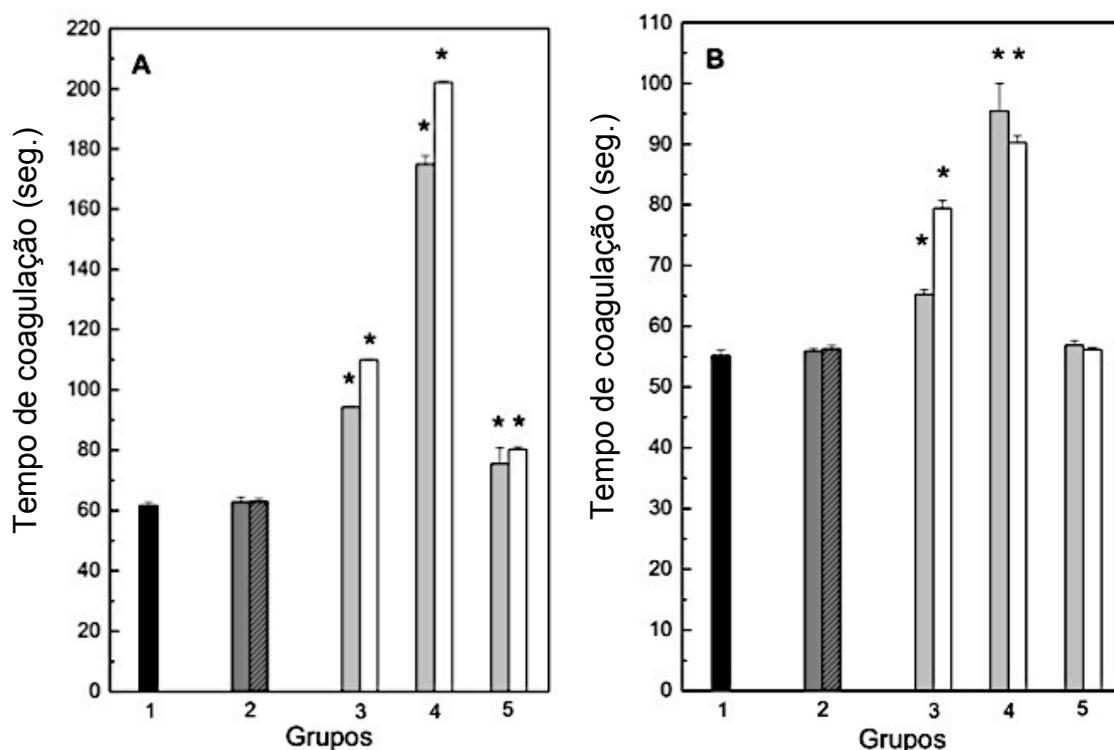


Figura 12. Efeito de inibidores sobre a actividade de coagulação induzida pelo veneno de *B. atrox* jovem. Grupo 1: veneno de *B. atrox* jovem com NaCl (1), Grupo 2: venom de *B. atrox* jovem, com DMSO 1% (coluna cinzenta) e DMSO a 3% (coluna branca), Grupo 3: Benzamidina 5 mM (coluna cinzenta) e 10 mM (coluna branca) e Grupo 4: EDTA 5mM (coluna cinza) e 10mM (coluna branca); Grupo 5: PMSF 1mM (coluna cinza) e 3mM (coluna branca). Dados expressos como média \pm DP de dois experimentos indivíduos (n = 3). *O nível de significância (p <0,05) quando comparado com os grupos 1 e 2.

Os inibidores foram capazes de inibir a coagulação do plasma e fibrinogênio induzido (Fig. 13) por veneno de *B. atrox* adulta. Os inibidores foram incubados previamente durante 30 minutos à temperatura ambiente com 9,6 µg/mL de veneno de *B. atrox* adulta para verificar o efeito sobre a coagulação do plasma (Fig. 13A) e de 4,8 µg/mL de veneno de *B. atrox* adulta para o fibrinogênio (Fig. 13B), em seguida, o tempo da coagulação foi medido.

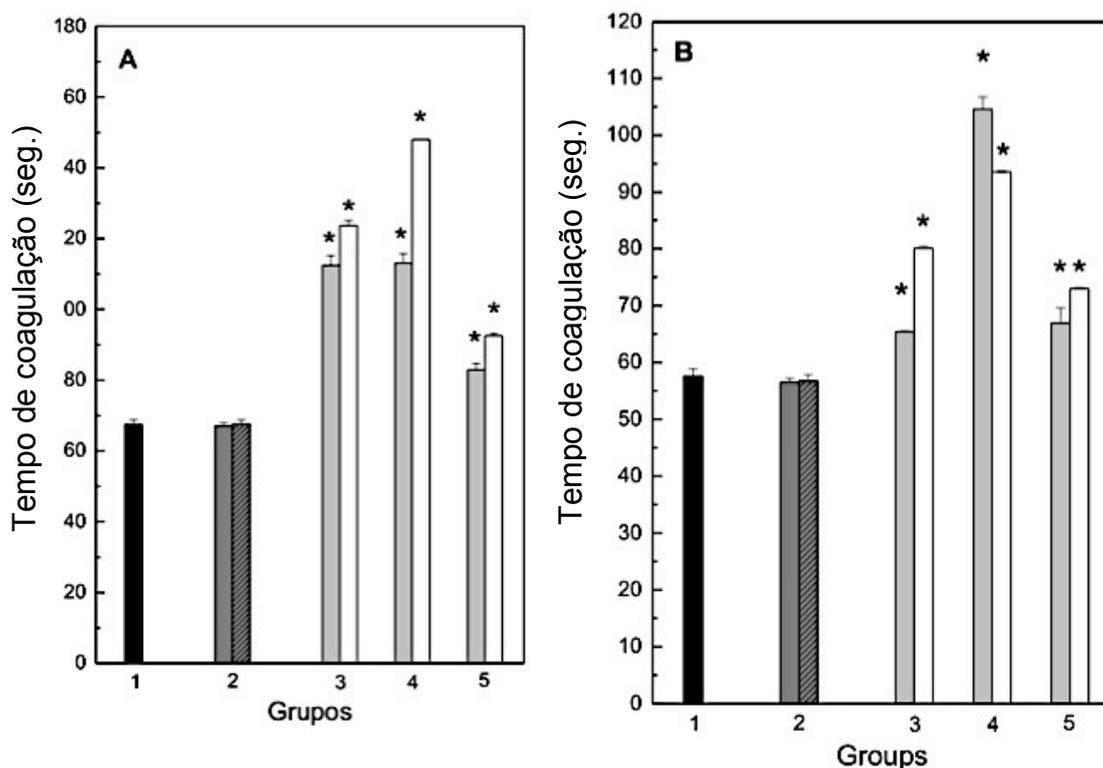


Figura 13. Efeito de inibidores sobre a atividade de coagulação induzida pelo veneno de *B. atrox* adulta. Grupo 1: veneno de *B. atrox* adulta com NaCl (1), Grupo 2: veneno de *B. atrox* adulta com DMSO a 1% (coluna cinzenta) e DMSO a 3% (coluna branca), Grupo 3: Benzamidina 5 mM (coluna cinzenta) e 10 mM (coluna branca) e Grupo 4: EDTA 5mM (coluna cinza) e 10mM (coluna branca); Grupo 5: PMSF 1mM (coluna cinza) e 3mM (coluna branca). Dados expressos como média \pm DP de dois experimentos indivíduos ($n = 3$). * O nível de significância ($p < 0,05$) quando comparado com os grupos 1 e 2. (A) S-2238; (B) S-2288.

Atividade hidrolítica sobre substrato cromogênico

O veneno bruto de *B. atrox* (50 mg/mL) foi capaz de hidrolisar tanto o S-2238 (0,5 mM) quanto S-2288 (0,5 mM) (dados não mostrados). Estes substratos são regularmente usados para verificar a presença de proteases *trombina-like* ou serinoproteases, respectivamente. Atividade enzimática do veneno de *B. atrox* filhote sobre S-2238 e S-2288 (Fig. 14) foi inibida por PMSF, benzamidina e EDTA. A benzamidina eficientemente inibiu a atividade do veneno sobre S-2238 e S-2288. PMSF foi capaz de inibir parcialmente a atividade do veneno sobre S-2238 e cerca de 90% da atividade sobre S-2288. Por outro lado, EDTA inibiu 25% da atividade do veneno de *B. atrox* filhote sobre S-2238 e S-2288. Os inibidores foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com 50 μ g/mL de veneno de *B. atrox* filhote, em seguida, realizou-se a atividade enzimática. Painel A: Efeito de

inibidores em cima do substrato S-2238. Paineil B: efeito dos inibidores sobre o substrato S-2288.

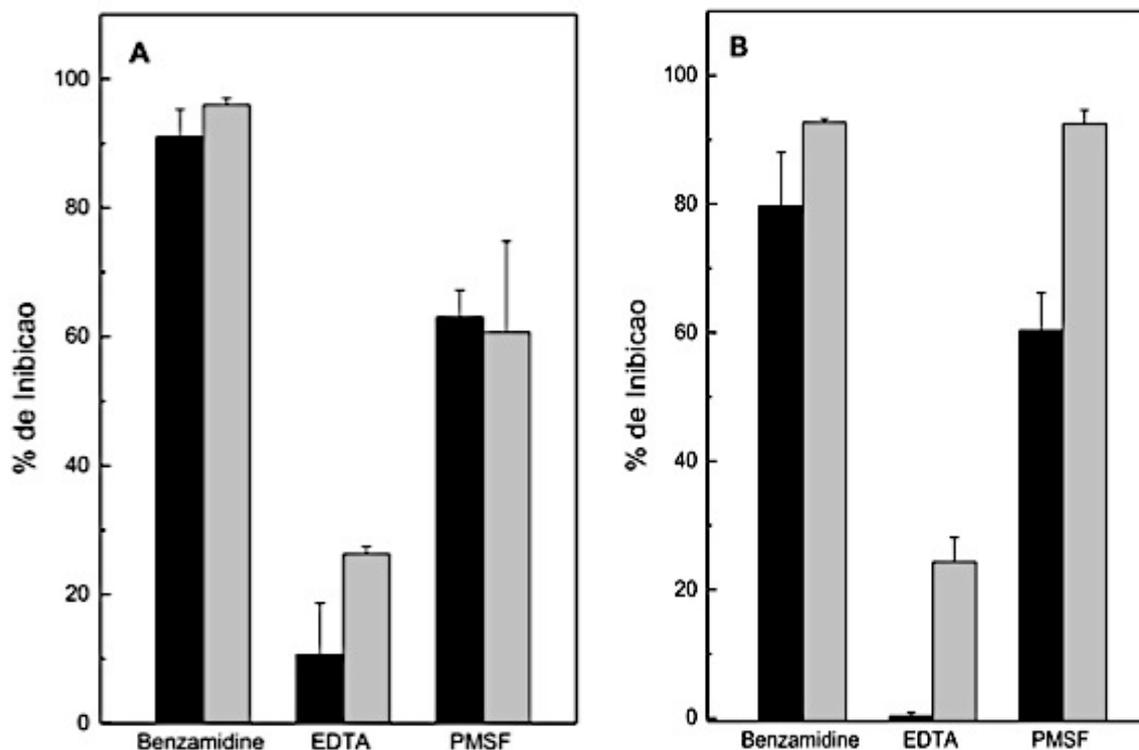


Figura 14. Atividade do veneno de *B. atrox* filhote sobre substratos sintéticos (0,5 mM) - efeito dos inibidores. Benzamidina: 5mM (coluna preta) e 10 mM (coluna cinza); EDTA: 5mM (coluna preta) e 10 mM (coluna cinza); PMSF: 1mM (coluna preta) e 3mM (cinza coluna). Dados expressos como média \pm DP de dois experimentos indivíduos (n = 3). (A) S-2238; (B) S-2288.

Atividade enzimática do veneno de *B. atrox* jovem sobre S-2238 e S-2288 (Fig. 15) foi inibida por PMSF, benzamidina e EDTA. Benzamidina e PMSF eficientemente inibiram a atividade do veneno sobre S-2238 e S-2288, em contraste com a inibição parcial quando utilizou-se o EDTA. Os inibidores foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com 50 μ g/mL de veneno de *B. atrox* jovem e então a atividade enzimática foi realizada.

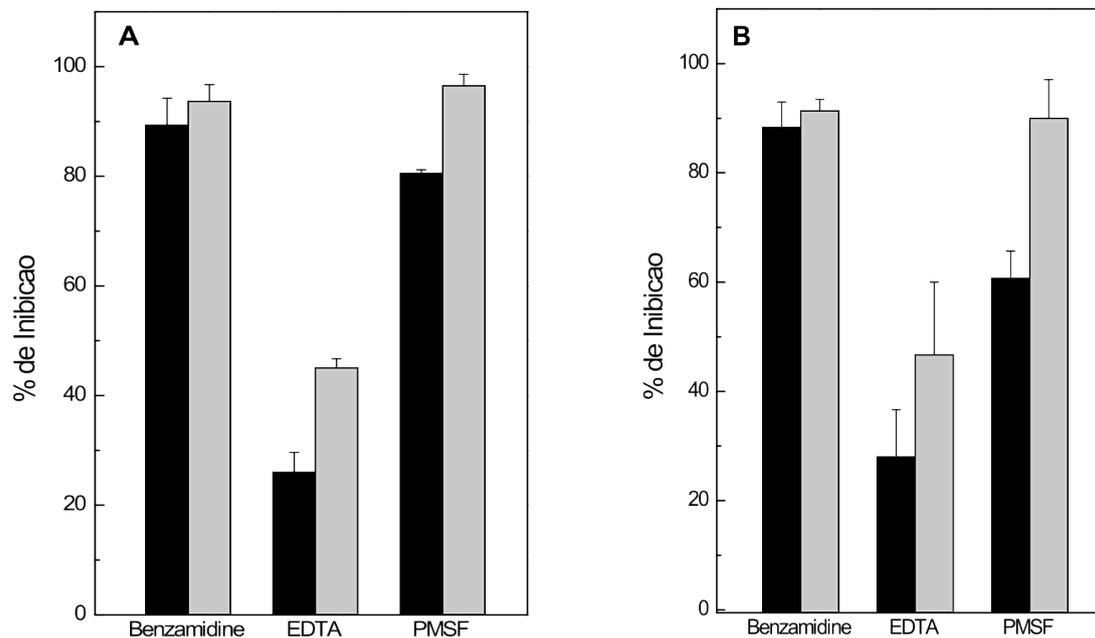


Figura 15. Atividade do veneno de *B. atrox* jovem, sobre substratos sintéticos (0,5 mM) - efeito dos inibidores. Painel A: Efeito de inibidores sobre o substrato S-2238. Painel B: efeito dos inibidores sobre o substrato S-2288. Benzamidina: 5mM (coluna preta) e 10 mM (coluna cinza); EDTA: 5mM (coluna preta) e 10 mM (coluna cinza); PMSF: 1mM (coluna preta) e 3mM (cinza coluna). Dados expressos como média \pm DP de dois experimentos individuais (n = 3).

Atividade enzimática do veneno de *B. atrox* adulta, sobre S-2238 e S-2288 (Fig. 16) foi inibida por PMSF, benzamidina e EDTA. Benzamidina e PMSF eficientemente inibida a atividade do veneno sobre S-2238 e S-2288, em contraste com a inibição parcial quando EDTA foi utilizado. Os inibidores foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com 50 μ g / mL de veneno de *B. atrox* adulto, em seguida, a atividade enzimática foi realizada. Painel A: Efeito dos inibidores sobre o substrato S-2238. Painel B: efeito dos inibidores sobre o substrato S-2288.

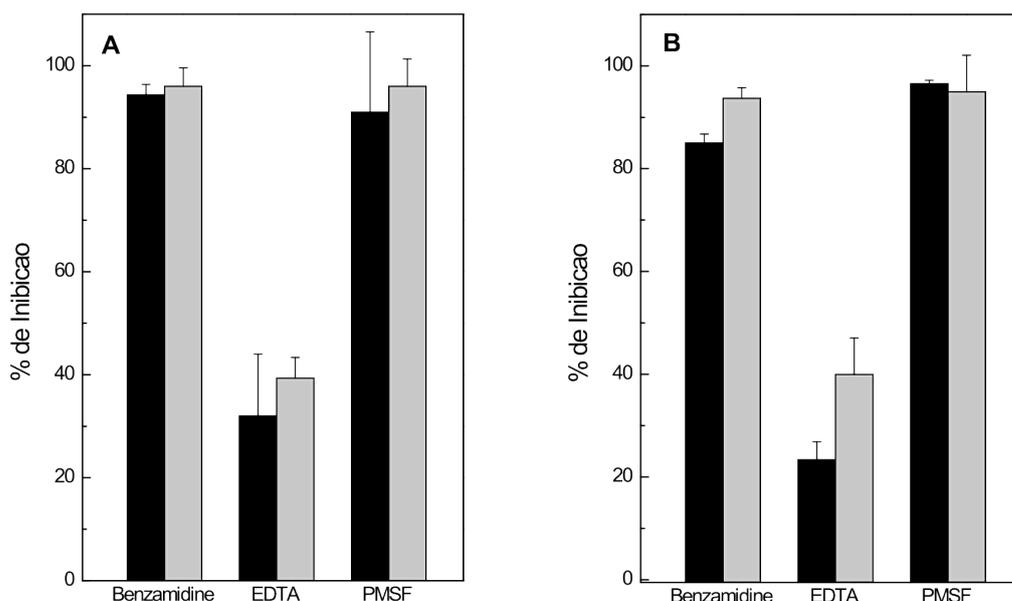


Figura 16. Atividade de *B. atrox* adulta sobre substratos sintéticos (0,5 mM) - efeito dos inibidores. Painel A: Efeito de inibidores sobre do substrato S-2238. Painel B: efeito dos inibidores sobre o substrato S-2288. Benzamidina: 5mM (coluna preta) e 10 mM (coluna cinza); EDTA: 5mM (coluna preta) e 10 mM (coluna cinza); PMSF: 1mM (coluna preta) e 3mM (cinza coluna). Dados expressos como média \pm DP de dois experimentos individuais (n = 3)

4.3. Perfil proteico analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese monodimensional realizada em condição redutora e não redutora possibilitou a visualização do perfil das diferenças proteicas entre os *pools* de venenos de *Bothrops atrox* A, J e F, respectivamente.

Nota-se no perfil não reduzido do veneno de *B. atrox* J a presença de banda na faixa aproximada de 30 e 71 kDa, ausentes nos venenos de A e F, grande concentração de proteínas nas regiões de 21, 37 e 50 kDa de A e J (Fig. 9). Observou-se ainda sob condições não-redutoras, no veneno de *B. atrox* A a presença de banda na região de 19 e 150 kDa, não sendo visíveis nas outras amostras. No entanto, a amostra de veneno de F apresentou bandas proteicas nas faixas de 27, 53, 56 e 64 kDa. No perfil submetido a redução com DTT, observou-se maior concentração nas bandas de aproximadamente 23, 37 e 52 kDa. Também notou-se a presença de proteínas nas regiões de aproximadamente 41 e 69 kDa no veneno de J e F. A faixa aproximada de 14 kDa apresentou bandas, porem em menor intensidade se comparado ao perfil reduzido. O veneno de *B. atrox* A, J e F, sob condições não redutoras, apresentou bandas proteicas majoritárias nas faixas de aproximadamente 80, 48, 23 e 21 kDa, e bandas de 52, 23 e abaixo de 17 em condições redutoras, como pode ser verificado na Figura 17.

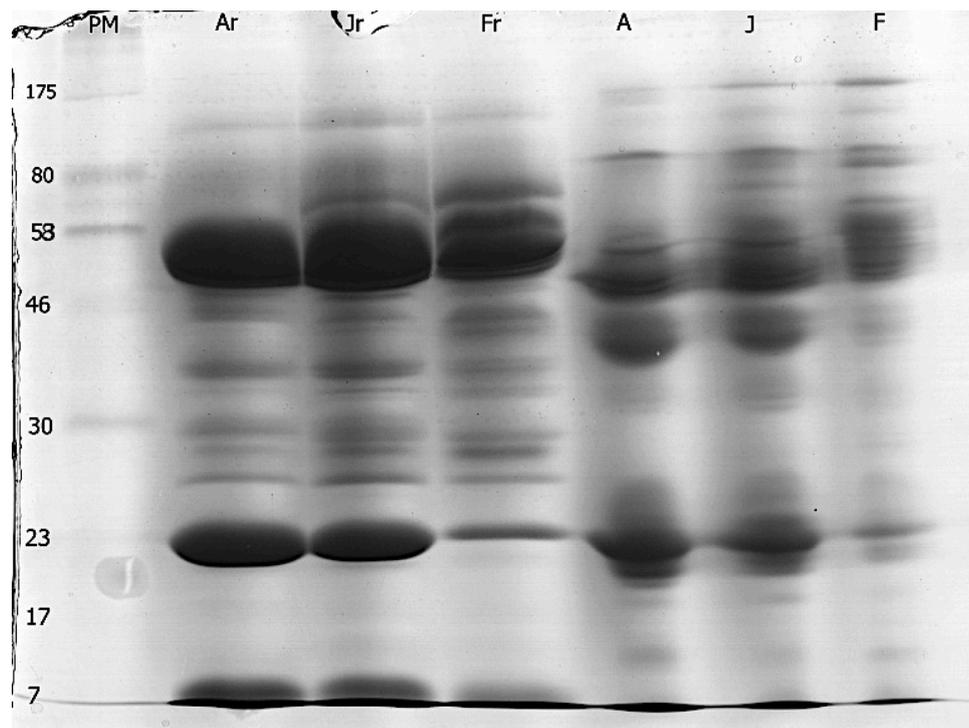


Figura 17. Perfil eletroforético dos venenos brutos de *B. atrox*. Amostras em SDS-PAGE: (PM) – peso molecular, (Ar) – Veneno Bruto de Adulto reduzido e (A) não reduzido, (Jr) Veneno Bruto de Jovem reduzido e (J) não reduzido e (Fr) Veneno Bruto de Filhote reduzido e (F) não reduzido.

Nos géis 2D SDS-PAGE podemos observar claramente os diferentes grupos das classes de proteínas, demonstrando que ocorre variação ontogenética do perfil protéico nos diferentes estágios de desenvolvimento dos espécimes da *B. atrox*, A, J e F.

Utilizou-se a 2-DE a fim de melhorar a separação de proteínas de *B. atrox*, em strip de pH 3-10 NL utilizada para a focalização isoeétrica (IEF).

Os padrões de proteínas visualizadas por coloração com *coomassie blue* G250 foram diferentes entre os perfis proteômicos de venenos obtidos a partir de adultos, jovens e filhotes da *B. atrox*. A análise de imagem também identifica diferenças substanciais relativas à várias proteínas correspondentes nos perfis obtidos, sendo observado nos venenos de F e J grande aumento de proteínas e isoformas nas faixa de 13 a 17 kDa, e no veneno de F a presença maior de grupos proteicos e isoformas nas faixas 30 a 70 kDa, entre os pIs 4,4 e 5,9 (Fig. 18).

Os mapas dos proteomas dos venenos de *B. atrox* em três diferentes estágios de desenvolvimento, ou seja, F, J e A, apresentam análise preliminar e comparativa das proteínas dos géis obtidos confrontando-os entre si (Fig. 18).

Os grupos proteicos foram marcados por similaridade, como mostra a tabela 5.

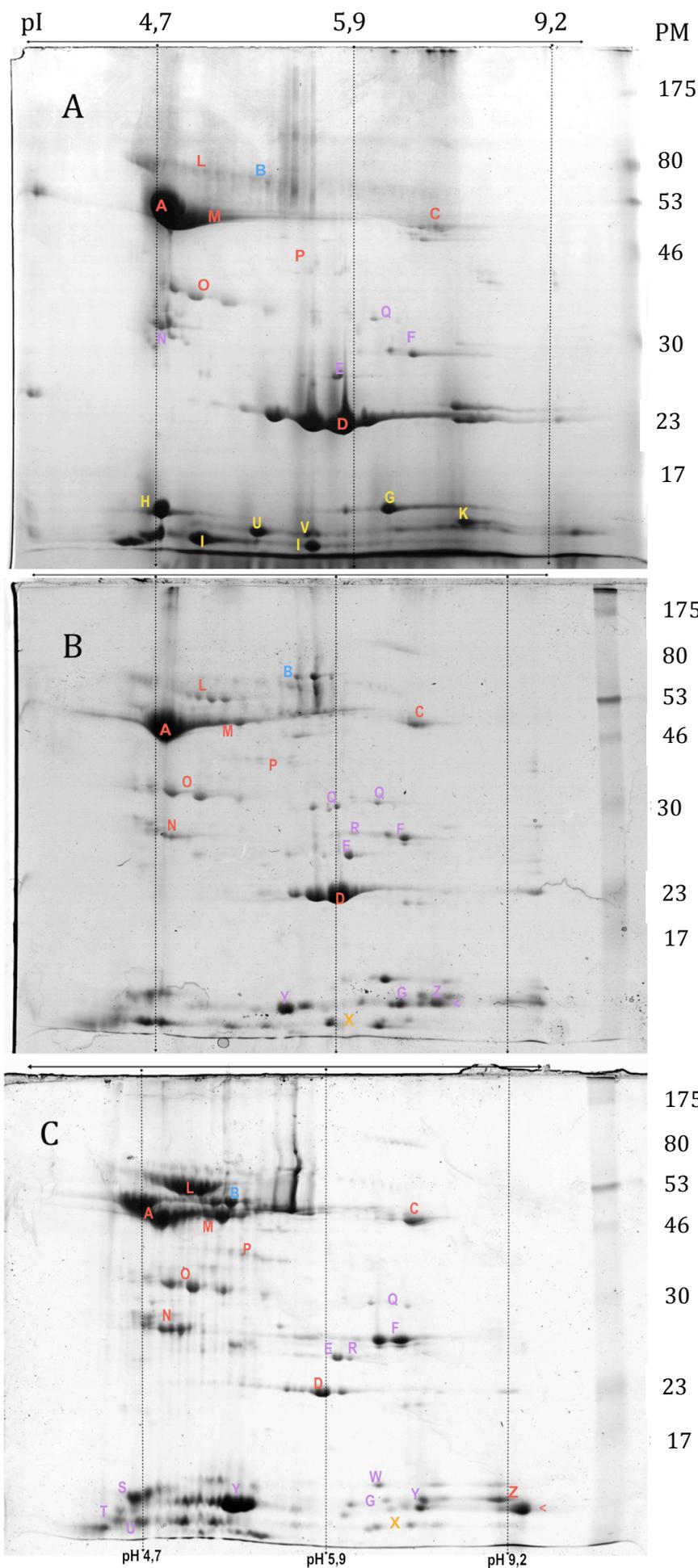


Figura 18. Perfil eletroforético dos venenos brutos de *B. atrox* em SDS-PAGE bidimensional

A) - SDS-PAGE 2D representa perfil eletroforético bidimensional do veneno bruto de *B. atrox* A;

B) - SDS-PAGE 2D representa perfil eletroforético bidimensional do veneno bruto de *B. atrox* J;

C) - SDS-PAGE 2D representa perfil eletroforético bidimensional do veneno bruto de *B. atrox* F. Serpentes nativas da região de Porto Velho.

A focalização ocorreu em strips de pH 3-10 NL.

Tabela 5. Classificação proteica dos grupos presentes nos venenos de *B. atrox*.

1		2		3		4	5		6
<i>B. atrox</i> A		<i>B. atrox</i> J		<i>B. atrox</i> F		GRUPOS*	Guércio 2006		Classe Proteica
kDa	pI	kDa	pI	kDa	pI		kDa	pI	
48-62	4,4-5,0	48-62	4,6-5,0	48-62	4,4-5,1	A	52	5,0	
48-51	6,4-7,3	49-52	6,7-7,3	47-52	6,7-7,3	C	40-51	7,1-7,5	
21-23	5,1-6,1	21-23	5,6-6,1	21-23	5,8-6,1	D	23-24	5,3-6,4	
58-66	4,4-5,8	58-62	5,0-5,5	57-62	4,7-5,5	L	61-66	5,0-5,9	Metaloproteinase
48-52	5,0-5,4	46-52	5,0-5,6	49-53	4,7-5,6	M	51-53	5,4-5,7	
31-39	7,4-5,3	30-36	4,7-5,5	30-36	4,7-5,6	O	36-37	5,2-5,4	
41	5,1-5,6	41	5,1-5,6	41	5,1-5,6	P	38-40	5,8-6,2	
58-62	5,5-5,8	60-66	5,6-5,9	58-62	5,6-5,9	B	55-61	5,9-6,2	LAAO
24-25	5,9-7,3	24-26	5,9-7,3	24-26	5,9-7,3	E	28-29	6,3-6,4	
26-29	4,7-5,2	26-29	4,7-5,2	26-29	4,7-5,2	N	29-30	5,0-5,3	Serinoprotease
24-34	5,9-7,3	24-34	5,9-7,3	24-34	5,9-7,3	Q	32-34	6,3-7,4	
27-28	6,0	26-28	5,9-6,3	24-36	5,9-6,3	R	29	6,5	
27-30	6,3-7,3	26-28	6,3-7,3	26-28	6,3-7,3	F	28-29	7,1-8,1	CRISP
	6,1-6,3		6,3-6,7		6,1-6,7	G	16	8,1	
	6,3-7,3		-		-	J	17	7,8	
≤ 17	7,3	≤ 17	-	≤ 17	-	K	17	7,8	Fosfolipases A ₂
	-		5,6-5,8		6,7-8,0	Y	15	6,7	
	-		6,7-8,0		9,2-10,1	Δ (<)	16	6,4-8,1	
	4,8		4,0-4,6		4,0-4,6	H	17	4,8	
	5,1-5,8		4,7-7,3		4,7-7,3	I	15	5,3	
	-		4,4-5,0		4,4-4,7	S	17	4,8	
≤ 17	-	≤ 17	4,4-4,7	≤ 17	4,4-4,7	T	15	4,8	Lectina tipo C
	5,3-5,6		4,6-5,7		4,7-5,1	U	14	5,1-5,4	
	5,6-5,8		4,7-5,5		4,7-5,5	V	14	5,1-5,4	
	5,8-5,9		6,3-6,7		6,3-6,7	W	15	5,9-6,4	
-	-	13	5,9-6,4	13	6,3-8,0	X	13	5,6-6,3	VEGF
≤ 17	-	≤ 17	7,3-8,0	≤ 17	9,2	Z	17	7,8	Lectina tipo C e NGF

As colunas 1, 2 e 3 mostram os dados obtidos dos serpentes de PVH-RO; coluna 4 classifica os grupos marcados no gel 2D; coluna 5 mostra os dados de perfil 2D de serpentes das regiões fronteiriças; coluna 6 classifica os grupos proteicos. *Adaptado de Guércio e colaboradores (2006).

O grupo de seis pontos na região de 21 a 23 kDa, com pI entre 5,1-6,1, mais abundantes nos adultos, grupo D, conjuntamente com o grupo de 48 a 66 kDa, com pI entre 4,4-5,8 dos grupos A, B, L e M. Nestas mesmas faixas de massa observam-se que nos filhotes

e jovens ocorrem uma variação significativa quanto a expressão de tais proteínas e suas isoformas (figs. 19 e 20). O grupo P aparece no veneno de F na faixa de peso aproximadamente de 41 kDa com pI entre 5,1-5,6.

A presença de polipeptídios e isoformas com massa molecular próxima a 17 kDa demonstra maior potencial bioativo no arsenal do veneno de filhotes e jovens. Nesta região encontra-se, provavelmente, as fosfolipases A₂ (PLA₂), peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), lectinas do tipo-C, fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), e fator de crescimento de nervo (NGF).

O VEGF do grupo X apresenta massa próxima de 13 kDa, com pI entre 5,6-8,0, evidenciando-se sua presença em venenos de J e F, característica de variação ontogenética e sua abundância diminui durante o processo de desenvolvimento da serpente, não sendo aparente no gel de veneno de serpentes de Adultas (Fig. 22).

As proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISPs) foram observadas em maior quantidade no veneno de F com peso entre 26-28 kDa e pI entre 6,3-7,3.

Proteínas do grupo C, cujas massas moleculares são próximas as do grupo A, apresentam valores mais elevados de pI 6,7-7,3, quando comparado aos pIs do grupo A. Diferentemente do grupo A, as proteínas do grupo C são muito mais abundantes em filhotes que adultos, como mostrado na figura 21.

Observa-se também que o grupo N apresenta variação com relação ao seu peso molecular, entre 26-29 kDa em venenos de F e J, com pI entre 4,7-5,2, e em veneno de A com peso molecular entre 32-38 kDa com pI entre 4,4-5,0. Ainda na mesma classe de proteínas os grupos E, Q e R, se apresentam entre 24-34 kDa, com pI entre 5,9-7,3

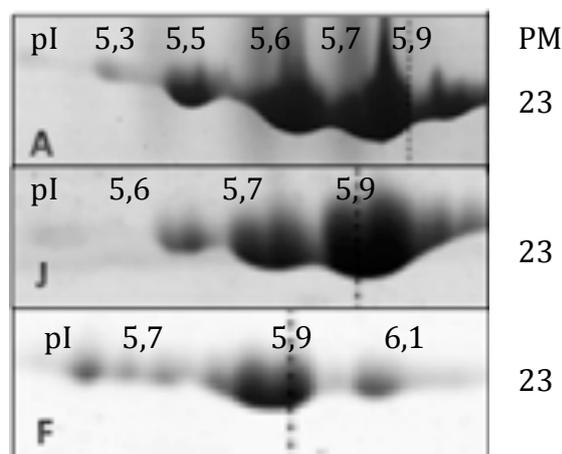


Figura 19. Detalhes do gel 2D-SDS-PAGE do grupo D (metaloproteinases), com 21-23kDa e pI 5,1-6,1 em veneno de A e pI 5,6-6,1 em venenos de J e F.

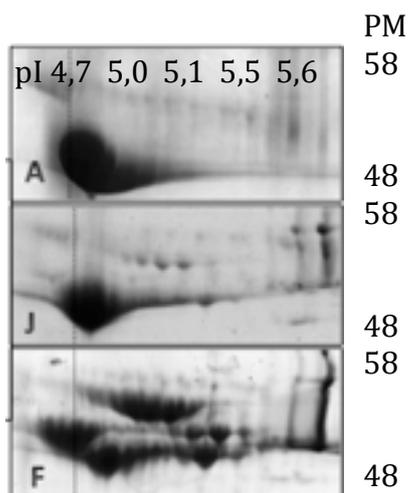


Figura 20. Detalhes do gel 2D-SDS-PAGE do grupos A, L e M (metaloproteinases), com 48-62kDa e pI 4,4-5,8. Grupo B (LAAO) 58-66kDa e pI 5,5-5,9.

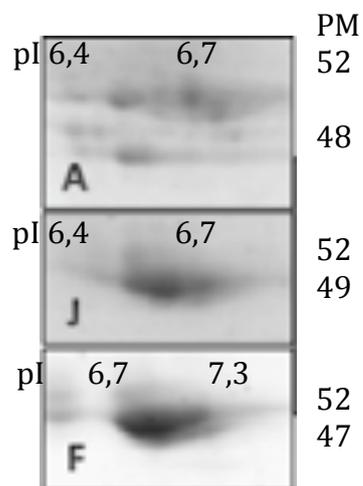


Figura 21. Detalhes do gel 2D-SDS-PAGE do grupo C (metaloproteinases), com 47-56kDa e pI 6,7-7,3.

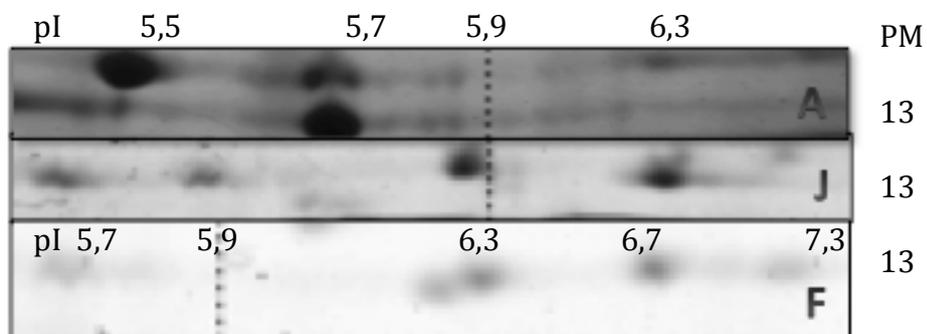


Figura 22. Detalhes do gel 2D-SDS-PAGE do grupo X (VEGFs). As ampliações mostram as variações proteicas nas bandas de acordo com a idade das serpentes, o grupo X é característico de variação ontogenética. Apresentando 13kDa e pI 5,6-8,0, nos venenos de J e F.

4.3. Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa

Fracionou-se o veneno bruto de *Bothrops atrox* em Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa (RP-HPLC) e obteve-se perfis reprodutíveis, resultando nas eluições de 29 frações de veneno de A e J, e 28 frações de veneno de F. As frações majoritárias nas figuras 23, 24, 25, referem-se àquelas que podem apresentar algum tipo de atividade biológica e farmacológica. O perfil cromatográfico obtido de 5 mg de veneno bruto, em coluna C18 de fase reversa foi similar entre os venenos brutos de A, J e F de *Bothrops atrox*, revelando diferenças hidrofílica / hidrofóbica e diferenças quantitativas entre as frações, como é mostrado na figura 14. Na análise dos perfis cromatográficos das amostras nota-se que ocorre um deslocamento das proteínas para a parte mais hidrofílica da amostra de veneno de F para a amostra de veneno de A, e também observou-se os diferentes arranjos proteicos apresentados nas figuras 23, 24, 25 e 26.

Nos perfis dos venenos de *B. atrox* A, J e F, pode-se observar a presença de determinados grupos de proteínas com a ajuda do SDS-PAGE e seu respectivo pico cromatográfico.

No perfil do veneno de A observou-se a presença de PIII-SVMP por similaridade do SDS-PAGE nos picos 28 e 29 que aparecem com massas entre 48 e 51 kDa, nos picos 15, 25 e 27 observamos a presença de PI-SVMP com massa entre 23 e 25 kDa. Nos picos 16, 18, 22, 23 e 24 observamos a presença de serinoproteases com massas entre 25 e 41 kDa. As lectinas são observadas no pico 17 com massa próxima de 32 kDa. Nos picos 22, 23 e 25 presencia-se a LAAO com massa entre 52 e 60 kDa. As CRISPs são observadas nos picos 12, 13 e 14 com massas entre 25 e 27 kDa. As PLA₂s aparecem nos picos 18, 28 e 29 com massa próxima de 17 kDa.

No veneno de J observa-se a presença das classes PI e PIII de metaloproteases por similaridade do SDS-PAGE nos picos 17 e 26 com massa entre 23 e 25 kDa, e nos picos 23 e 29 aparecem com massas entre 48 e 51 kDa, respectivamente. Nos picos 15, 19, 22, 23, 28 e 29 observou-se a presença de serinoproteases com massas entre 25 e 41 kDa. As lectinas são observadas no pico 22 com massa próxima de 32 kDa. Nos picos 23 e 29 presencia-se também a LAAO com massa entre 52 e 60 kDa, além das SVMP. As CRISPs são observadas no pico 14 e 15 com massas entre 25 e 27 kDa. As PLA₂s aparecem nos picos 15-17, 23, 25-29 com massa entre 13 e 17 kDa.

No veneno de F observa-se a presença de PIII-SVMP por similaridade do SDS-PAGE nos picos 21, 23-28 aparecem com massas entre 48 e 51 kDa, nos picos 16 e 21 observamos a

presença de PI-SVMP com massa entre 23 e 25 kDa. Nos picos 11, 13, 18-20 e 26 observou-se a presença de serinoproteases com massas entre 25 e 41 kDa. As lectinas são observadas nos picos 18, 19 com massa próxima de 32 kDa. Nos picos 23 e 26 presenciamos a LAAO com massa entre 52 e 60 kDa. As CRISPs são observadas nos picos 11 e 15 com massas entre 25 e 27 kDa. As PLA₂s, provavelmente, aparecem nos picos 14, 15, 19, 23, 24, 27 e 28 com massa entre 13 de 17 kDa.

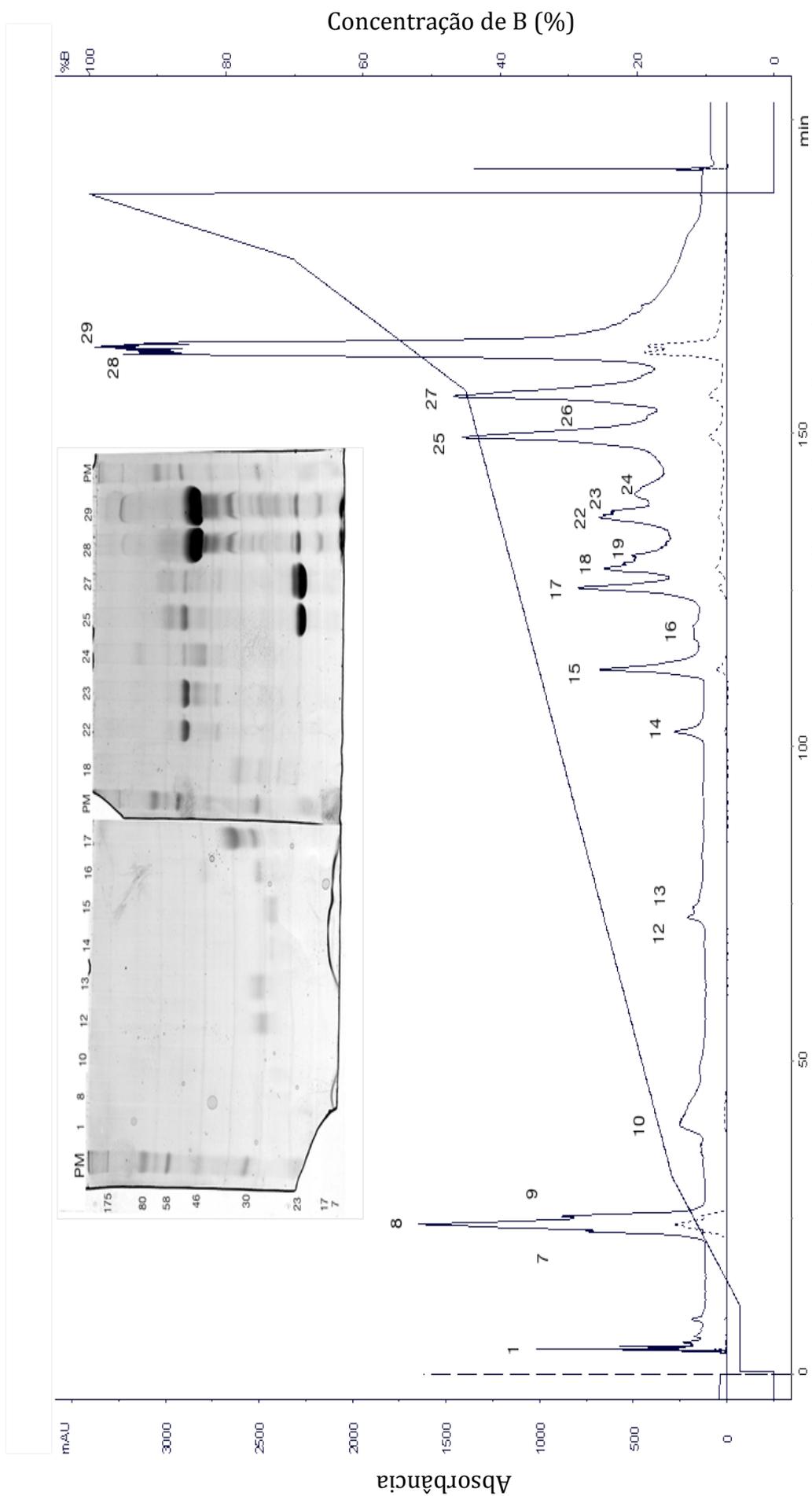


Figura 23. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha bruta de *B. atrox* A com detalhe do gel monodimensional de SDS-PAGE, as frações majoritárias do veneno bruto e seu tempo de retenção. Fracionamento por RP-HPLC, coluna analítica C18 Discovery. Fluxo de 1,0 mL/min, no seguinte gradiente do eluente B: 5% por 10 min, de 5-15% por 20 min, de 15-45% por 120 min, de 45-70% por 20 min e de 70-100% por 10 min, eluente A (TFA 0,1%) e eluente B (ACN 99,9%). As frações cromatográficas foram monitoradas em 215nm linha cheia (preta) e 280nm (tracejada).

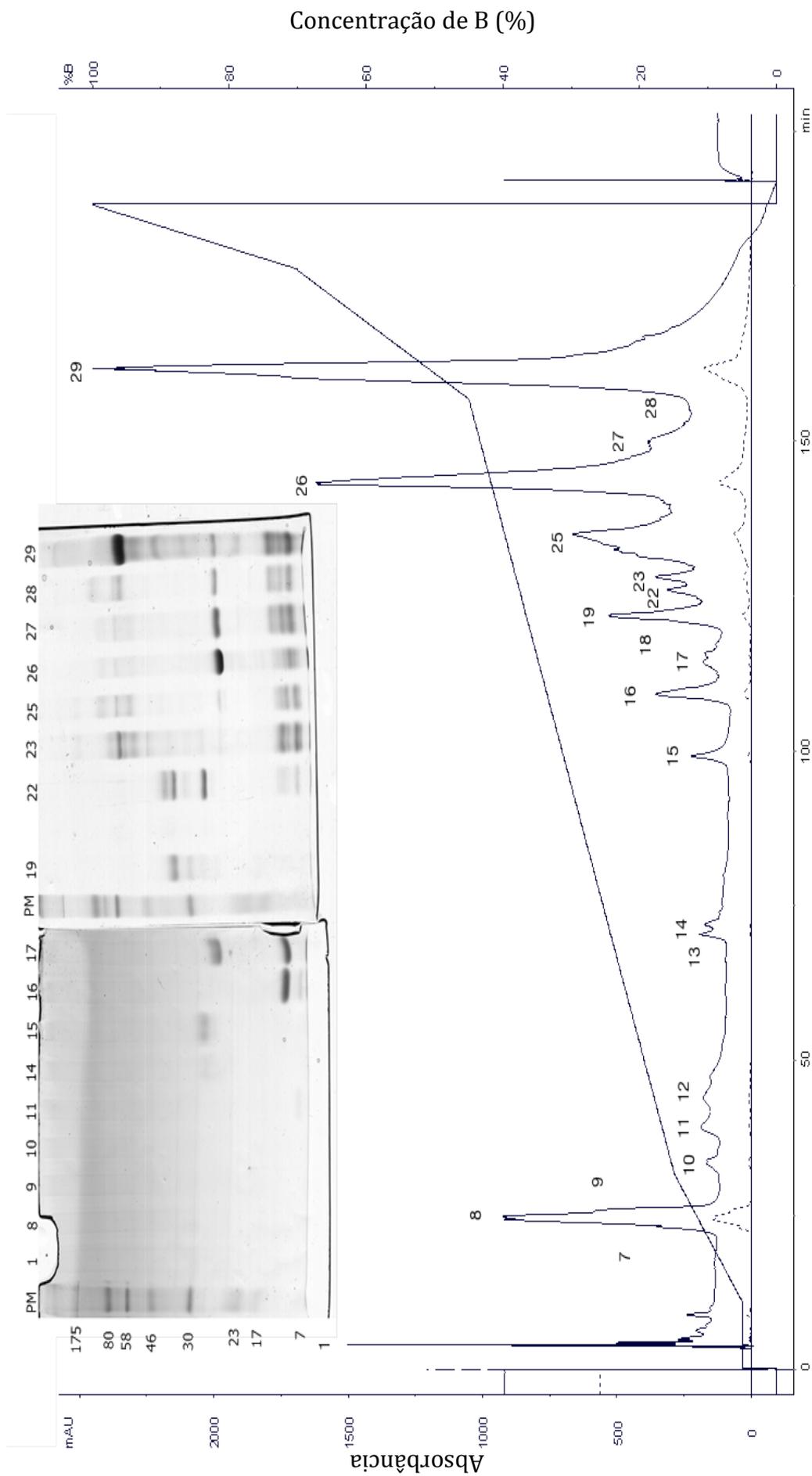


Figura 24. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha bruta de B. atrox J com detalhe do gel monodimensional de SDS-PAGE, as frações majoritárias do veneno bruto e seu tempo de retenção. Fracionamento por RP-HPLC, coluna analítica C18 Discovery. Fluxo de 1,0 mL/min, no seguinte gradiente do eluente B: 5% por 10 min, de 5-15% por 20 min, de 15-45% por 120 min, de 45-70% por 20 min e de 70-100% por 10 min, eluente A (TFA 0,1%) e eluente B (ACN 99,9%). As frações cromatográficas foram monitoradas em 215nm linha cheia (preta) e 280nm (tracejada).

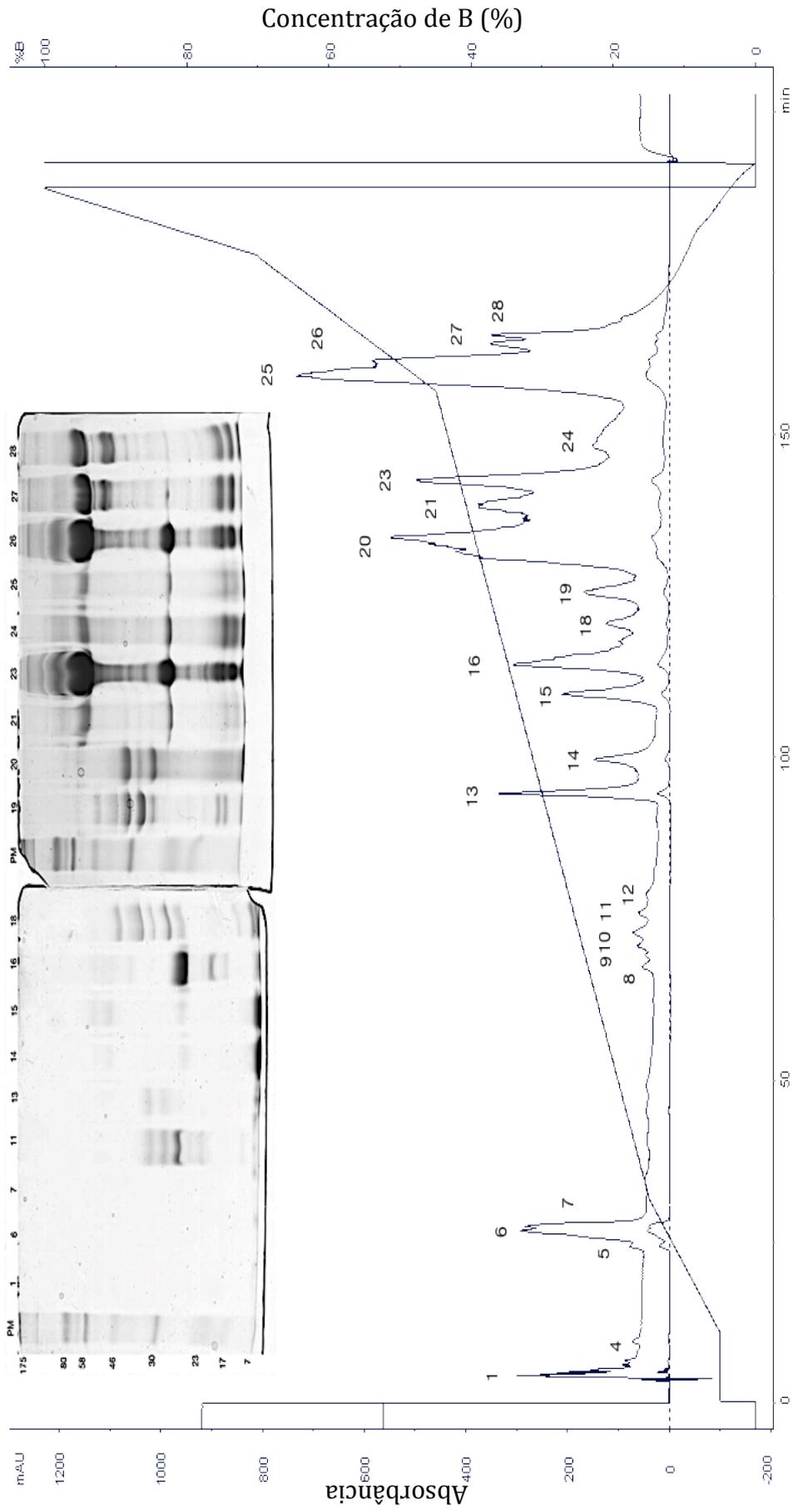


Figura 25. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha bruta de *B. atroxF* com detalhe do gel monodimensional de SDS-PAGE, as frações majoritárias do veneno bruto e seu tempo de retenção. Fracionamento por RP-HPLC, coluna analítica C18 Discovery. Fluxo de 1,0 mL/min, no seguinte gradiente do eluente B: 5% por 10 min, de 5-15% por 20 min, de 15-45% por 120 min, de 45-70% por 20 min e de 70-100% por 10 min, eluente A (TFA 0,1%) e eluente B (ACN 99,9%). As frações cromatográficas foram monitoradas em 215nm linha cheia (preta) e 280nm (tracejada).

Na análise dos perfis cromatográficos das amostras notamos que ocorre deslocamento hidrofóbico das proteínas em decorrência do desenvolvimento ontogenético das serpentes, e também observamos os diferentes arranjos proteicos variando a classe das proteínas e peptídeos produzidos (Figuras 23; 24; 25 e 26). A parte inicial do gradiente de acetonitrila (ACN) da cromatografia de fase reversa resolve peptídeos e proteínas pequenas (0,4 - 7 kDa), que não seriam recuperados a partir de uma separação bidimensional de eletroforese.

Na análise dos gráficos observa-se as porcentagens dos picos relativos em cada corrida, esta apresenta um deslocamento hidrofóbico com o desenvolvimento das serpentes, que fica demonstrado uma mudança nas características proteicas e peptídicas dos componentes dos venenos. Tais alterações podem ser visualizadas nos perfis cromatográficos pelo tempo de retenção dos picos proteicos (Fig. 26).

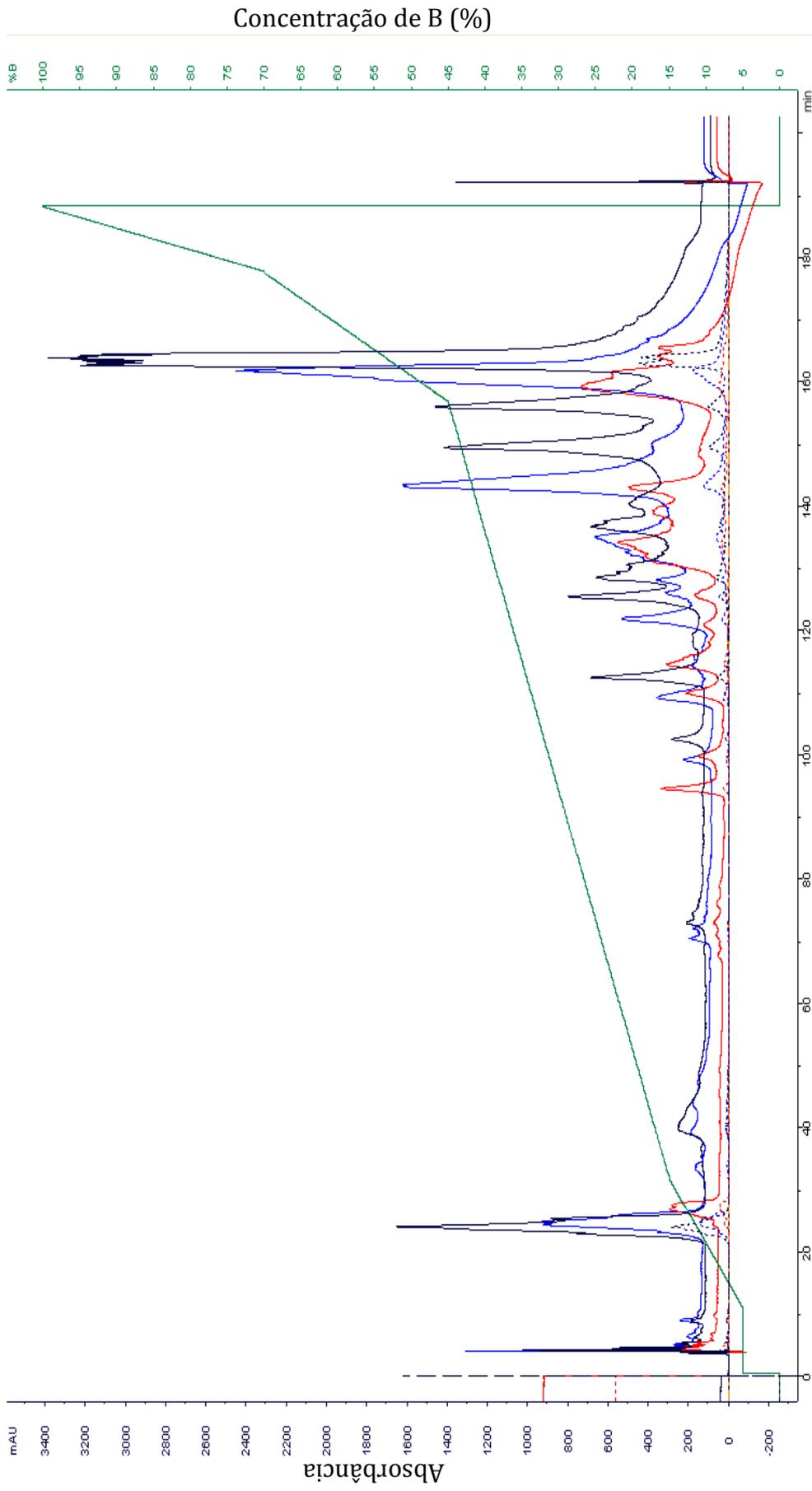


Figura 26. Sobreposição dos cromatogramas de *B. atrox* adulta (preta), jovem (azul claro) e filhote (vermelho), as linhas cheias demonstram o comprimento de onda de 215nm, e pontilhadas 280nm. Pode-se observar as diferenças proteicas e seus respectivos tempos de retenção.

4.2.1 Cromatografia Por Exclusão Molecular

A eluição em coluna Superdex Peptide 10/300 GL apresentou o cromatograma representado nas figuras 27 e 28, que mostra as frações obtidas em uma corrida de 60 min, na primeira fração (A7-B12) estão as proteínas de alta massa e restante originando 6 frações (B11-B9; B8-B7; B6-B5; B4; B3-B1 e C1-C7) onde predominam os peptídeos.

A fração B11-B9 inicialmente foi a que apresentou o peptídeo de massa 1384,7 m/z, que foi sequenciado e caracterizado por similaridade com os BPPs de outras serpentes do gênero *Bothrops*.

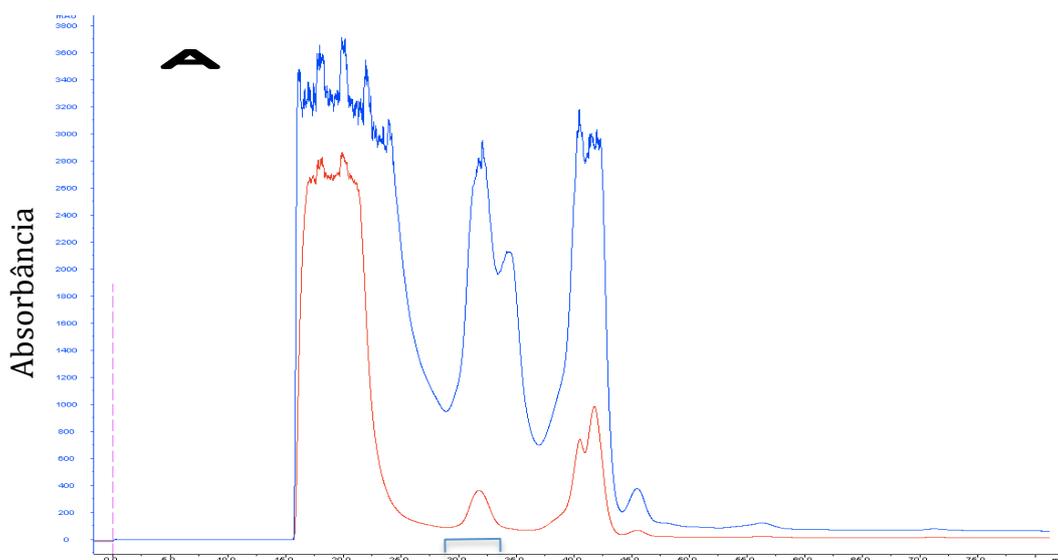


Figura 27. Fracionamento de 50 mg do veneno de *B. atrox* A em coluna peptide 10/300 GL, com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, com fluxo de 1 mL por minuto. Obtendo-se 7 frações distintas e analisando-se a fração B11-B9 (28-34 min). O conjunto de BPPs foi identificado nesta fração (área em destaque). Em azul mostra perfil em 215nm e em vermelho 280nm.

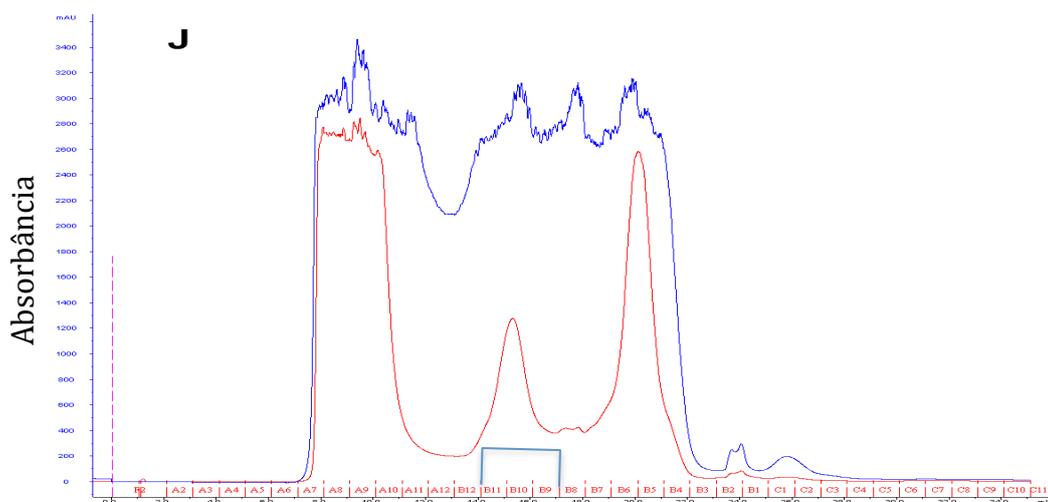


Figura 28. Fracionamento de 50mg do veneno de *B. atrox* J em coluna peptide 10/300 GL, com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, com fluxo de 1 mL por minuto. Obtendo-se 7 frações distintas e analisando-se a fração B11-B9 (28-34 min). O conjunto de BPPs foi identificado nesta fração (área em destaque). Em azul mostra perfil de 215nm e em vermelho de 280nm.

4.3. Espectrometria de Massa – MALDI

Espectrometria de Massa (MS) é uma técnica usada para determinação da massa molecular de peptídeos e proteínas. Nestas análises iniciais temos o valor de m/z e intensidade dos picos das frações peptídicas previamente purificadas do veneno de A e J (Figs. 27 e 28).

Os perfis de massas moleculares característicos dos venenos de *B. atrox* A e J, foram obtidos por meio de análises de espectrometria de massa em sistema MALDI-TOF de cada uma das frações cromatográficas obtidas dos respectivos fracionamentos. A tabela 4 apresenta os cinco peptídeos detectados no veneno de A e J, separados por faixas de massa (m/z).

As massas obtidas por fração cromatográfica em fracionamento por RP-HPLC/C-18 do veneno bruto de *B. atrox* A, J e F, geraram dados obtidos a partir de análise utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF, nos modos refletor (matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico), com intervalo de faixa de 500 a 7.000 m/z e 6.000 a 70.000 m/z .

O espectro de massa (MALDI-TOF²) dos venenos de *Bothrops atrox* A (fig. 29) e J, previamente fracionados em sistema HPLC em coluna de exclusão, apresentou valores em m/z de possíveis peptídeos presentes no veneno ionizadas, entre elas os peptídeos de interesse, matriz de ionização ácido- α -ciano-4-hidroxicinâmico, operado no modo *reflectron*, *power* 85. O espectro mostrou peptídeo de massa 1384,84 Da, que foi sequenciado e caracterizado por homologia com outras BPPs. Os demais peptídeos serão analisados posteriormente.

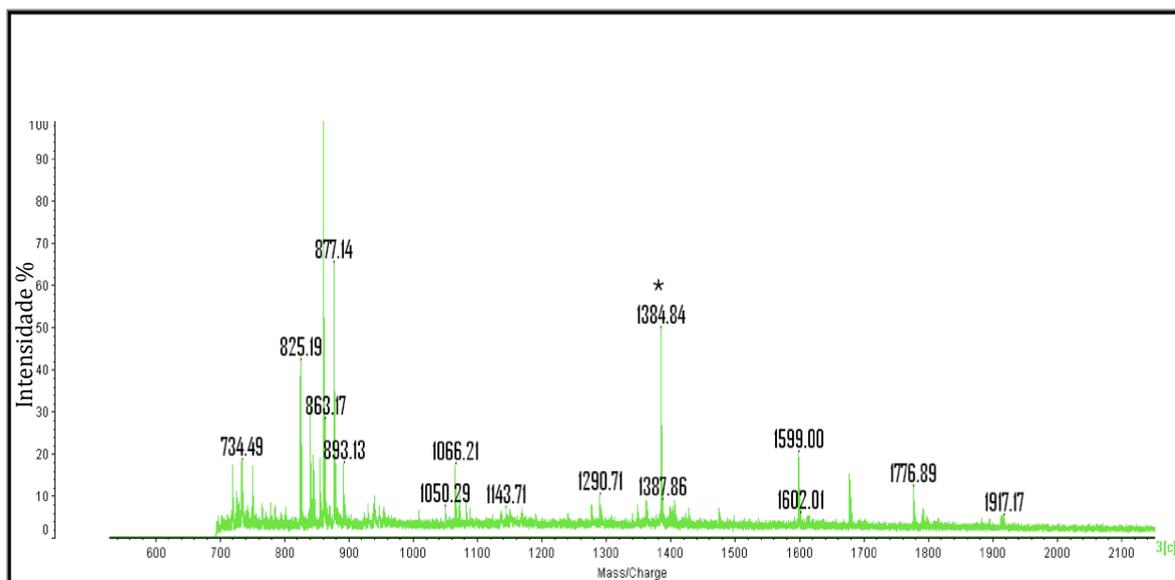


Figura 29. Espectro de massa (MALDI-TOF²) do veneno de *Bothrops atrox* A previamente fracionado em sistema HPLC. O espectro mostra valores em m/z possíveis de peptídeos presentes no veneno ionizadas, entre elas os peptídeos de interesse. O espectro mostra peptídeo(*) de massa 1384,84 Da foi caracterizado por homologia como um BPP.

No sequenciamento pelo método *De novo*, no *software pep-seq*. Pode-se verificar a apresentação da fragmentação do íon de 1384,73 m/z com seus respectivos aa representados em azul a série B e em vermelho a série Y. O peptídeo identificado possui 12 aa, e seu N-terminal é bloqueado, com o ácido piroglutâmico (Z) (Fig. 30). Por homologia (Tabela 6) identificou-se um BPP (Fig. 31). Ao todo foram identificados 5 BPPs, como mostra a tabela 5. A análise por espectrometria de massa das frações cromatográficas revelam um pico de alta intensidade de íon duplamente protonado a 692,8732 m/z [$M^{+2} H$]. O íon foi selecionado e submetido à colisão induzido por dissociação (CID) com gás argônio resultando num espectro de massa (Fig. 30), o qual foi submetido a identificação de A^+ , B^+ , e y^+ do tipo de fragmentos de diagnóstico e íons imônios para sequenciamento do peptídeo pelo método *de novo* (ver Tabelas 1 e 2 do anexo). A análise revelou um peptídeo de 12 resíduos rico em prolina [Pyr-Lys-Trp-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro-Glu-Ile/Leu-Pro-Pro] com dois resíduos de prolina consecutivos conservados na região C-terminal, uma característica do BPP da família de inibidores da ECA, e um N-terminal do ácido piroglutâmico (Pyr), o que pode ser derivado a partir de resíduos de ácido glutâmico ou glutamina, tal como observado em outros estudos dos BPPs dos venenos descritos de serpentes da espécie *Bothrops*. A massa medida do peptídeo monoisotópico (1.384,7386) e teórica (1.384,7378) foram muito semelhantes, mostrando uma exatidão de massa de 0,6 ppm, o que também foi observado para o diagnóstico de fragmentos de íons identificados (ver tabela 1 e 2 do anexo), mostrando assim a elevada precisão da análise. O BPP foi nomeado BPP-BAX12 sendo o primeiro peptídeo pertencente à família BPP, um inibidor da ECA, descrito para *Bothrops atrox*.

Tabela 6. Massa dos cinco novos BPPs da espécies *Bothrops atrox* de PVH.

Veneno de A (Da)	Veneno de J (Da)
691,21	1074,99
1116,54	1116,56
1146,55	1146,55
1384,39*	1384,67*

* BPP que apresenta-se sequenciada.

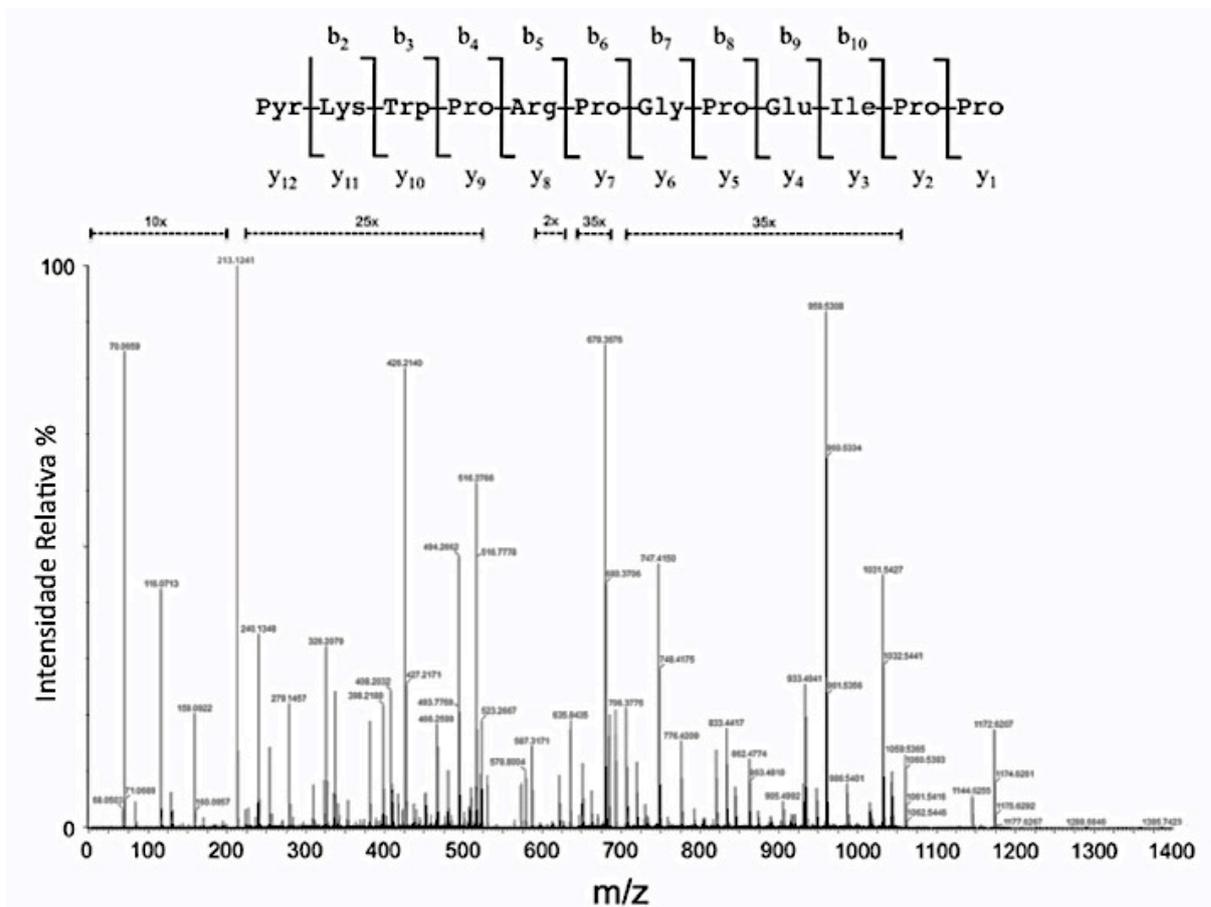


Figura 30. Espectro da Dissociação induzida por colisão espectro de BPP-BAX12. A sequência deduzida é mostrada na parte superior do perfil de MS/MS. A inserção mostra a sequência do peptídeo designado. Equipamento XEVO-Waters (SOUZA et al., 2008).

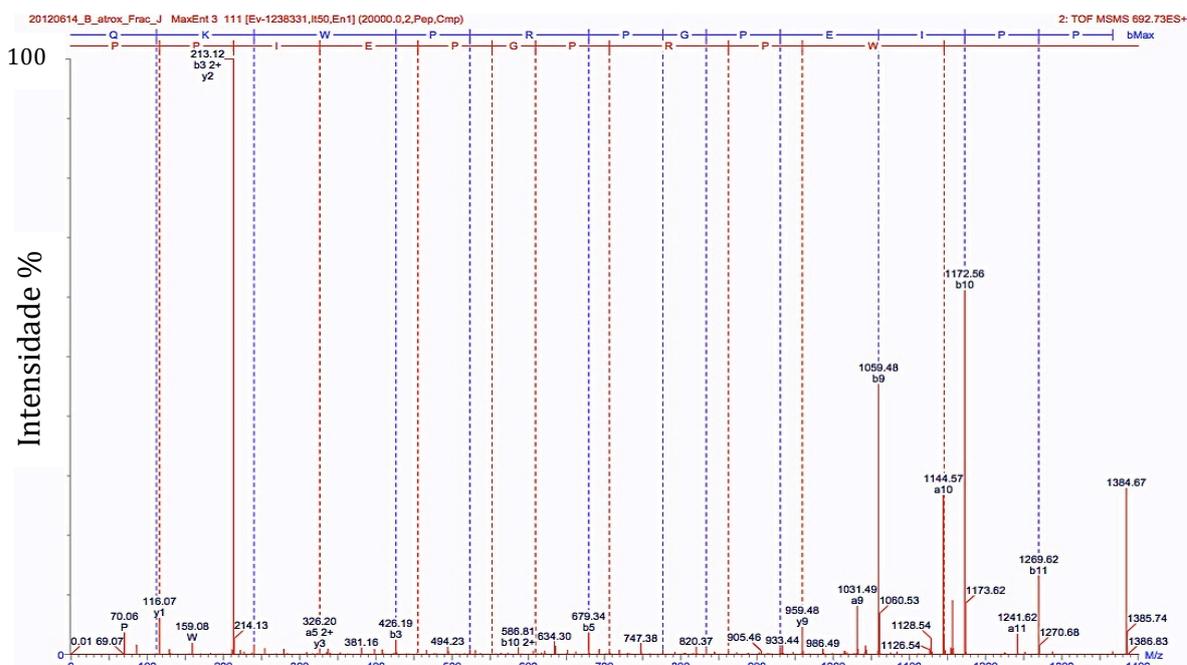


Figura 31. Sequenciamento pelo método *De novo*, no software *PepSeq*. Apresentação da fragmentação do íon de 1384,7 m/z com seus respectivos aa representando em azul a série B e em vermelho a série Y. Possui 12 aa, e seu N terminal é bloqueado, com o ácido piroglutâmico.

Tabela 7. Alinhamento de sequências entre BPP-BAX12 e Piroglutamato/peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) sequências de outras espécies do gênero *Bothrops*.

BPP Nome	Sequencia	Espécie <i>Bothrops</i>	Referência
BPP-BAX12	ZKWPRPGPEIPP	<i>Bothrops atrox</i>	COUTINHO-NETO et al., 2013
-	ZKWPRPGPEIPP	<i>B. moojeni</i>	MENIN et al., 2008
-	ZNWPRPGPEIPP	<i>B. moojeni</i>	MENIN et al., 2008
BPP3_BOTNU, BPP13_BOTMO, BPP13_BOTLC, BPP13_BOTER, BPP13_BOTAL, BNP_BOTIN, BNP2_BOTJA, BNP1_BOTJA, Q8QG90_BOTIN, BNP_BOTJR #	ZGGWPRPGPEIPP	<i>B. neuwiedi, B. moojeni, B. leucurus, B. erythromelas, B. alternatus, B. insularis, B. jararaca, B. insularis, B. jararacussu</i>	WERMELINGER et al., 2005; FERREIRA et al., 1998; SOUZA et al., 2008; CINTRA et al., 1990; HAYASHI et al., 2003; RIOLI et al., 2008.
BPP-13a	ZGGWPRPGPEIPP	<i>B. cotiara, B. fonsecai</i>	TASHIMA et al., 2012
BPP-13b	ZGGLPRPGPEIPP	<i>B. cotiara, B. fonsecai</i>	

#Nome de entrada no *UniProtKB*.

5. DISCUSSÃO

A dosagem de proteínas pelo método de Bradford demonstrou uma recuperação proteica da ordem de 88 a 100% em relação aos venenos pesados da espécie *B. atrox*. Como descrito por FURTADO e colaboradores em 1991, o teor proteico verificado foi de 90% de recuperação e similar ao apresentado para diferentes venenos botrópicos.

Os venenos de serpentes evoluíram a partir de um conjunto restrito de genes comuns recrutados e transformados em toxinas na glândula de veneno, precocemente durante a evolução de répteis Squamata (FRY et al., 2006; 2009). Conseqüentemente, os proteomas de venenos de serpentes existentes pertencem a apenas um grupo de famílias de proteínas importantes (CALVETE et al., 2007; 2009; CALVETE, 2010a), e assim a fenotipagem do veneno permite a rápida comparação de perfis de toxinas e a classificação precisa das frações cromatográficas em famílias de toxinas, sem a necessidade de caracterização estrutural extensa (CALVETE, 2010b).

A serpente *Bothrops atrox* é endêmica da região amazônica sendo encontrada no perímetro da zona de Porto Velho. Os espécimes estudados foram capturados na região das hidrelétricas de Rondônia e próximas a capital, entre 2009 e 2011. Os ensaios de atividades biológicas demonstraram que os venenos de animais em desenvolvimento, sendo J e F, possuem alto potencial hemolítico, miotóxico e hemorrágico, sendo duas vezes mais potentes que o veneno de *B. atrox* Adulta. Em humanos, o envenenamento por mordedura pela *B. atrox* provoca efeitos locais tais como edema, hemorragia e necrose local, além de efeitos sistêmicos, incluindo alterações na coagulação do sangue e vários tipos de sangramento distante do local da picada (SILVA et al., 2003). Alteração da hemostasia arterial e trombose são em grande parte causadas por proteinases, especialmente metalo e serinoproteinases que correspondem a um dos principais componentes de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (MATSUI et al., 2000). Mudanças ontogenéticas na dieta e na composição do veneno são características frequentemente observadas em espécies deste gênero (ANDRADE et al., 1996).

Os venenos de *B. atrox* F e J são mais hemorrágicos, apresentando maior atividade do que os de espécimes adultos, enquanto o jovem tem maior atividade hemolítica indireta, ou seja, maior atividade de fosfolipase A₂. Ainda apresentam maior número de bandas com

moléculas de altas massas no perfil eletroforético do que venenos de exemplares adultos. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores efetuadas com o veneno de *B. atrox* do Brasil (MEIER, 1996).

O veneno altera o tempo de coagulação (TC) por possuir uma ação sobre os fatores de coagulação. Os componentes do veneno clivam o fator X ou fator II (protrombina) da cascata de coagulação, denominados como ativadores do tipo pró-coagulantes, gerando trombina, que por sua vez hidrolisa o fibrinogênio em fibrina. No entanto, os ativadores do tipo trombina-símile são aqueles que clivam diretamente o fibrinogênio em fibrina, sem a necessidade de geração de trombina. Serpentes do gênero *Bothrops* apresentam tais características em seus venenos, eles diminuem o TC, por atuarem sobre fatores da cascata de coagulação, sobre a trombina ou sobre o fibrinogênio diretamente (GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980c; GUTIÉRREZ et al., 1984; QUEIROZ; PETTA, 1984; BRAUD et al., 2000). Evidenciando a melhor atividade do veneno de *B. atrox* F, sobre os demais venenos testados.

O perfil eletroforético dos venenos de *B. atrox* revelaram sob condições não redutoras a presença de bandas proteicas majoritárias nas faixas de 92, 52, 37 e 21 kDa nos venenos estudados. As bandas mais intensas no veneno de espécimes adultos de *B. atrox* corresponderam à proteínas de 23 e 50 kDa, que são provavelmente as metaloproteinases. Nos filhotes e jovens, observa-se ainda maior quantidade de proteínas na faixa dos 30 kDa e nas faixas abaixo de 17 kDa, como previamente demonstrado por SDS-PAGE por outros autores (LOPEZ-LOZANO et al., 2002; GUÉRCIO et al., 2006). Confirmou-se na análise realizada que o perfil protéico de *B. atrox* altera-se significativamente com o envelhecimento do animal e sua localização geográfica, em decorrência da diferenciação do seu habitat e dieta alimentar. A variação ontogenética na composição do veneno de serpente foi demonstrada numa série de espécies. Em alguns casos, venenos de espécimes filhotes e jovens têm maior toxicidade do que aqueles provenientes de amostras de adultos, como demonstrado, em *Crotalus durissus* na América Central (LOMONTE et al., 1983; GUTIÉRREZ et al., 1991; SALDARRIAGA et al., 2003). Outras espécies de *Bothrops* do Brasil apresentam maior toxicidade em espécimes adultos (FURTADO et al., 1991).

As metaloproteinases de veneno de serpente (SVMPs) são classificadas em quatro grupos (PI para PIV) com base em sua massa molecular, estrutura de domínios e intensidade hemorrágica. Grupo PI-SVMPs consiste de metaloproteinases que contêm apenas o domínio

de protease, têm massas moleculares variando de 20-30 kDa e atividade hemorrágica fraca. O grupo PII-SVMPs é composto de 30-60 kDa proteínas que contêm tanto o domínio protease o semelhante a desintegrina. Proteínas do grupo PIII-SVMPs incluem um domínio rico em cisteína, e as proteínas PIV-SVMPs contêm um domínio adicional de lectina-like (FOX e BJARNASON, 1995; FOX e SERRANO, 2005; DU et al, 2006). Os venenos de *B. atrox* de F e J apresentam uma maior atividade hemorrágica, demonstrando a presença, por SDS-PAGE, de proteínas entre 30 e 70 kDa, o que pode sugerir predomínio de metaloproteases hemorrágicas das classes PII e PIII. Na literatura as PI-SVMPs são descritas como proteínas de baixa atividade hemorrágica por exibirem um único domínio proteolítico apresentando massas moleculares a partir de 20 a 30 kDa (LOPES et al., 2009). Alguns exemplos são representados pelas Batroxase de 22,9 kDa de *Bothrops atrox* (CINTRA et al., 2012); BnP1 de 24 kDa de *B. neuwiedi* (BALDO et al., 2008), BlaH1 de 28 kDa de *B. lanceolatus* (STROKA et al., 2005), leucurolysin-A de 23 kDa de *B. leucurus* (GREMSKI et al., 2007), atroxlysin-I de 23 kDa de *B. atrox* (SANCHEZ et al., 2010), e a BJSSUMP-II de 24kDa de *B. jararacussu* (MARCUSI et al., 2007).

É possível que a variação da localização geográfica influencie na composição do veneno pela seleção natural de presas na alimentação local (DALTRY et al., 1996; PIFANO e RODRIGUEZ-ACOSTA, 1996). Outros autores relataram que uma mesma espécie de serpente, que vive em diferentes locais difere na sua composição química e toxicidade do veneno (YANG et al., 1991). Por exemplo, o veneno de serpente tigre (*Notechis scutatus*) de Mount Gambier e Melbourne e também, uma outra população no Lago Alexandrina no sul da Austrália, teve componentes neurotóxicos (notexin e scutoxin) pré-sinápticos, que variaram em suas quantidades proporcionais, assim como observado para as *B. atrox* dispersas no eixo fronteiro transamazônico abrangendo o Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Perú (NÚÑEZ et al., 2009; CALVETE et al., 2011).

Demonstrou-se claramente em trabalhos anteriores (YANG et al., 1991; COVINATO et al., 1998; NÚÑEZ et al., 2009; CALVETE et al., 2009; CALVETE et al., 2011) que a variação da localização geográfica tem notória contribuição para a diferenciação da quantidade proteica presente nos venenos das serpentes estudadas neste trabalho, e corroboram para a apreciação das variações ontogenéticas intra e inter espécimes.

Além disso, a SDS-PAGE e perfis de proteínas de HPLC dos venenos variaram entre os três estágios de desenvolvimento analisados (fig. 18). Duas proteínas de 23 e 50 kDa, respectivamente, que estavam presentes em maiores quantidades em venenos de *B. atrox* A, foram identificadas como metaloproteinases (fig. 19). Observou-se ainda que o veneno de *B. atrox* J e A, no gel não reduzido, apresentaram bandas na faixa de 37 kDa em quantidade maior que nos venenos de Filhote. Entre outros fatores, a composição de venenos de serpentes é afetada pela idade dos animais. Um estudo comparativo da atividade proteolítica e perfis de proteínas de venenos de F, J e A de espécimes de *Bothrops atrox* capturados na floresta amazônica brasileira foi relatado previamente (GUÉRCIO et al., 2006; KOHLHOFF et al., 2012) sendo observado a variação relevante nas quantidades de proteínas e suas isoformas expressas na peçonha dos animais com diferentes idades. López-Lozano e colaboradores (2002) demonstraram que venenos de *B. atrox* F e J apresentaram maior atividade de coagulação do plasma humano em comparação com venenos de espécimes Adultas. Os três venenos de *B. atrox* avaliados hidrolisam os substratos NBD-PC e NBD-PA, sendo o veneno de espécimes F o mais potente sobre ambos os substratos de fosfolípidios fluorescentes, os venenos apresentaram melhor atividade para hidrolisar NBD-PC em pH de 7,5, que está de acordo com o trabalho de diversos autores (STOCKER e BARLOW, 1976; HOLLEMAN e WEISS, 1976; BANERJEE et al., 1960; LEITE et al., 1992).

Um estudo independente de espécimes de *B. atrox* da floresta amazônica colombiana mostrou que venenos de espécimes F e J causaram maior letalidade e possuíam maiores atividades hemorrágica e coagulante, do que venenos de espécimes Adultas. As diferenças nas atividades foram atribuídas ao aumento da quantidade de proteínas de elevado peso molecular, provavelmente, também metaloproteinases (SALDARRIAGA et al., 2003). Analisando em conjunto, estas e outras evidências publicadas indicaram que alterações no proteoma do veneno durante o desenvolvimento ontogenético pode influenciar sua atividade biológica (CHIPPAUX et al., 1991; DALTRY et al., 1996; CALVETE 2009; FRY et al., 2009; CALVETE et al., 2011). Neste trabalho, apresentou-se uma análise comparativa do proteoma do veneno de *B. atrox* de espécimes F, J e A, que permite identificar as proteínas, cuja expressão diferencial durante o desenvolvimento ontogenético pode ser correlacionada com as propriedades previamente relatadas do veneno (LOPEZ-LOZANO et al., 2002; SALDARRIAGA et al., 2003).

A análise comparativa proteômica detalhada do veneno de *B. atrox* F, J e A da região de Porto Velho revelou mudanças ontogenéticas significativas nessas populações geográficas. A variação é particularmente notável, em relação ao equilíbrio entre duas das famílias de proteínas de venenos mais comuns, isto é, metaloproteinases e PLA₂s (Figs. 17 e 18). Entre as serpentes *B. atrox*, as amostras de filhotes expressaram no seu veneno, maior quantidade de PIII- e PI-SMVP, uma proporção maior de PLA₂s, apresentando também algumas moléculas que não foram observadas nos adultos na faixa molecular abaixo de 17 kDa e entre 23 e 35 kDa. A variação ontogenética do veneno pode dotar as serpentes adultas com a capacidade para se adaptar a diferentes nichos ecológicos e disponibilidade de presas. A mudança ontogenética correlaciona-se com as características bioquímicas e perfil farmacológico dos venenos de espécimes recém-nascidos e juvenis, para os quais a alimentação com presas de grande porte pode ser perigosa para uma serpente pequena, se esta não for liberada imediatamente após a mordedura. *Bothrops* Jovens (*B. asper* e *B. atrox*) apresentaram maior letalidade, atividade hemorrágica, edematogênica e coagulante do que venenos de serpentes adultas, as quais apresentam maior atividade de fosfolipase A₂ (SALDARRIAGA et al., 2003). Essa variação ontogenética vem mostrando que a exigência de veneno para subjugar a presa pode mudar com a idade da serpente. O teor mais elevado de PIII-SMVP nos venenos de filhotes do que naqueles de espécimes adultos está de acordo com a sua atividade hemorrágica mais potente, como previamente relatado (GUTIÉRREZ et al., 1980; CHAVES et al., 1992) e o menor teor de PLA₂s homólogas básicas, relacionado com sua menor atividade miotóxica (GUTIÉRREZ et al., 1980). No entanto, no veneno dos filhotes de *B. atrox* de PVH, a atividade miotóxica foi maior em comparação com a atividade de exemplares adultos (Fig. 5). Provavelmente porque a quantidade de isoformas destas proteínas miotóxicas apresentaram maior quantidade.

Apenas um pequeno número de sequências completas de proteínas de *B. atrox* estão atualmente disponíveis em base de dados, e, por conseguinte, o âmbito da identificação de proteínas é ainda muito limitado (GUÉRCIO et al., 2006). As 29 frações isoladas por RP-HPLC a partir dos venenos de *B. atrox* A, J e F (Fig. 26), constituem pelo menos de 21 proteínas e algumas isoformas (Figuras 23, 24, 25), que pertencem a 7 grupos diferentes de proteínas (Fig. 18, Tabela 5). As famílias de proteínas principais são SVMPS, incluindo as classes PI e PIII, que são proteínas majoritárias do veneno total. Em um sentido estrito, os montantes calculados pela relação corresponde a "uma porcentagem do total de ligações peptídicas na amostra", que é uma boa estimativa da porcentagem em peso (g/100 g)

particularmente de um componente do veneno (CALVETE et al., 2007). Este procedimento permite a recuperação quantitativa de todos os componentes do veneno compreendidos na faixa de massa molecular aparente de 7-150 kDa que podem ser separados por 2D-SDSPAGE convencional (CALVETE et al., 2007). Grupos de outras proteínas encontradas em proporções significativas são as PLA₂s, serinoproteínases (SVSPs) e LAAOs, e três famílias de proteínas menores: desintegrinas, CRISP e Lectinas tipo C. Este resultado está de acordo com alguns estudos proteômicos previamente realizados com o veneno de *B. atrox* do Estado da Amazônia, no Brasil (GUÉRCIO et al., 2006; NUNEZ et al., 2009; KHOLHOFF et al., 2012). Sabe-se que algumas populações de *Bothrops* têm variação ontogenética presentes nos seus venenos (GUÉRCIO et al., 2006; LOPEZ-LOZANO et al., 2002) que é particularmente evidente entre as espécies que possuem uma ampla distribuição geográfica. Com base na análise dos peptídeos por PMF foram classificados os pontos dos mapas 2-DE em 27 grupos (GUÉRCIO et al., 2006). A maior parte dos grupos e aqueles com maior número de pontos correspondem a SVMP e SVSPs. Este resultado concorda com o fato de que venenos de espécies de *Bothrops* são hemotóxicos e promovem hemorragia, edema local e extensa necrose (OROPEZA et al., 2000).

A composição proteômica de venenos de serpentes modificam-se com a idade e, portanto, o estágio de desenvolvimento do organismo que doou a amostra, deve ser levado em consideração. Para este fim, realizou-se uma análise comparativa de proteomas de *B. atrox* em três estágios de maturidade. Para nosso conhecimento, esta análise vem corroborar para o entendimento do proteoma do veneno de serpentes associado com o desenvolvimento ontogenético, embora outros estudos proteômicos em venenos dessa espécie e de outras serpentes tenham sido publicados anteriormente (LI et al., 2004; SERRANO et al., 2005; GUÉRCIO et al., 2006).

Utilizou-se a 2-DE a fim de otimizar a separação de proteínas de *B. atrox*, fita-gel de gradiente não-linear de pH 3-10 executado-se os procedimentos da focalização isoeletrica (IEF). O gradiente não linear, apresenta uma resolução de proteínas ácidas melhor (GUÉRCIO et al., 2006). O aparelho IPGphor da GE Healthcare foi utilizado para a etapa de IEF. Para a segunda dimensão, os géis de gradiente utilizados para obtenção do mapa 2-DE foram de 12% em acrilamida, que apresentaram uma boa resolução das proteínas em seus pIs.

Primeiramente, a análise dos géis 2-DE mostraram que os venenos de *B. atrox* da região de PVH, apresentam proteomas diferentes em determinadas faixas de pI e massa. Nas faixas de 23, 50 e 52 kDa entre os pIs 5,5-6,1; 6,3-8,0 e 4,7-4,9, há indicativo da presença de metaloproteinases, possivelmente PI- e PIII-SVMP, nas três amostras, essas proteínas podem ser consideradas marcadores moleculares do veneno de *B. atrox*, sendo que as proteínas com 23 e 52 kDa estão mais abundantes no veneno de A, as proteínas com 50 kDa estão mais evidenciadas no veneno de F. Outros marcadores ontogenéticos, como os VEGFs com massa aproximada de 13 kDa aparecem somente nos venenos de J e F, entre os pIs 5,9-6,3 e 6,3-7,3 respectivamente. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Guércio e colaboradores (2006), entretanto ocorrem variações dos pIs mencionados. O perfil do veneno de F de PVH é rico em isoformas apresentando um perfil diferenciado intra e inter espécimes.

A identificação de cinco BPPs presentes no veneno de *B. atrox* adultas e jovens indica que pouca atenção foi atribuída para tais moléculas até o momento. A sequência confirmada de forma inédita: ZKWPRPGPEIPP, com 1384,65 m/z, apresenta alta precisão na elucidação dos resíduos de AAs. Núñez e colaboradores (2009) descreveram por *shotgun* a seguinte sequência: ZKWPRPGPEIPP, 1385,1 m/z, pertencente a *B. atrox* das regiões de Medellín, Colômbia e Amazônia brasileira. Portanto, quatro novas BPPs foram identificadas neste trabalho, e uma foi sequenciada minuciosamente e nomeada como BAX12 (COUTINHO-NETO et al., 2013). Os BPPs interferem na homeostase da circulação sanguínea, a princípio inibindo a atividade da ECA. Dessa forma, a aquisição de tal diversidade de isoformas de BPPs bioativas no veneno deve proporcionar uma vantagem evolutiva além de refletir as variações ambientais, como, por exemplo, as experiências alimentares.

No entanto, o papel adaptativo das variações ontogenéticas observadas na composição dos venenos e açõs, permanece indefinida. A *B. atrox* é considerada uma generalista, em sua dieta principal inclui pequenos mamíferos e aves, mas também sapos e lagartos (CAMPBELL e LAMAR, 2004; MARTINS et al 2002). A maioria das espécies de *Bothrops* juvenis alimentam-se de animais ectotérmicos principalmente, mas mudam para presas endotérmicas quando atingem um tamanho suficiente para engolir roedores, marsupiais, aves e outras presas maiores (CAMPBELL e LAMAR, 2004). Mudanças na letalidade do veneno para certos tipos de presas seguem esta tendência geral (MARQUES et al., 2002).

No Brasil, as doenças cardiovasculares têm causado um impacto negativo na qualidade de vida da população. Essas doenças são responsáveis por 65% dos óbitos ocorridos, segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão Arterial. Apesar da disponibilidade no mercado de mais de 75 agentes anti-hipertensivos divididos em 9 classes, o controle da pressão arterial de cada paciente está ainda aquém do desejado (ISRAILI et al., 2007). O captopril foi desenhado com base na estrutura dos BPPs, potentes inibidores da ECA, descobertos no veneno de serpente brasileira *Bothrops jararaca* (FERREIRA et al., 1970). A biotecnologia vem buscando a cada ano produtos bioativos provenientes de moléculas biológicas, como por exemplo: veneno de serpentes, com potencial farmacológico a fim de obter drogas mais eficientes e que possam induzir menos efeitos colaterais visando melhorar a qualidade de vida das pessoas acometidas por patologias, como as decorrentes da hipertensão e problemas vasculares.

Por outro lado, necessita-se de um aprimoramento dos antivenenos, segundo Gutiérrez e colaboradores (2009) e Segura e colaboradores (2010), apesar das diferenças nas misturas de venenos utilizados na imunização de animais para a produção destes antivenenos, estudos pré-clínicos revelaram um grau elevado de proteção cruzada, de vários antivenenos anti-botrópicos contra venenos heterólogos não incluídos nas misturas imunizantes. No entanto, Queiroz e colaboradores (2008) relataram evidência *in vitro*, indicando que o soro utilizado para terapia humana no Brasil não pode neutralizar completamente as atividades tóxicas presentes em todos os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, sugerindo que para a preparação de um antídoto universal botrópico, outros venenos devem ser incluídos na mistura de imunização. Dada a ampla variação geográfica de *B. atrox* e a variabilidade química do seu veneno, os pesquisadores e médicos são aconselhados a especificar a origem geográfica dos espécimes/venenos investigados e os sintomas relatados para o envenenamento ofídico. Os antivenenos podem ser melhorados utilizando-se abordagens venômicas que possam selecionar candidatos para imunização (GUTIÉRREZ et al., 2009) ou epítomos selecionados baseados na estrutura para concepção de anticorpos de elevada afinidade (FERREIRA et al., 2006).

Segura e colaboradores (2010) observaram uma elevada extensão de neutralização cruzada de antivenenos “poliespecífico viperídeo”, fabricados em sete laboratórios de seis países da América Latina, contra os venenos de cinco espécies de *Bothrops* clinicamente relevantes na região. Sobretudo, faz-se necessário o estudo para desenvolver uma rede

regional de laboratórios públicos que trabalhem no controle de qualidade, produção e pesquisa toxicológica na América Latina. Visando, avaliar as capacidades adicionais de neutralização dos antivenenos contra estes e outros venenos de serpentes clinicamente relevantes na região.

6. CONCLUSÃO

Os venenos de *B. atrox* Jovem e Filhote apresentaram atividades miotóxicas, hemorrágicas, hemolíticas e pró-coagulantes maiores que os indivíduos Adultos. A amostra do veneno de Filhote possui maior atividade de Fosfolipase A₂, de serinoproteases e trombine-símile.

Foram identificados os principais grupos de proteínas presentes nos geis bidimensionais, sendo, PIII-SVMP, PI-SVMP, SVSPs, PLA₂s, CRISPs, svVEGF, LAAO, Lectinas tipo C e NGF.

As proteínas majoritárias dos venenos apresentaram 14, 23 e 52 kDa, sendo marcadores do perfil botrópico. Aparecendo nos picos em A: 25-27 e 28-29, respectivamente, em J: 16-17, 26-27 e 29, respectivamente e em F: 14-15, 23-26 e 27-28, respectivamente.

O veneno de *B. atrox* apresenta uma grande diversidade de isoformas nas classes de toxinas mais representativas dos venenos, sendo mais abundante no veneno de Filhote e Jovem, no entanto os marcadores ontogenéticos desaparecem com o avançar da idade do animal.

Os perfis cromatográficos comprovam as variações ontogenéticas, bem como a presença de svVEGF no veneno de *B. atrox* Filhote e Jovem, demonstradas nos géis bidimensional.

O fracionamento do veneno de *B. atrox* Adulta e Jovem na coluna de gel filtração peptide10/300 GL, favoreceu a análise do MALDI e posterior identificação e sequenciamento dos BPPs no espectrômetro XEVOS-Waters. Os BPPs encontrados seguem o padrão característico destas moléculas.

Foram descobertas 5 BPPs para o gênero *Bothrops*, sendo especificamente para a espécie *B. atrox* da região de PVH. Identificados quatro novos peptídeos BPPs e o quinto foi minuciosamente confirmado pela primeira vez. As BPPs identificadas apresentam massas de 691,21; 1074,99; 1116,54; 1146,55 e 1383,65 m/z, a última com a seguinte sequência: **ZKWPRPGPEIPP**, sendo peptídeo denominado de BAX12.

As análises espectrométricas evidenciaram a riqueza de peptídeos presentes nos venenos bruto de *Bothrops atrox*. Também foi possível observar a quantidade de conteúdo peptídico presente no veneno, o que demonstra a alta diversidade molecular encontrada nessa espécie em particular. Portanto, ainda existem muitas moléculas proteicas a serem estudadas e caracterizadas pela grande variedade presente nas amostras analisadas.

7. REFERÊNCIAS

- ABREU, V.A.; DAL BELO, C.A.; HERNANDES-OLIVEIRA, S.S.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; HYSLOP, S.; FURTADO, M.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 148, p.142–149, 2007
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198, 2003
- ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DÍAZ, M.; SANZ, L.; MADRIGAL, M.; ESCOLANO, J.; SASA, M.; CALVETE, J.J. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. **Toxicon**, v. 54, p. 938-948, 2009
- AMERSHAM Biosciences UK Ltd. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients Principles and Methods. **Handbook**, v. 80-6429-60, p. 133-136, 2004
- AMOTT, D.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F. Mass spectrometry of protein and peptides: sensitive and accurate mass measurement and sequence analysis. **Clin. Chem.**, v. 39, p. 2005-2010, 1993
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; SANTOS, M. C. Is the venom related to diet and tail color during *Bothrops moojeni* ontogeny? **J. Herpetol.**, v. 30, p. 285-288, 1996
- ÁVILA-PIRES, T.C.S., HOOGMOED, M.S. & VITT, L.J. Herpetofauna da Amazônia. In *Herpetologia no Brasil II*. (L.B. Nascimento & M.E. Oliveira, eds.). **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, p. 13-43, 2007
- BALDO, C.; TANJONI, I.; LEÓN, I.R.; BATISTA, I.F.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P.B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G.P.; RODRIGUES, V.M.; PERALES, J.; VALENTE, R.H.; MOURA-DA-SILVA, A.M. BnPI, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, p. 54–65, 2008
- BANDEIRA, N.; TSUR, D.; FRANK, A.; PEVZNER, P.A. A new approach to protein identification. In *Proceedings of the 10th Annual International Conference on Computational Molecular Biology*, of *Lecture Notes in Computer Science*; **Springer**: Hidelberg, Germany, v. 3909 p. 363-378. 2006
- BANERJEE, R.; DEVI, A. and SARKAR, N. Isolation and purification of a coagulant from snake venom of the species *Bothrops jararaca* and the study of its properties. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v. 5, p. 296-303, 1960
- BERGER, M.; PINTO, A.F.; GUIMARÃES, J.A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. v. 51, p. 488-501, 2008
- BERN, M. W.; GOLDBERG, D. EigenMS: *De novo* analysis of peptide tandem mass spectra by spectral graph partitioning. In *Proceedings of the Ninth Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB 2005)*; **Springer**: Heidelberg, Germany, p. 357-372, 2005
- BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; COSTA, T.R.; GOMES, M.S.; TORRES, F.S.; COSTA, J.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; DOS SANTOS, D.M.; DE CASTRO PIMENTA, A.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; DE OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 574-584, 2008

BERNARDES, P. S.; ALBUQUERQUE, S.; TURCI, L. C. **Classificação e Diversidades de Serpentes**. In: Serpentes Peçonhentas em Rondônia. 1 ed. São Paulo: Anolis Books, p. 39–48, 2012

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

BOGIN, O. Venom Peptides and their Mimetics as Potential Drugs. **Modular Newsletter**, v. 19, p. 14-20, 2005

BORGES, C.C.; SADAHIRO, M.; DOS-SANTOS, M.C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32 (6), p. 637-646, 1999

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

BRAUD, S.; BOM, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000

BUTCHER, H.; KENNETTE, W.; COLLINS, O.; DEMOOR, J. and KOROPATNICK, J. A sensitive timeresolved fluorescent immunoassay for metallothionein protein. **Elsevier**. v. 272, n. 1, p. 247-256, 2003

CALVETE, J.J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology, **J. Proteomics**, v. 72, p. 121–126. 2009

CALVETE, J.J. Antivenomics and venom phenotyping: a marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. **Toxicon**, v. 56, p. 1284–91, 2010

CALVETE, J.J. **Snake venomics, antivenomics, and venom phenotyping: ménage à trois of proteomic tools aimed at understanding the biodiversity of venoms**. In: KINI, R.M.; CLEMETSON, K.; MARKLAND, F.; MCLANE, M.A.; MORITA, T., editors. *Toxins and Hemostasis: from Bench to Bedside*. Dordrecht (NL). p. 45–72, 2010b

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom.**, v. 42, p.1405–14, 2007

CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. **J. Proteome Res.**, v. 6, p. 326–336. 2007

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Lett.**, v. 583, p.1736–43, 2009

CALVETE, J.J.; BORGES, A.; SEGURA, A.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J.G.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. **J Proteomics**, v. 72, p. 227-240, 2009b

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A.M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; CHALKIDIS, H.M.; MOURÃO, R.H.V.; FURTADO, M.F.D.; MOURA-DASILVA, A.M. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorfism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **J. Proteomics**, v. 74, p. 510–27, 2011

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. Comstock Publishing Associates, p. 1–425, 1989

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock Publishing Associates, p. 1-1032, 2004

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675. 2008

CARDOSO, J.L.C.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quat. J. Med.**, v. 86, p. 315-325, 1993

CARRASCO, P.A.; MATTONI, C.I.; LEYNAUD, G.C. & SCROCCHI, G.J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American *bothropoid* pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta*, **The Norwegian Academy of Science and Letters**, v. 41, n° 2, p. 109–124, 2012

CASTRO, H.C.; DUTRA, D.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, p. 1903-12, 1998

CAVINATO, R.A.; REMOLD, H.; KIPNIS, T.L. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. **Toxicon**, v. 36, p. 257–267, 1998

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 30, p. 1099–1109, 1992

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279-303, 1991

CINTRA, A.C.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Primary structure and biological activity of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **J. Protein Chem.**, v. 9, p. 221–227. 1990

CINTRA, A.C.O.; DE TONI, L.G.B.; SARTIM, M.A.; FRANCO, J.J.; CAETANO, R.C.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 60, p. 70–82, 2012

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; DE MELO, R.L.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C.; SCIANI, J.M.; CONCEIÇÃO, I.M.; PREZOTO, B.C.; DE CAMARGO, A.C.; PIMENTA, D.C. Isolation and characterization of a novel bradykinin-potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 28, p. 515–523. 2007

COUTINHO-NETO, A.; CALDEIRA, C.A.S.; SOUZA, G.H.M.F.; ZAQUEO, K.D.; KAYANO A.M.; SILVA, R.S.; ZULIANI, J.P.; SOARES, A.M.; STÁBELI, R.G.; CALDERON, L.A. ESI-MS/MS Identification of a Bradykinin-Potentiating Peptide from Amazon *Bothrops atrox* Snake Venom using a Hybrid Qq-*oa*TOF Mass Spectrometer. **Toxins**, v. 5, p. 327-335, 2013

CHROMOGENIX - <http://www.chromogenix.com/>, Methods. Prothrombin. acesso em janeiro de 2013 as 10:00 horas AM.

CUSHMAN, D. W. and ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nat. Med.**, v. 5, p. 1110–1113. 1999

CUSHMAN, D.W., ONDETTI, M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, p. 589–592. 1991

CUSHMAN, D.W.; PLUSCEC, J.; WILLIAMS, N.J.; WEAVER, E.R.; SABO, E.F.; KOCY, O. et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 29, p.1032–5. 1973

DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, p. 537–540, 1996

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, M.S.; HENZEL, W.J.; PITTI, R.M.; LIPARI, M.T.; NAPIER, M.A.; DEISHER, T.A.; BUNTING, S.; LAZARUS, R.A. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 87, p. 2471–2475, 1990

DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon.**, v. 40, p. 659-665, 2002

DU, X.Y.; SIM, D.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 36, p. 414–421, 2006

EL-SAADANI, M.A.; EL-SAYED, M.F. A bradykinin potentiating peptide from Egyptian cobra venom strongly affects rat atrium contractile force and cellular calcium regulation. **Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 136, p. 387–395. 2003

ENG, J.K.; MCCORMACK, A.L.; YATES, J.R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 5, Issue 11, p. 976–989, 1994

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G.M. Venomics: unravelling the complexity of animal venom with mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 43, p. 279–295, 2008

FAN, H.W.; CARDOSO, J.L. **Clinical toxicology of snake bites in South America**. In: MEIER, J.E WHITE, J. (Eds). Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press., p. 667–688, 1995

FENWICK, A.M.; GUTBERLET JR, R.L.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009

FERNANDEZ, J.; NESHICH, G.; CAMARGO, A.C.M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, p. 554-563, 2004

FERREIRA, S.H.; BARTELT, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, p. 2583–93. 1970

FERREIRA, L.A.; ALVES, E.W.; HENRIQUES, O.B. Peptide T, a novel bradykinin-potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 31, p. 941–947. 1993

FERREIRA, L.A.; ALVES, W.E.; LUCAS, M.S.; HABERMEHL, G.G. Isolation and characterization of a bradykinin-potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptorica* venom. **Toxicon**, v. 34, p. 599–603. 1996

- FERREIRA, R.N.; MACHADO DE AVILA, R.A.; SÁNCHEZ, E.F.; MARIA, W.S.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antibodies against synthetic epitopes inhibit the enzymatic activity of mutalysin II, a metalloproteinase from bushmaster snake venom. **Toxicon**, v. 48, p. 1098–103, 2006
- FERREIRA, S.H. A Bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 24, p. 169, 1965
- FERREIRA, S.H., ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 21, p. 347–349, 1965
- FERREIRA, S.H.; BARTELT, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, p. 2583–2593, 1970
- FERSHT, A. The structures and mechanisms of selected enzymes. **Enzymes structure and mechanism**, p.405-413, 1985
- FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. Atrolysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 368–387, 1995
- FOX, J.W., SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969–985, 2005
- 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. 3016-3030, 2008
- FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **J Proteomics.**, v. 72, p. 200-209, 2009
- FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 38, p. 63-77, 2000
- FRANCISCHETTI, I.M.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J.; GARFIELD, M.K.; RIBEIRO, J.M. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene**, v. 337, p. 55–69. 2004
- FREER, R.J.; STEWART, J.M. Synthetic bradykinin-potentiating peptides related to those isolated from snake venoms. **Ciência e Cultura**, v. 23, p. 539–42. 1971
- FRY, B.G. Structure–function properties of venom components from Australian elapids. **Toxicon**, v. 37, p. 11–32, 1999
- FRY, B.G.; VIDAL, N.; NORMAN, J.A.; VONK, F.J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S.F.; KURUPPU, S. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, p. 584–8, 2006
- FRY, B.G.; VIDAL, N.; VAN DER WEERD, L.; KOCHVA, E.; RENJIFO, C. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. **J Proteomics**, v. 72, p. 127–36, 2009
- FURTADO, M.F.D.; COLLETO, G.M.D.D.; DIAS da SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I-Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, v. 53, p. 149-159, 1991

GARCÍA SÁNCHEZ, L. T. **Subclonagem e expressão do domínio catalítico da Jararagina: Estudo do efeito da modificações pós-traducionais na atividade hemorrágica.** 2004. 36f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, USP, São Paulo, 2004

GASMI, A.; BOURCIER, C.; ALOUI, Z.; SRAIRI, N.; MARCHETTI, S.; GIMOND, C.; WEDGE, S.R.; HENNEQUIN, L.; POUYSSÉGUR, J. Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signalling. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 29992–29998, 2002

GAY, C.C.; LEIVA, L.C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA DE PÉREZ, O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**. v. 46, p. 546-554, 2005

GEORGIEVA, D.; ARNI, R.K. and BETZEL, Ch. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights, **Expert Rev. Proteomics**, v. 5, p. 787–797, 2008

GOMES, C.L.; KONNO, K.; CONCEICAO, I.M.; IANZER, D.; YAMANOUYE, N.; PREZOTO, B.C.; ASSAKURA, M.T.; RADIS-BAPTISTA, G.; YAMANE, T.; SANTOS, R.A.; DE CAMARGO, A.C.; HAYASHI, M.A. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, p. 1350–1360, 2007

GOULD, R.J.; POLOKOFF, M.A.; FRIEDMAN, P.A.; HUANG T.F.; HOLT, J.C.; COOK, J.J.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 195, p. 168-71, 1990

GRAHAM, R.L.; GRAHAM, C.; MCCLEAN, S.; CHEN, T.; O'ROURKE, M.; HIRST, D.; THEAKSTON, D.; SHAW, C. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World Crotalinae pit vipers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, p. 1587–1592, 2005

GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SADE, Y.B.; OTUKI, M.F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E.F.; VEIGA, S.S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 120–134, 2007

GUÉRCIO, R.A.P.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LÓPEZ-LOZANO, J.L.; PABA, J.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Sci.**, v. 4, p. 11, 2006

GUTIÉRREZ, J.M.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Myonecrosis, hemorragia edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon**, v. 18, p. 603 – 610, 1980a

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33 (11), p. 1405-1424, 1995b

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Men. Instituto Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989

GUTIÉRREZ, J.M. **Clinical toxicology of snakebite in Central America.** In: MEIER, J.; WHITE, J. (Eds). Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press, p. 645–665, 1995a

- GUTIÉRREZ, J.M., CHAVES, F., BOLANOS, R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. **Rev. Biol. Trop.**, v. 28, p. 341–351, 1980b
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon**, v. 18, p. 315-321, 1980c
- GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411–413, 1988b
- GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R.; CERDAS, L.; ROJANS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. Neutralization of local effects of *Bothrops asper* venom by polyvalent antivenin. **Toxicon**, v. 19, p. 493-500, 1981
- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 40, p. 367-370, 1984
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; ROJAS, E.; ELIZONDO, J.; AVILA, C.; CERDAS, L. Production of monovalent anti-*Bothrops asper* antivenom: development of immune response in horses and neutralizing ability. **Rev. Biol. Trop.**, v. 36, p. 511–517, 1988^a
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DÍAZ, M.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; CALVETE, J.J. Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **J. Proteomics**, v. 72, p. 165–82, 2009
- GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B. ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; WARRELL, D.A.; CALVETE, J.J.; Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. **J Proteome Res**, v. 7, p. 4396-4408, 2008
- HAYASHI, M.A.; MURBACH, A.F.; IANZER, D.; PORTARO, F.C.; PREZOTO, B.C.; FERNANDES, B.L.; SILVEIRA, P.F.; SILVA, C.A.; PIRES, R.S.; BRITTO, L.R.; DIVE, V.; CAMARGO, A.C. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin- converting enzyme. **J Neurochem**, v. 85, p. 969–977, 2003
- HAYASHI, M.A.; CAMARGO, A.C. The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, v.45, p. 1163–1170. 2005
- HIDER, R.C.; KARLSSON, E.; NAMIRANIAN, S. **Separation and Purification of toxins from snake venoms**. In: Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics Pergamon Press. Ed. Harvey, A.L; Elsevier, p. 1-34, 1991
- HIGUCHI, S.; MURAYAMA, N.; SAGUCHI, K.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A.C.; OGAWA, T.; DESHIMARU, M.; OHNO, M. Bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venom. **Immunopharmacology**, v. 44, p. 129–135, 1999
- HODGSON, W.C. and ISBISTER, G.K. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery, **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 9, p. 173–176, 2009
- HOGUE, A.R.; ROMANO, S.A.R.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae

e Viperidae. **Mem Inst Butantan**, v. 36, p. 109-207, 1972

HOGGE, A.R.; ROMAO HOGGE, S.A.W.L. Poisonous snakes of the world. Part I. Check list of the pit vipers viperioidea, crotalinae. **Memorias do Instituto Butantã**, v. 42, p. 79-310, 1978

HOLLEMAN, W. H.; WEISS, L. J. The thrombin-like enzyme from *Bothrops atrox* snake venom: properties of the enzyme purified by affinity chromatography of a p-aminobenzamidine substituted agarose. **J. biol. Chem.**, v. 251, p. 1663-1669, 1976

HUNG, C.C.; CHIOU, S.H. Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of *Taiwan habu*: serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 281, p. 1012-1018, 2001

IANZER, D.; KONNO, K.; MARQUES-PORTO, R.; PORTARO, F.C.V.; STÖCKLIN, R.; CAMARGO, A.C.M.; PIMENTA, D.C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, v. 25, p. 1085-1092, 2004

ISRAILI, Z.H.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, R.; VALASCO, M. The future of antihypertensive treatment. **Am. J. Ther.**, v. 14, p. 121-34, 2007

JIA, Y.H.; LI, D.S.; ZHU, S.W.; ZHANG, L.Y.; DING, L.S.; WANG, W.Y.; XIONG, Y.L. Characterization of a new bradykinin-potentiating peptide (TmF) from *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 35, p. 619-623, 2003

JUNQUEIRA, M.R. **Aplicação de técnicas protéômicas na caracterização de veneno de *Bothrops insularis* (Viperidae)**. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 63p., 2005

JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I.L.M.; FARSKY, S.H.; OLIVEIRA, M.L.; HO, P.L. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 39836-42, 2001

JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I.L.M.; HO, P.L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pit viper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v. 299, p. 279-291, 2002

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; 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, p. 635-641, 1996

KATO, H.; SUZUKI, T. Structure of bradykinin-potentiating peptide containing tryptophan from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. **Experientia**, v. 26, p. 1205-1206, 1970

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake phospholipase PLA₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KINI, R.M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v. 34, p. 200-204, 2005

KOH, D.C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 3030-3041, 2006

KOHLHOFF, M.; BORGES, M.H.; YARLEQUE, A.; CABEZAS, C.; RICHARDSON, M. SANCHEZ, E.F. Exploring proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **J. Proteomics**, v. 75, p. 2181-2195, 2012

- KOMORI, Y.; SUGIHARA, H. Characterization of a new inhibitor for angiotensin converting enzyme from the venom of *Vipera aspis aspis*. **Int. J. Biochem.**, v. 22, p. 767–771, 1990a
- KOMORI, Y.; SUGIHARA, H. Purification and physiological study of a hypotensive factor from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). **Toxicon**, v. 28, p. 359-369, 1990b
- KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; MASUDA, K.; SUGIHARA, H. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). **Biochemistry**, v. 38, p. 11796–11803, 1999
- KOTIZA, T.; MEIER, J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon**, v. 34, p. 787-806, 1996
- KOUYOUMDJIAN, J.A.; POLIZELLI, C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 31, p. 84-90, 1989
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970
- LATOXAN. <http://www.latoxan.com/VENOM/SNAKE/MAPS/Bothrops-atrox.gif>. acesso em: julho de 2010.
- LEE, C.Y.W.; BURNETT-JR., J.C. Natriuretic peptides and therapeutic applications. **Heart Fail. Rev.**, v.12, p. 131-142, 2007.
- LEITE, L.C.C.; FURTADO, M.F.D.; CORREA, T.C.; RAW, I.S. Characterization of the snake venoms from seven Brazilian species of *bothrops* by fplc anion-exchange chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 102B, p. 515-520, 1992
- LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides, **Nat. Rev.**, v. 2, p. 790–802, 2003
- LOMONTE; B., GUTIÉRREZ; J.M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. **Rev. Biol. Trop.**, v. 31, p. 37-40, 1983
- LOPES, D.S.; BALDO, C.; OLIVEIRA, C. DE F.; DE ALCANTARA, T.M.; OLIVEIRA, J.D.; GOULART, L.R.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; CLISSA, P.B.; RODRIGUES, V.M. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon**. v. 54, p. 42–49, 2009
- LÓPEZ-LOZANO, J.L.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; CHÁVES-OLORTEGUI, C.; SANCHEZ, E.F.; MUNIZ, E.G.; BÜHRNHEIM, P.F.; MORHY, L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, p. 997-1006, 2002
- LORÍA, G. D.; RUCAVADO, A.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. FOX, J. W.; ALAPE, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 418, p. 13-24, 2003
- MACKESSY, S.P. **The field of reptile toxinology. Snakes, lizards, and their venoms.** in: MACKESSY, S.P. (Ed.), Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles, CRC Press/ Taylor & Francis Group, Boca Raton, p. 1–21, 2009

- MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon**, v. 20, p.955-972, 1982
- MARCUSSI, S.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; MAZZI, M.V.; OLIVEIRA, C.Z.; IZIDORO, L.F.; FULY, A.L.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, v. 28, p. 2328-2339, 2007
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998
- MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, v. 58, p. 303–12, 2002
- MARSHALL, A.G.; HENDRICKSON, C.L. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: Principles and experimental configurations. **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 215, p. 59-75, 2002
- MARTINS, M.; MARQUES, O.A.; SAZIMA, I. **Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers**. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Eds.). *Biology of the Vipers*. Indiana: Biological Science press, p. 307-28, 2002
- MATSUI, T.; FUJIMURA, H.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim et Biophys Acta**, v. 1477, p.146-156, 2000
- MAZZI, M.V.; MAGRO, A.J.; AMUI, S.F.; OLIVEIRA, C.Z.; TICLI, F.K.; STÁBELI, R.G.; FULY, A.L.; ROSA, J.C.; BRAZ, A.S.; FONTES, M.R.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjuSSuMP-I: a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J Mol Graph Model**, v. 26, p. 69-85, 2006
- MEIER, J. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). **Toxicon**, v. 24, p. 41-46, 1986
- MEIER, J.S.; STOCKER, K.F. **Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms**. In: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal venoms and Poison*. Ed. MEIER, J. & WHITE, C.R.C., Press Inc, Boca Raton, Florida, USA. p. 367, 1995
- MEIER, J. **Venomous Snakes**. In: STOCKER, K.F. *Medical use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, Boston, CRC, p. 1-32, 1990
- MEKI, A.R.; NASSAR, A.Y.; ROCHAT, H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. **Peptides**, v. 16, p. 1359–1365. 1995
- MENDEZ, M.C. & RIET-CORREA, F. Snakebite in sheep. **Vet. Hum. Toxicol**, v.37 (1), p. 62-3, 1995
- MENIN, L.; PERCHUC, A.; FAVREAU, P.; PERRET, F.; MICHALET, S.; SCHÖNI, R.; WILMER, M.; STÖCKLIN, R. High throughput put screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. **Toxicon**, v. 51, p. 1288-1302, 2008.
- BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília-DF: Editora da Fundação Nacional de Saúde, 2003
- MINTON, S.A.; WEINSTEIN, S.A.. Geographic and ontogenetic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Toxicon**, v. 24, p. 71–80, 1986

MORITA, T. Use of snake venom inhibitors in studies of the function and tertiary structure of coagulation factors. **Int. J. Hematol.**, v. 79, p. 123-129, 2004

MUNAWAR, A.; TRUSCH, M.; GEORGIEVA, D.; SPENCER, P.; FROCHAUX, V.; HARDER, S.; ARNI, R.K.; DUHALOV, D.; GENOV, N.; SCHLÜTERC, H. AND BETZEL, C. Venom peptide analysis of *Vipera ammodytes meridionalis* (Viperinae) and *Bothrops jararacussu* (Crotalinae) demonstrates subfamily-specificity of the peptidome in the family Viperidae. **Molecular BioSystems**, v. 7, p. 3298-307, 2011

MURAYAMA, N.; MICHEL, G.H.; YANOSHITA, R.; SAMEJIMA, Y.; SAGUCHI, K.; OHI, H.; FUJITA, Y.; HIGUCHI, S. cDNA cloning of bradykinin-potentiating peptides C-type natriuretic peptide precursor, and characterization of the novel peptide Leu3-blomhotin from the venom of *Agkistrodon blomhoffi*. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 4075–4080, 2000

NEIVA, M.; ARRAES, F.B.; DE SOUZA, J.V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO DA SILVA, A.R.; WALTER, M.E.; DE MACEDO BRIGIDO, M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J.L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v. 53, p. 427-436. 2009

NG, K.K.F. and VANE, J.R. Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung *in vivo*, **Nature**, v. 225, p. 1142–1144, 1970

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; DE LA TORRE, P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **J. Proteomics**, v. 73, p. 57–78, 2009

OKA, S.; ARITA, H. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A₂ in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. **J. Biol. Chem.**; v. 266, p. 9956-60, 1991

OLSEN, J.V.; DE GODOY, L.M.F.; LI, G.; MACEK, B.; MORTENSEN, P.; PESCH, R.; MAKAROV, A.; LANGE, O.; HORNING, S.; MANN, M. Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 4, p. 2010-2021, 2005

ONDETTI, M.A.; WILLIAMS, N.J.; SABO, E.; PLUCEC, J.; WEAVER, E.R. and KOCY, O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. **Biochemistry**, v. 10, p. 4033–4039, 1971

ONDETTI, M.A.; CUSHMAN, D.W. **Angiotensin converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological activities**. In: SOFFER, R.L. (Ed.), *Biochemical Regulation of Blood Pressure*. Wiley, New York, p. 165–204, 1981

OROPEZA, D.L.; GONZAGA, R.A.; VILLAFUERTE, Y.N.; VÁSQUEZ, M.V.; TAPIA, J.C. Ofidismo por *Bothrops atrox*: Estudio clínico-epidemiológico. **Diagnóstico**, v. 38, p. 1–6, 2000

PAINE MJ, DESMOND HP, THEAKSTON RD, CRAMPTON JM. 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, p. 22869-22876, 1992

PATCHETT, A. A.; HARRIS, E.; TRISTRAM, E.W.; WYVRATT, M.J.; WU, M.T.; TAUB, D.; PETERSON, E.R.; IKELER, T.J.; TEN BROEKE, J.; PAYNE, L.G.; ONDEYKA, D.L.; THORSETT, E.D.; GREENLEE, W.J.; LOHR, N.S.; HOFFSOMMER, R.D.; JOSHUA, H.; RUYLE, W.V.;

ROTHROCK, J.W.; ASTER, S.D.; MAYCOCK, A.L.; ROBINSON, F.M.; HIRSCHMANN, R.; SWEET, C.S.; ULM, E.H.; GROSS, D.M.; VASSIL, T.C.; STONE, C.A. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Nature**, v. 288, p. 280–283, 1980

PETRILLO, E.W.; CUSHMAN, D.W.; DUGGAN, M.E.; KARANEWSKY, J.E.; ONDETTI, M.A.; REILLY, B.O’.; ROVNYAK, G. C.; SCHWARTZ, J.; SPITZMILLER, E. R. AND WANG, N.Y. in **Peptides: Structure and Function**. Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium; ed. V. J. Hurby, D. H. Rich, Pierce Chemical Co. Rockford, p. 541, 1983

PIFANO, F.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Ecological niche and redescription of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Crotalidae) in Venezuela. **Brenesia**, v. 45-46, p.169 -75, 1996

QUEIROZ, L.S.; PETTA, C.A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 26, 0. 247-253, 1984

RENGIFO, C.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. **Accidente bothropico**. Fondo de Publicaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Serpientes, venenos y su tratamiento en Venezuela. Caracas, p. 1–102, 2005

RIBEIRO, L.A.; ALBUQUERQUE, M.J.; PIRES-DE-CAMPOS, V.A.F.; KATZ, G.; TAKAOKA, N.W.; LEBRÃO, M.L.; JORGE, M.T. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/1993. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 44, p. 312-318, 1998

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 32, p. 436-442,1990

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch Biochem Biophys**. v. 381, p. 213-224, 2000

RORIZ, Kátia Regina Pena Schesquini. **Análise clínico-epidemiológico e laboratorial dos casos de envenenamento por serpentes: um estudo de pacientes do centro de medicina tropical de Rondônia**. 2011. 79 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011

RUBATTU, S.; SCIARRETTA, S.; VALENTI, V.; STANZIONE, R.; VOLPE, M. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. **Am. J. Hypertens.**, v. 21, p. 733–741, 2008

SADYGOV, R.G.; COCIORVA, D.; YATES, J.R. Large-scale Database Searching using Tandem Mass Spectra: Looking up the answer in the Back of the Book. **Nature Methods**., v. 1, p. 195, 2004

SALDARRIAGA, M.M.; OTERO, R.; NUNEZ, V.; TORO, M.F.; DÍAZ, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, p. 405-411, 2003

SANCHEZ, E.F.; SCHNEIDER, F.S.; YARLENQUE, A.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Arch. Biochem. Biophys.**,v. 496, p. 9–20, 2010

SANTOS, B.F.; SERRANO, S.M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBS Lett.**, v. 477, p. 199-202, 2000

SAVITSKI, M.M.; NIELSEN, M.L.; ZUBAREV, R.A. New data base-independent, sequence tag-based scoring of peptide MS/MS data validates mowse scores, recovers below threshold data, singles out modified peptides, and assesses the quality of ms/ms techniques. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 4, p. 1180-1188, 2005

SAZIMA, I. **Natural history of the jararaca pitviper *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil.** In: SCHUETT, G.W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. *Biology of the vipers.* Camel-Indiana: Eagle Mountain Publishing; p.199-216, 2002

SCHÄGGER, H. Protocol TRCINE-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v.1, p. 16-22, 2006

SEGURA, A.; CASTILLO, M.C.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L.R.; VILLALTA, M.; BONILLA, C.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, M.Y.; ARAÚJO, H.P.; BOLLER, M.A.A.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANO-MARTINS, I.S.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G.P.; GEOGHEGAN, P.; HIGASHI, H.G.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J.M.. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, p. 980–9, 2010

SELISTRE, H.S.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Atividade anticoagulante de toxinas dos venenos de *Bothrops insularis* e *Bothrops jararacussu*. **M. Inst. Butantã**, v. 52, p. 73-74, 1990

SERRANO, S.M.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinase: sequence homology vs substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005

SHAW, C. Venom-based Medicines – Advancing Drug Discovery with Reptile and Amphibian Venom Peptides. **The Biochemical Society**, v. 31, p. 34-37, 2009

SILVA, M.B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.; POZNER, R.G.; VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem J.**, v. 369, p. 129-139, 2003

SILVA, C.J.; JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, p. 251-255, 2003

SINAN/SVS, **Brazilian Ministry of Health.** http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_caos_2000_2011_01_04_2011.pdf

SIUZDAK, G. **The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology.** MCC Press: San Diego, CA, 2nd ed., 276 pp., 2003

SIX, D.A.; DENNIS, E A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000

SLOWINSKI, J.B.; LAWSON, R. Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 24, p. 194-202, 2002

SMITH, C.G.; VANE, J.R. The Discovery of Captopril. **FASEB J.**, v. 17, p. 788-789, 2003

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of a myotoxin I from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 7–15, 2000a

SOARES, A.M.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and-III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 387, p. 188–196, 2001b

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Molecular cloning and functional characterization of BnSP-7, a myotoxin Lys-49 phospholipase A₂ homologue, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201–209, 2000b

SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; CECCHINI, A.L.; ARANTES, E.C.; FRANCA, S.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 33, p. 877-888, 2001a

SOARES, M.R.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; WERMELINGER, L.S.; ZINGALI, R.B.; HO, P.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; DINIZ, M.R. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 31–38, 2005

Sociedade Brasileira de Hipertensão Arterial [homepage]. São Paulo: São Paulo, 2010. [acessado em 01/maio/2010]. Disponível em <http://www.sbh.org.br>.

SOUZA, G.H.M.F.; CATHARINO, R.R.; IFA, D.R.; EBERLIN, M.N. and HYSLOP, S. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. **J. Mass Spectrom.**, v. 43, p. 594–599, 2008

STABELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DEARAÚJO, H.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 2881-2886, 2004

STEEN, H. e MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 699-711, 2004

STOCKER K. and BARLOW G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). **Meth. Enzym.**, v. 45, p. 214-223. 1976

STROKA, A.; DONATO, J.L.; BON, C.; HYSLOP, S.; DE ARAÚJO, A.L. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 411– 420, 2005

SYKA, J.E.P.; COON, J.J.; SCHROEDER M. J.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. **PNAS**, v. 101, p. 9528, 2004

TABB, D.L.; SMITH, L.L.; BRECI, L.A.; WYSOCKI, V.H.; LIN, D.; YATES, J.R. Statistical Characterization of Ion Trap Tandem Mass Spectra from Doubly Charged Tryptic Peptides. **Anal. Chem.**, v. 75, p. 1155, 2003

TAKAHASHI, H.; HATTORI, S.; IWAMATSU, A.; TAKIZAWA, H.; SHIBUYA, M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 46304–46314, 2004

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 109, p. 227–241, 2005

Tashima AK, Sanz L, Camargo ACM, Serrano SMT, Calvete JJ: Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. **J Proteomics**, 71:473-485, 2008

TAN, N.H.; PONNUDURAI, G.; MIRTSCHEIN, P.J. A comparative study of the biological properties of venom from juvenile and adult inland Taipan (*Oxyuranus microlepidotus*) snake venom. **Toxicon**, v. 31, p. 363–367, 1993

TOMINAGA, M.; STEWART, J.M. Synthesis and properties of new bradykinin potentiating peptides. **J. Med. Chem.**, v. 18, p. 130–133, 1975

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, p. 193, 2003

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, p. 241-255, 2009

VARANDA, E.A.; GIANINNI, M.J.S.M. **Bioquímica de veneno de serpentes**. In: BARRAVIEIRA, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Científica, Cap 14, p. 205-223, 1994

VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.S.M. **Bioquímica de venenos de serpentes**. In: BARRAVIEIRA B, editor. Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. 1ª ed. Rio de Janeiro: EPUB., p. 205–23, 1999

VETTER, I.; DAVIS, J.L.; RASH, L.D.; ANANGI, R.; MOBILI, M.; ALEWOOD, P.F.; LEWIS, R.J.; KING, G.F. Venomomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. **Amino Acids**, v. 40, p. 15-28, 2011

WARRELL, D.A. **Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management**. In: CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W., editors. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca and London: Comstock Publishing Associates, p. 709–762, 2004

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; QUIJADA-MASCARENHAS, J.A.; THORPE, R.S.; DUCKETT, G.J.; PUORTO, M.G. et al. **Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis**. In: SCHUETT GW, HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, W., editors. Biology of the Vipers. Eagle Mountain Publishing LC., p.111–28, 2002

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelium growth factors. **Mol. Div.**, v. 10, p. 515-527, 2006

YANG, C.C.; CHANG, L.S.; WU, F.S. Venom constituents of *Notechis scutatus scutatus* (Australian tiger snake) from differing geographic regions. **Toxicon**, v. 29, p. 1337– 44, 1991

YONG-HONG, J. I. A.; YANG, J.I. N.; QIU-MIN, L.; SHENG, D. L. I.; WAN-YU, W.; YU-LIANG, X. Jerdonase, a novel serine protease with kini-realising and fibrinogenolytic activity from *Trimeresurus jerdonii* venom. **Acta. Biochim. Biophys. Sinica**, v. 35, p. 689-694, 2003

ZHANG, Z.; MCELVAIN, J. S. De novo peptide sequencing by two-dimensional fragment correlation mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 72, p. 2337-2350, 2000

ZHANG, Y.I.; WANG, J.H.; LEE, W.H.; WANG, Q.; LIV, H.; ZHENG, Y.; ZHANG, Y. Molecular Characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 309, p. 598-604, 2003

ZAMUNÉR, S.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, p. 259–271, 2004

ZENG, X.C.; LI, W.X.; PENG, F.; ZHU, Z.H. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. **IUBMB. Life**, v. 49, p. 207–210, 2000

ZINGALI, R.B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M.C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, p. 10794-802, 1993

ZUG, G.R.; VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**, Second Edition (Hardcover), Academic Press, USA, 2000

APENDICÊ – I

Tabela da estrutura primária dos principais peptídeos potenciadores da bradicinina encontradas em diferentes espécies

Tabela 8. Estrutura primária dos principais peptídeos potenciadores de bradicinina encontradas em diferentes espécies						
Espécies	Nomenclatura antiga	Ano	Nomenclatura	BPPs	Peptídeo	Referência
<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	BPPF AGKPI	July 1, 2008	APS-10	BPP-F	QLWPRPHIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/POC7R6)
<i>Bothrops alternatus</i>	BPP11 BOTAL	May 20, 2008	RAS-11	BPP-11	QWDPSSDIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/POC7J7)
<i>Bothrops alternatus</i>	BPP13 BOTAL	July 1, 2008	RAS-13	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/POC7R7)
<i>Bothrops erythromelas</i>	BPP13 BOTER	July 1, 2008	BES-13	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/POC7R8)
<i>Bothrops insularis</i>	BPP4 BOTIN	April 1, 1993	BIS-11	BPP-S4,1,2	QGGPPRPQIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/P30424)
<i>Bothrops insularis</i>	BPP8 BOTIN	April 1, 1993	BIS-10	BPP-S5,1	QWGQHPNIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/P30426)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-5a	1970	BJA-5A	BPP-5a	QKWAP	*Ferreira et al. (1970); *Murayama et al. (1997); *Hayashi et al. (2003)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-5b	1981	BJA-5B	BPP-5b	QWPRP	*Ondetti and Cushman (1981).
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-6a	1981	BJA-6A	BPP-6a	QSWPGP	*Ferreira et al. (1970); *Ondetti and Cushman (1981).
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP7A BOTJA	June 26, 2007	BJA-7A	BPP-7a	QDGIPIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/P85160)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-9	1970	BJA-9A	BPP-9a	QWPRPQIPP	*Ferreira et al. (1970); *Ondetti and Cushman (1981); *lanzer et al. (2004)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-10a	1970	BJA-10A	BPP-10a	QSWPGPNIPP	*Ferreira et al. (1970); *Murayama et al. (1997); *Ondetti and Cushman (1981); *lanzer et al. (2004)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPPAB BOTJA	July 21, 1986	BJA-10B	BPP-10b	QNWPRPQIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/PO1022)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-10	1970	BJA-10C	BPP-10c	QNWPHPQIPP	*Ferreira et al. (1970); *Murayama et al. (1997); *Hayashi et al. (2003); *Ondetti and Cushman (1981); *lanzer et al. (2004)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP11 BOTJA	May 20, 2008	BJA-11	BPP-11	QGGAGWPPIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/POC7J8)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-11a	1981	BJA-11A	BPP-11a	QWPRPTQIPP	*Ondetti and Cushman (1981); *lanzer et al. (2004)
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-11b	1981	BJA-11B	BPP-11b	QGRAPGPIPP	*Murayama et al. (1997); *Ondetti and Cushman (1981).
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-11c	2003	BJA-11C	BPP-11c	QGRAPHPIPP	Hayashi et al. (2003).
<i>Bothrops jararaca</i>	BPPBD BOTJA	June 26, 2007	BJA-11D	BPP-11d	QGRPPGPIPP	(http://www.uniprot.org/uniprot/P85161)

<i>Bothrops jararaca</i>	BPPBE BOTJA	June 26, 2007	BJA-11E	BPP-11e	QARPPHPPIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P85167
<i>Bothrops jararaca</i>	BPPCA BOTJA	June 26, 2007	BJA-12A	BPP-12a	QGWAWPRPQIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P85168
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-12b	2003	BJA-12B	BPP-12b	QWGRPPGPIPP	*Hayashi et al. (2003).
<i>Bothrops jararaca</i>	BPPCC BOTJA	June 26, 2007	BJA-12C	BPP-12c	QWAQWPRPQIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P85162
<i>Bothrops jararaca</i>	BPP-13a	1981	BJA-13A	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP	*Hayashi et al. (2003); *Ondetti and Cushman (1981).
<i>Bothrops jararaca</i>	BPPDB BOTJA	June 26, 2007	BJA-13B	BPP-13b	QGGWPRPGPEIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P85169
<i>Bothrops jararaca</i>	BPPEA BOTJA	June 26, 2007	BJA-14A	BrPP-14a	QWAQWPRPTQIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P85163
<i>Bothrops neuwiedi</i>	BPP2 BOTNU	July 1, 2008	BNI-10	BPP-2	EEGGRPPPI	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S1
<i>Bothrops neuwiedi</i>	BPP3 BOTNU	July 1, 2008	BNI-13	BPP-3	QGGWPRPGPEIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S2
<i>Bothrops neuwiedi</i>	BPP5 BOTNU	July 1, 2008	BNI-11	BPP-5	EEGGSPPVVI	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S3
<i>Bothrops neuwiedi</i>	BPP9 BOTNU	July 1, 2008	BNI-10	BPP-9	QWPRPQIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S4
<i>Bothrops neuwiedi</i>	BPP11 BOTNU	July 1, 2008	BNI-11	BPP-11	QWPRPTQIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S5
<i>Bothrops atrox</i>	BPP12 BOTAT	October 5, 2010	BAX-12	BPP-12a	QWPRPGPEIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P86721
<i>Bothrops leucurus</i>	BPP13 BOTLC	July 1, 2008	BLS-13A	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7R9
<i>Bothrops moojeni</i>	BPP13 BOTMO	July 1, 2008	BMI-13A	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S0
<i>Buthus Occitanus</i>	BPK12 BUTOI	July 1, 2008	BOS-12	BPP-K12	LRDYANRVINGGVEAAGPPA	http://www.uniprot.org/uniprot/Q9TWD3
<i>Crotalus adamanteus</i>	BP11A CROAD	May 20, 2008	CAS-11a	BPP-11a	QQWPPGHPIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7J9
<i>Crotalus adamanteus</i>	BP11B CROAD	May 20, 2008	CAS-11b	BPP-11b	QGGWPRNPIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7K0
<i>Crotalus atrox</i>	BPP36 CROAT	July 1, 2008	CAX-10	BPP-POL- 236	QLWPRPQIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S6
<i>Crotalus viridis viridis</i>	BP11A CROVV	May 20, 2008	CW-11a	BPP-11a	QGPSRHPPIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7K1
<i>Crotalus viridis viridis</i>	BP11B CROVV	May 20, 2008	CVV-11b	BPP-11b	QGGAPWNPPIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7K2
<i>Crotalus viridis viridis</i>	BP11C CROVV	May 20, 2008	CVV-11c	BPP-11c	QSAPGNEAIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7K3
<i>Gloydus halys</i>	BPP GLOHA	August 13, 1987	GHS-11	BPP	QGRPPGPIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/PO4562
<i>Lychas mucronatus</i>	BPK12 LYCMC	January 11, 2011	LMS-87	BPP- NDBP12	MNKRVLIVFFVTLVVADEVNSFSFFRKAKGFLKKIW KSKIARRLREKGMKALKNYANDVINGPAEAPAAAA APEEPPVEQRRRRR	http://www.uniprot.org/uniprot/D9U2B7
<i>Lychas mucronatus</i>	BPK25 LYCMC	January 11, 2011	LMS-86	BPP-25.12	MNKRVLIVFFVTLVVADEVNSFSFFRKAKGFLKKIW KSKIARRLREKGMKALKNYANDVINGPAEAPAAAA EPPVEQRRRRR	http://www.uniprot.org/uniprot/POC193
<i>Lychas mucronatus</i>	BPK6 LYCMC	January 11,	LMS-72	BPP- NDBP6	MNKKTLVIVFFVTLVIVDEVNSFRFGSFLKVKVWSKL AKKLRSGKQLLKDYANRVLNGPEEEAAAPAEERRR	http://www.uniprot.org/uniprot/D9U2B5

2011

<i>Lycosa erythrognatha</i>	BPPS LYCER	July 1, 2008	LEA-11	BPP-S	QAPWPDITIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S8
<i>Mesobuthus martensii</i>	BPK3 MESMA	July 1, 2008	MMI-72	BPP-BmK3	MNKKTLVIVFVTMLIVDEVNSFRFGSFLKVKWKS AKKLRSKQQLLDYANKVNLNGPEEEAAPAERRR	http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y0X4
<i>Phasmahyla jandaia</i>	BPPXA PHAJA	February 8, 2011	PJA-10	BPP-Phypo Xa	QFRPSYQIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P86643
<i>Phyllomedusa burmeisteri</i>	BPPBP PHYBU	July 7, 2009	PBI-11	BPP-Pb	QTLLQELPIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P86284
<i>Phyllomedusa hypochondrials</i>	BPPXA PHYHY	June 26, 2007	PHS-10	BPP-Phypo Xa	QFRPSYQIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P85165
<i>Protothrops mucrosquamatus</i>	BPPF PROMU	July 1, 2008	PMS-11	BPP-TmF	QGRPLGPIPP	http://www.uniprot.org/uniprot/POC7S7
<i>Tityus discrepans</i>	BPP TITDI	April 20, 2010	TDS-77	BPP	MNKKTLVIVFIVTLLIADEVNSFKGGFLKMMWKS KLLRAKQMLKEYANKVLSPEEEAAPAAGAPER RRR	http://www.uniprot.org/uniprot/C9X4J0
<i>Tityus serrulatus</i>	BPT TITSE	July 1, 2008	TSS-13	BPP-T	KKDGYPVEYDRAY	http://www.uniprot.org/uniprot/Q9TWR4
<i>Vipera aspis</i>	BPP VIPAS	July 1, 1993	VAS-10	BPP_VIPAS	QGWPGPKVPP	http://www.uniprot.org/uniprot/P31351

*FERREIRA et al., **Biochemistry**, v. 9, p. 2583-2593, 1970;
 ONDETTI; CUSHMAN, **Biochemical Regulation of Blood Pressure**, p. 165-204, 1981;
 MURAYAMA et al., **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 4, p. 1189-1193, 1997;
 HAYASHI et al., **J. Neurochem.**, v. 85, p. 969-977, 2003;
 IANZER et al., **Peptides**, v. 25, p. 1085-1092, 2004;

8. ANEXOS

ANEXO 1 – Tabela de Aminoácidos

Tabela de Aminoácidos

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115.026
Ácido glutâmico	E	Glu	129.042
Alanina	A	Ala	71.0371
Arginina	R	Arg	156.101
Asparagina	N	Asp	114.042
Cisteína	C	Cys	103.009
Fenilalanina	F	Phe	147.068
Glicina	G	Gli	57.0214
Glutamina	Q	Gln	128.058
Histidina	H	His	137.058
Isoleucina	I	Iso	113.084
Leucina	L	Leu	113.084
Lisina	K	Lys	128.094
Metionina	M	Met	131.040
Prolina	P	Pro	97.052
Serina	S	Ser	87.032
Tirosina	Y	Tyr	163.063
Treonina	T	Thr	101.047
Triptofano	W	Trp	186.079
Valina	V	Val	99.0684

ANEXO 2 – Paper ESI-MS/MS identification of a bradykinin-potentiating peptide from Amazon *Bothrops atrox* snake venom using a hybrid Qq-oaTOF mass spectrometer.

Toxins **2013**, 5, 327-335 manuscripts; doi:10.3390/toxins40x000x

OPEN ACCESS

Toxins

ISSN 2072-6651

www.mdpi.com/journal/toxins

Communication

ESI-MS/MS identification of a bradykinin-potentiating peptide from Amazon *Bothrops atrox* snake venom using a hybrid Qq-oaTOF mass spectrometer

Antonio Coutinho-Neto^{1,3}, Cleópatra A. S. Caldeira¹, Gustavo H. M. F. Souza², Kayena D. Zaqueo¹, Anderson M. Kayano¹, Rodrigo S. Silva¹, Juliana P. Zuliani^{1,3}, Andreimar M. Soares¹, Rodrigo G. Stábeli^{1,3}, Leonardo A. Calderon^{1,3*}

¹ Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde (CEBio), Fiocruz Rondônia, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) 76812-245 Porto Velho, RO, Brazil;

² MS Applications Development Laboratory, Waters Corporation, 06455-020 Alphaville, SP, Brazil,

³ Medicine Department, Universidade Federal de Rondônia, 76801-059 Porto Velho, RO, Brazil. *e-mail: calderon@fiocruz.br

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: A bradykinin-potentiating peptide (BPP) from Amazon *Bothrops atrox* venom with m/z 1,384.7386 was identified and characterized by collision induced dissociation (CID) using an ESI-MS/MS spectra obtained in positive ion mode on a hybrid Qq-oaTOF mass spectrometer – Xevo G2 QTof MS (Waters, Manchester, UK). *De novo* peptide sequence analysis of the CID fragmentation spectra showed the amino acid sequence ZKWPRPGPEIPP, with a pyroglutamic acid and theoretical monoisotopic m/z 1,384.7378, which is similar to experimental data, showing a mass accuracy of 0.6 ppm. The peptide is homologous to other BPP from *Bothrops moojeni* and was named as BPP-BAX12.

Keywords: bioactive peptide, BPP, pyroglutamic acid, pyrrolidonecarboxylic acid, *de novo* peptide sequencing.

1. Introduction

Snake venoms have been recognized as an extensible source of bioactive peptides with potential biotechnological applications in medicine [1]. Due to their high degree of target specificity, venom toxins have been increasingly used as lead compounds in the development of drug prototypes [2]. One of the most successful examples has been Captopril®, an antihypertensive drug based on a bradykinin-potentiating peptide (BPP) isolated from Brazilian *Bothropoides (Bothrops) jararaca* venom [3, 4]. The BPP family comprises a class of angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitors with different lengths (5 to 14 amino acid residues) found in venoms produced by snakes, scorpions, spiders and amphibians [5]. Generally, BPPs have a conserved N-terminal pyroglutamate residue (Z) and two consecutive proline residues at the C-terminal region [6,7]. This work aims the identification and characterization of a new BPP from Amazon *Bothrops atrox* snake venom.

2. Materials and Methods

2.1. Venom

Bothrops atrox specimens collected around the city of Porto Velho, State of Rondônia, Brazil were kept at Fiocruz Rondônia bioterium in order to be used for venom production under authorization emitted by IBAMA (licence number 27131-1) and CGEN (licence number 010627/2011-1). The crude venom was dehydrated and stored at a temperature of -20 °C in the Amazon Venom Bank at CEBio.

2.2. Peptide Isolation

The purification of BPP-BAX12 was performed using 50 mg of crude venom, which was divided fractionated into two fractions on a size exclusion chromatography column using a Superdex peptide-10/300GL column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.4) and carried out at a flow rate of 0.5 mL/minutes. The second fraction produced, which was related to peptides, was re-chromatographed under the same conditions resulting in eight fractions. The fourth fraction (37-43 min) was then lyophilized and stored for MS/MS analysis.

2.3. MS Parameters and Data Acquisition

ESI-MS spectra were obtained in positive ion mode on a hybrid Qq-*oa*TOF mass spectrometer – Xevo G2 QToF MS (Waters, Manchester, UK). Typical ESI-MS conditions were done in positive mode as follow: source temperature 80 °C, capillary voltage 2.8 kV, and cone voltage 35 V, resolution mode with an analogic-to-digital converter (ADC) mode, detector at 2,825 V previously adjusted with leukine enkephalin (Leu-Enk) solution at 2 ng/uL. The instrument was automatically calibrated with sodium iodide solution through IntelliStart, integral part of MassLynx 4.1v acquisition software (Waters, Manchester, UK). Samples were re-suspended in a vial with a solution containing equal parts of water and

methanol with 0.1 % of formic acid for each sample to proceed ESI(+)-MS analysis. These solutions were then injected at a flow rate of 500 nL/min using the fluid system installed in the Xevo G2 QToF MS panel controlled by the IntelliStart software and MS tune page. All MS spectra were acquired over the m/z 50-2,000. MS/MS acquisition was performed using the quadrupole with high discrimination for each m/z of interest. The collision energy was applied to the selected precursor ion and a collision-induced dissociation (CID) at the T-Wave collision cell filled with argon gas was used. 25 eV was applied to the collision cell depending on the precursor ion dissociation characteristics.

2.4. MS/MS analysis

The MS/MS spectra were de-convoluted using MaxEnt 3 software (Waters, Manchester, UK) and then transferred to a PepSeq application into BioLynx software package and a Microsoft Excel file with data up to 120 counts in order to proceed manual evaluation. The identification of the most common diagnostic peptide fragment ions (a^+ , b^+ , y^+ -type) currently observed in low energy collisions and immonium ions for *de novo* peptide sequencing were performed manually using the program Microsoft Excel with data of monoisotopic mass of common and less common amino acid residues, terminal groups and post-translational modifications for the use in mass spectrometry calculated using the following atomic masses of the most abundant isotope of the elements: C=12.0000000, H=1.0078250, N=14.0030740, O=15.9949146, F=18.9984033, P=30.9737634, S=31.9720718, CL=34.9688527, Br=78.9183361. Fragments with intensity higher than 200 counts and mass accuracy between 0 to ± 17 ppm, according to the equation 1, was used for *de novo* peptide sequencing.

$$\text{Mass accuracy (ppm)} = 1,000,000 \times (\text{theoretical mass} - \text{measured mass}) / \text{theoretical mass} \quad (1)$$

MassSeq application and *de novo* sequencing analysis and interpretation tool of the BioLynx software package was used in order to confirm manual analysis using the following peptide sequencing parameters: M/z tolerance of 0.03 for peptide and fragments and intensity threshold of 0.003%.

3. Results and Discussion

The mass spectrometric analysis of the fourth chromatographic fraction reveals a high intensity doubly protonated ion peak at m/z 692.8732 $[M+2H]^{+2}$. The ion was selected and submitted to collision-induced dissociation (CID) with argon gas resulting in a mass spectrum (Figure 1), which was submitted to the identification of a^+ , b^+ , and y^+ type diagnostic fragments and immonium ions for *de novo* peptide sequence (Table 1 and 2) [8]. The analysis revealed a 12 residue proline-rich peptide [Pyr-Lys-Trp-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro-Glu-Ile/Leu-Pro-Pro] with a conserved consecutive two proline residues at the C-terminal region, a characteristic of the BPP family of ACE inhibitors [6,7], and a N-terminal pyroglutamic acid

(Pyr), which could be derived from glutamine or glutamic acid residues, as observed in others current described snake venom BPPs from *Bothrops* species. The measured peptide monoisotopic mass (1,384.7386) and theoretical (1,384.7378) was very similar, showing a mass accuracy of 0.6 ppm, which was also observed for the identified diagnostic fragment ions (Table 1 and 2), thus showing the high precision of the analysis. Sequence similarity showed that the peptide is homologous to other BPP described for *B. moojeni* venom [6] and similar to others from *Bothrops neuwiedi* [1,9], *B. leucurus*, *B. erythromelas*, *B. alternatus* [10], *B. insularis* [1,10,11], *B. jararaca* [12,14], *B. jararacussu* [1,10,13], *B. cotiara* [14], and *B. fonsecai* [14] (Table 3). This peptide was named as Bradykinin-potentiating peptide BAX12.

4. Conclusion

Recent papers on venomics [15], proteome [16] and transcriptome [17] of *B. atrox* snake have shown an absence of BPP structures. However, only a single cluster that matched a 5' untranslated region of a BPP mRNA from *B. jararacussu* snake was found [11]. The BAX12 is the first peptide belonging the BPP family of ACE inhibitor described for *Bothrops atrox*. The complete homology between BPP-BAX12 and other BPP from *Bothrops moojeni* [6] and others BPPs could provide interesting information regarding the evolutionary relationship between *Bothrops* snake species.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to Carlos Bloch Junior, Luciano Paulino da Silva and José de Lima Cardozo Filho (EMBRAPA-CENARGEN) for initial MS analysis, and to Ministry of Science and Technology (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Tecnologia do Acre (FUNTAC/FDCT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) – Projeto NanoBiotec, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE/CNPq/MCT), Instituto Nacional para Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INCT-INPeTAm/CNPq/MCT), Secretary of Development of Rondonia State (PRONEX/CNPq) for financial support.

6. References

1. Wermelinger, L.S.; Dutra, D.L.; Oliveira-Carvalho, A.L.; Soares, M.R.; Bloch Jr, C.; Zingali, R.B. Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1703-1708.
2. Fernandez, J.H.; Neshich, G.; Camargo, A.C.M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genet. Mol. Res.* **2004**, *3*, 554-563.
3. Ferreira, S.H. A Bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Brit. J. Pharmacol.* **1965**, *24*, 163-169.

4. Smith, C.G.; Vane, J.R. The Discovery of Captopril. *FASEB J.* **2003**, *17*, 788-789.
5. Escoubas, P.; Quinton, L.; Nicholson, G.M. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 279-295.
6. Menin, L.; Perchuc, A.; Favreau, P.; Perret, F.; Michalet, S.; Schöni, R.; Wilmer, M.; Stöcklin, R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon* **2008**, *51*, 1288-1302.
7. Ianzer, D.; Konno, K.; Marques-Porto, R.; Portaro, F.C.V.; Stöcklin, R.; Camargo, A.C.M.; Pimenta, D.C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides* **2004**, *25*, 1085-1092.
8. Seidler, J.; Zinn, N.; Boehm, M.E.; Lehmann, W.D. *De novo* sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics* **2010**, *10*, 634-649.
9. Ferreira, L.A.F.; Galle, A.; Raida, M.; Schrader, M.; Lebrun, I.; Habermehl, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *J. Protein Chem.* **1998**, *17*, 285-289.
10. Souza, G.H.M.F.; Catharino, R.R.; Ifa, D.R.; Eberlin, M.N.; Hyslop, S. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 594-599.
11. Cintra, A.C.O.; Vieira, C.A.; Giglio, J.R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. *J. Protein Chem.* **1990**, *9*, 221-227.
12. Hayashi M.A.F., Murbach A.F., Ianzer D., Portaro F.C.V., Prezoto B.C., Fernandes B.L., Silveira P.F., Silva C.A., Pires R.S., Britto L.R.G., Dive V., Camargo A.C.M. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 969-977.
13. Rioli V., Prezoto B.C., Konno K., Melo R.L., Klitzke C.F., Ferro E.S., Ferreira-Lopes M., Camargo A.C.M., Portaro F.C.V. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. *FEBS J.* **2008**, *275*, 2442-2454.
14. 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* **2012**, *11*, 1245-1262.
15. Calvete, J.J.; Sanz, L.; Pérez, A.; Borges, A.; Vargas, A.M.; Lomonte, B.; Angulo, Y.; Gutiérrez, J.M.; Chalkidis, H.M.; Mourão, R.H.V.; Furtado, M.F.D.; Moura-Da-Silva, A.M. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J. Proteomics* **2011**, *74*, 510-527.

16. Guércio, R.A.P.; Shevchenko, A.; Shevchenko, A.; López-Lozano, J.L.; Paba, J.; Sousa, M.V. and Ricart, C.A.O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* **2006**, *4*, 14.
17. Neiva, M.; Arraes, F.B.M.; Souza, J.V.; Radis-Baptista, G.; Silva, A.R.B.P.; Walter, M.E.M.T.; Brigido, M.M.; Yamane, T.; Lopez-Lozano, J.L., Astolfi-Filho, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon* **2009**, *53*, 427–436.

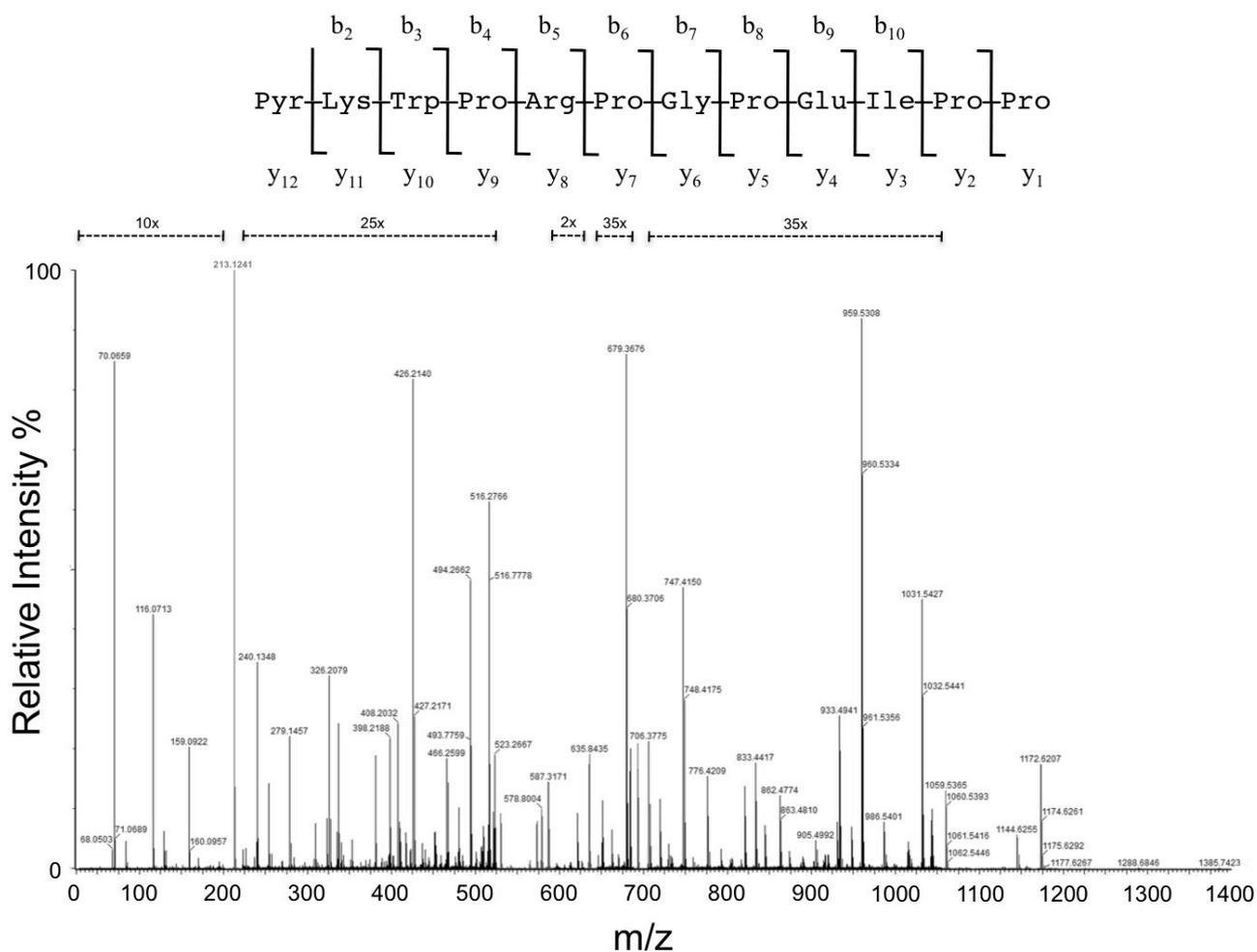


Figure 1. Collision-induced dissociation spectra of BPP-BAX12. The deduced sequence is shown at the top of the MS/MS profile. The inset shows the assigned peptide sequence.

Table 1. Diagnostic peptide fragments (b, a and y-type ions) obtained by collision-induced dissociation with argon gas used for *de novo* peptide sequencing of BPP-BAX12.

Aminoacid Residue	Fragment	b-type ions				Fragment	a-type ions				Fragment	y-type ions			
		Theoretical (m/z)	Measured (m/z)	Intensity (counts)	Accuracy (ppm)		Theoretical (m/z)	Measured (m/z)	Intensity (counts)	Accuracy (ppm)		Theoretical (m/z)	Measured (m/z)	Intensity (counts)	Accuracy (ppm)
Z	b ₁	112.0399	-	-	-	a ₁	84.0688	-	-	-	y ₁₂	1384.7377	1384.7548	1.6x10 ²	11.7
K	b ₂ *	223.1083	223.1082	2.7x10 ³	0.2	a ₂ *	195.1134	195.1134	4.0x10 ³	-0.2	y ₁₁	1273.7057	1273.6853	1.6x10 ²	16.0
	b ₂	240.1348	240.1348	5.2x10 ⁴	0.1	a ₂	212.1399	212.1405	6.1x10 ³	-2.9	y ₁₁ *	1256.6792	-	-	-
W	b ₃	426.2141	426.2140	1.2x10 ⁵	0.3	a ₃	398.2192	398.2188	3.3x10 ⁴	1.0	y ₁₀	1145.6107	1145.6276	2.0x10 ⁵	14.8
P	b ₄	523.2669	523.2667	2.9x10 ⁴	0.4	a ₄	495.2720	495.2684	3.1x10 ⁴	7.2	y ₉	959.5314	959.5308	9.9x10 ⁴	0.6
R	b ₅ *	662.3415	622.3417	7.0x10 ³	-0.4	a ₅ *	634.3466	634.3317	3.7x10 ⁴	23.4	y ₈	862.4786	862.4774	1.3x10 ⁴	1.4
	b ₅	679.3680	679.3676	9.3x10 ⁴	0.6	a ₅	651.3731	651.3705	1.2x10 ⁴	4.0	y ₈ *	845.4520	845.4680	6.0x10 ³	-18.9
P	b ₆	776.4208	776.4209	1.7x10 ⁴	-0.2	a ₆	748.4259	748.4175	3.0x10 ⁴	11.2	y ₇	706.3775	706.3775	2.3x10 ⁴	0.0
G	b ₇	833.4422	833.4417	1.9x10 ⁴	-0.6	a ₇	805.4473	805.4473	1.8x10 ³	0.0	y ₆	609.3248	609.3238	3.6x10 ²	1.6
P	b ₈	930.4950	930.4941	8.4x10 ³	1.0	a ₈	902.5001	902.5016	1.2x10 ³	-1.7	y ₅	552.3033	552.3032	4.8x10 ³	0.2
E	b ₉ #	1041.5273	1041.5265	2.0x10 ³	0.8	a ₉ #	1013.5321	1013.5197	4.4x10 ²	12.2	y ₄	455.2505	455.2492	3.7x10 ²	2.8
	b ₉	1059.5376	1059.5365	5.0x10 ⁵	1.0	a ₉	1031.5427	1031.5427	4.9x10 ⁴	0.0	y ₄ #	437.2399	437.2360	6.3x10 ³	9.0
I/L	b ₁₀	1172.6206	1172.6207	6.6x10 ⁵	-0.1	a ₁₀	1144.6257	1144.6255	2.1x10 ⁵	0.2	y ₃	326.2081	326.2079	4.9x10 ⁴	0.7
P	b ₁₁	1269.6734	-	-	-	a ₁₁	1241.6785	-	-	-	y ₂	213.1241	213.1241	3.8x10 ⁶	-0.1
P	b ₁₂	1366.7261	-	-	-	a ₁₂	1338.7312	-	-	-	y ₁	116.0712	116.0713	1.6x10 ⁵	-1.2

Immonium ions detected Theoretical m/z, measured m/z [accuracy (ppm)]: Z 84.04496, 84.0446 [4.3]; K(-NH₃) 84.08129, 84.08144 [-1.3]; R(-NH₃) 112.08746, 112.0877 [-2.2]; W 159.09220, 159.0922 [0.0]; P 70.06568, 70.0659 [3.1]; I/L 86.09698, 86.0970 [-0.2]. * loss of a neutral ammonia (NH₃) molecule from K or R side chains. # loss of a neutral H₂O molecule from E side chain.

Table 2. Diagnostic internal fragments (b and a-type ions) ions obtained by collision-induced dissociation with argon gas used for *de novo* peptide sequencing of BPP-BAX12.

Fragments	b-type ions				a-type ions			
	Theoretical (m/z)	Measured (m/z)	Intensity (counts)	Accuracy (ppm)	Theoretical (m/z)	Measured (m/z)	Intensity (counts)	Accuracy (ppm)
KWPRPGP	819.4629	-	-	-	791.46799	-	-	-
KWPRPGP*	802.4364	802.4401	2.3x10 ²	-4.6	774.44149	-	-	-
KWPRPG	722.4102	-	-	-	694.41529	-	-	-
KWPRPG*	705.3836	705.3939	8.2x10 ²	-14.6	677.38869	677.3793	1.0x10 ³	13.9
KWPRP	665.3887	-	-	-	637.39379	-	-	-
KWPRP*	648.3622	-	-	-	620.36729	-	-	-
KWPR	568.3359	-	-	-	540.34099	540.3436	1.7x10 ²	-4.8
KWPR*	551.3094	-	-	-	523.31449	-	-	-
KWP	412.2349	412.2426	4.9x10 ²	-18.7	384.23999	-	-	-
KWP*	395.2083	-	-	-	367.21339	-	-	-
KW	315.1821	315.1797	2.2x10 ²	7.6	287.18719	-	-	-
KW*	298.1556	298.1567	6.3x10 ²	-3.7	270.16069	270.1608	1.9x10 ³	-0.4
WPRPGPEIP	1030.5474	1030.5469	1.0x10 ³	0.5	1002.5525	1002.5590	1.3x10 ²	-6.5
WPRPGPEIP*	1013.5209	1013.5197	4.4x10 ²	1.1	985.5259	-	-	-
WPRPGPEI	933.4946	933.4941	2.8x10 ⁴	0.5	905.4997	905.4992	5.0x10 ³	0.5
WPRPGPEI*	916.4681	916.4681	2.5x10 ³	0.0	888.4731	888.4796	9.8x10 ²	-7.3
WPRPGPE	820.4106	820.4102	1.5x10 ⁴	0.5	792.4157	792.4160	3.4x10 ³	-0.4
WPRPGPE*	803.3841	803.3862	1.5x10 ³	-2.7	775.3891	775.3857	6.3x10 ²	4.4
WPRPGP	691.3680	691.3715	7.7x10 ²	-5.1	663.3731	-	-	-
WPRPGP*	674.3415	-	-	-	646.3465	646.3524	3.0x10 ²	-9.1
WPRPG	594.3152	594.3206	2.4x10 ³	-9.1	566.3203	-	-	-

WPRPG*	577.2887	577.2831	1.9x10 ²	9.6	549.2937	-	-	-
WPRP	537.2938	-	-	-	509.2989	-	-	-
WPRP*	520.2673	-	-	-	492.2723	492.2757	1.6x10 ²	-6.8
WPR	440.2410	440.2399	4.6x10 ³	2.5	412.2461	-	-	-
WPR*	423.2145	423.2138	2.2x10 ³	1.5	395.2195	395.2174	8.6x10 ²	5.4
WP	284.1399	-	-	-	256.1450	256.1468	5.5x10 ²	-7.1
PRPGPEIP	844.4681	844.4672	7.8x10 ³	1.1	816.4732	-	-	-
PRPGPEIP*	827.4416	827.4381	1.6x10 ²	4.2	799.4466	-	-	-
PRPGPEI / RPGPEIP	747.4153	747.4150	5.1x10 ⁴	0.4	719.4204	719.4196	1.3x10 ⁴	1.1
PRPGPEI* / RPGPEIP*	730.3888	730.3976	4.4x10 ³	-12.1	702.3938	702.4028	1.4x10 ³	-12.7
PRPGPE	634.3313	634.3317	3.7x10 ⁴	-0.6	606.3364	606.3362	1.1x10 ⁴	0.3
PRPGPE*	617.3048	617.3059	3.4x10 ³	-1.9	589.3098	589.3193	2.2x10 ³	-16.0
PRPGP	505.2887	505.2886	1.6x10 ³	0.2	477.2938	477.295	3.9x10 ²	-2.5
PRPGP*	488.2622	488.2668	1.4x10 ²	-9.5	460.2672	-	-	-
PRPG / RPGP	408.2359	408.2354	2.2x10 ³	1.2	380.2410	380.2346	5.6x10 ²	16.8
PRPG* / RPGP*	391.2094	-	-	-	363.2144	-	-	-
PRP	351.2145	351.2112	2.1x10 ³	9.4	323.2196	-	-	-
PRP*	334.1880	334.1869	6.7x10 ²	3.2	306.1930	-	-	-
PR/RP	254.1617	254.1616	2.2x10 ⁴	0.4	226.1668	-	-	-
PR/RP*	237.1352	237.136	2.8x10 ³	-3.6	209.1402	209.1388	4.1x10 ²	6.9
RPGPEI	650.3626	650.3616	4.7x10 ³	1.5	622.3677	-	-	-
RPGPEI*	633.3361	-	-	-	605.3411	605.3397	1.2x10 ³	2.4
RPGPE	537.2785	537.2814	2.9x10 ³	-5.4	509.2836	509.2862	2.2x10 ³	-5.1
RPGPE*	520.2520	520.2515	9.3x10 ²	0.9	492.2570	492.2552	6.2x10 ²	3.7
RPG	311.1832	-	-	-	283.1883	-	-	-
RPG*	294.1567	294.1559	2.4x10 ²	2.6	266.1617	-	-	-
PGPEI / GPEIP	494.2614	494.2662	7.3x10 ⁴	-9.7	466.26649	466.2599	2.8x10 ⁴	14.1
PGPE	381.1774	381.1775	2.9x10 ⁴	-0.3	353.18249	353.1827	7.3x10 ³	-0.6
PGP	252.1348	252.1336	7.0x10 ²	4.8	224.13989	224.1421	3.6x10 ²	-9.9
PG / GP	155.0820	155.0794	3.2x10 ²	16.8	127.08709	127.0866	7.4x10 ²	3.9
GPEI	397.2087	397.2104	3.6x10 ³	-4.3	369.21379	369.2137	2.0x10 ³	0.2
GPE	284.1246	284.1254	2.7x10 ³	-2.8	256.12969	256.1284	3.5x10 ²	5.0
PEIP	437.2400	437.2360	6.2x10 ³	9.1	409.24509	409.2417	6.2x10 ²	8.3
PEI / EIP	340.1872	340.1877	6.5x10 ³	-1.5	312.19229	312.1927	1.5x10 ³	-1.3
PE	227.1032	227.1032	5.0x10 ³	0.0	199.10829	199.1078	2.5x10 ³	2.5
EI	243.1345	243.1356	3.7x10 ²	-4.5	215.13959	-	-	-
IP	211.1446	211.1445	3.1x10 ³	0.5	183.14969	183.1503	1.2x10 ³	-3.3

*loss of a neutral ammonia (NH₃) molecule from K or R side chains.

Table 3. Sequence alignment between BPP-BAX12 and Pyroglutamate peptides/Bradykinin-potentiating (BPPs) sequences from others Bothrops species.

BPP Name	Sequence	Bothrops specie	Reference
BPP-BAX12	ZKWPRPGPEIPP	<i>Bothrops atrox</i>	
-	ZKWPRPGPEIPP	<i>B. moojeni</i>	[6]
-	ZNWPRPGPEIPP	<i>B. moojeni</i>	[6]
BPP3_BOTNU, BPP13_BOTMO, BPP13_BOTLC, BPP13_BOTER, BPP13_BOTAL, BNP_BOTIN, BNP2_BOTJA, BNP1_BOTJA, Q8QG90_BOTIN, BNP_BOTJR #	ZGGWPRPGPEIPP	<i>B. neuwiedi</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. leucurus</i> , <i>B. erythromelas</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. insularis</i> , <i>B. jararaca</i> , <i>B. jararaca</i> , <i>B. insularis</i> , <i>B. jararacus</i>	[1,9,10,11,12,13]
BPP-13a	ZGGWPRPGPEIPP	<i>B. cotiara</i> , <i>B. fonsecai</i>	[14]
BPP-13b	ZGGLPRPGPEIPP	<i>B. cotiara</i> , <i>B. fonsecai</i>	[14]

#Entry name from UniProtKB.