

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

DARLENE LOPES RANGEL

Caracterização da peçonha de *Bothrops pubescens* através de técnicas proteômicas e avaliação da sua toxicidade em músculo *biventer cervicis* de pintainho.

**SÃO GABRIEL
2022**

DARLENE LOPES RANGEL

Caracterização da peçonha de *Bothrops pubescens* através de técnicas proteômicas e avaliação da sua toxicidade em músculo *biventer cervicis* de pintainho.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Paulo Marcos Pinto

**SÃO GABRIEL
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

R196c Rangel, Darlene Lopes
Caracterização da peçonha de *Bothrops pubescens* através de técnicas proteômicas e avaliação da sua toxicidade em músculo biventer cervicis de pintainho. / Darlene Lopes Rangel.
73 p.

Tese (Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2022.
"Orientação: Paulo Marcos Pinto".

1. Serpentes. 2. Peçonha. 3. Espectrometria de massas. 4. Toxinologia. I. Título.

DARLENE LOPES RANGEL

Caracterização da peçonha de *Bothrops pubescens* através de técnicas proteômicas e avaliação da sua toxicidade em músculo *biventer cervicis* de pintainho.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Tese defendida e aprovada em: 25 de novembro de 2022.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Orientador
(UNIPAMPA)

Prof. Dra. Lucia Helena do Canto Vinadé
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Rodrigo Ligabue-Braun
(UFCSPA)

Prof. Dr. Tiago Gomes do Santos
(UNIPAMPA)

AGRADECIMENTO

A minha família, principalmente meus pais, por sempre me apoiarem e fazerem o possível para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao professor Paulo, por todos esses anos de orientação e amizade, por não medir esforços para que seus alunos alcançassem o que almejavam.

Aos integrantes do LPA, que durante esses dez anos foram vários, cada um com suas características e peculiaridades, mas que sempre fizeram parte de um time descontraído e unido.

Ao Pedro, por todo companheirismo, carinho, dedicação e principalmente paciência.

Ao Dr. Neil Kelleher e ao Dr. Rafael Melani por me aceitarem no seu laboratório na Northwestern University, possibilitando que eu realizasse minha pesquisa exterior, que sempre foi um grande sonho.

Aos meus amigos do Abóboras Famintos, que sempre estiveram comigo nos finais de semana mais divertidos e também nos não tão divertidos assim.

A minha melhor amiga Lays, por sempre me escutar e apoiar, mas sem nunca deixar de me falar umas verdades, por mais doloridas que fossem de ouvir.

A Unipampa, por oferecer um ensino de qualidade e gratuito.

“The trip has been long and the cost has been high, but no great thing was ever attained easily. A long tale, like a tall tower, must be built a stone at a time”.

Stephen King.

RESUMO

O gênero *Bothrops* compreende várias espécies de serpentes que ocorrem no continente americano, do México até a Argentina. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado por efeitos locais, incluindo hemorragia, edema, dor e mionecrose, assim como efeitos sistêmicos como coagulopatias e falha renal. A composição do veneno de algumas espécies do gênero *Bothrops* já é conhecida através da venômica ou indiretamente através de estudos transcriptômicos. *Bothrops pubescens* é uma serpente peçonhenta de porte médio que ocorre restritamente no Rio Grande do Sul e Uruguai. Foi observado que a dieta desta serpente consiste em lacraias, anfíbios, lagartos, serpentes, mamíferos e aves e há variação ontogenética na dieta. Considerando o grande potencial das moléculas encontradas em peçonhas do gênero *Bothrops*, a ocorrência da espécie *B. pubescens* exclusivamente no Bioma Pampa e a falta de informações sobre a sua peçonha, esse estudo visou elucidar a composição da peçonha de *B. pubescens* através de técnicas proteômicas para uma completa caracterização da peçonha, assim como analisar o seu efeito sobre a junção neuromuscular *biventer cervicis* de pintainho. Para isso, realizamos análises de BUP, TDP e nTDP. Para a análise toxinológica o músculo *biventer cervicis* de pintainho foi exposto a peçonha de *B. pubescens* em diferentes concentrações. Com a técnica de BUP foram identificados 89 grupos proteicos pertencentes a 13 famílias de toxinas, já com a técnica de TDP foram identificadas 40 proteoformas únicas pertencentes a 6 famílias de toxinas. Também identificamos um complexo multi-proteofórmico de uma LAAO utilizando nTDP. Na análise da toxicidade da peçonha demonstramos que a peçonha de *B. pubescens* em altas concentrações é capaz de causar bloqueio neuromuscular total e irreversível frente a preparações isoladas de ave, já em concentrações reduzidas, produz um bloqueio parcial e reversível, demonstrando a sua toxicidade para o sistema nervoso somático.

Palavras chave: Serpentes, peçonha, espectrometria de massas, toxinologia.

ABSTRACT

The *Bothrops* genus comprises several species of snakes that occur in the American continent, from Mexico to Argentina. Envenomation by snakes of the *Bothrops* genus is characterized by local effects, including hemorrhage, swelling, pain, and myonecrosis, as well as systemic effects such as coagulopathies and renal failure. The venom composition of some *Bothrops* species is already known through venomomics or indirectly through transcriptomic studies. *Bothrops pubescens* is a medium-sized venomous snake that occurs exclusively in Rio Grande do Sul and Uruguay. It was observed that its diet consists of centipedes, amphibians, lizards, snakes, mammals and birds and there is ontogenetic variation in the diet. Considering the great potential of the molecules found in *Bothrops* venoms, the occurrence of *B. pubescens* exclusively in the Pampa Biome and the lack of information about its venom, this study aimed to elucidate the composition of the venom of *B. pubescens* through proteomic techniques, as well as to analyze its effect on the chick biventer cervicis neuromuscular junction. For this, we performed BUP, TDP and nTDP analyses. For toxinological analysis, chick biventer cervicis was exposed to *B. pubescens* venom at different concentrations. With the BUP technique, 89 protein groups belonging to 13 families of toxins were identified, while with the TDP technique, 40 unique proteoforms belonging to 6 families of toxins were identified. We also identified a multi-proteoform complex of a LAAO using nTDP. In the analysis of the venom's toxicity, we demonstrated that the venom of *B. pubescens* in high concentrations is capable of causing total and irreversible neuromuscular blockade against isolated preparations of birds, but in reduced concentrations, it produces a partial and reversible blockade, demonstrating its toxicity for the somatic nervous system.

Keywords: Snakes, venom, mass spectrometry, toxinology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de serpentes peçonhentas do Brasil.....	14
Figura 2 – Dentição solenóglifa apresentada pelos gêneros <i>Crotalus</i> , <i>Lachesis</i> e <i>Bothrops</i>	15
Figura 3 – <i>Bothrops pubescens</i>	16
Figura 4 – Representação das estruturas de SVMs.....	19
Figura 5 – Esquema representando a estratégia venômica desenvolvida por Calvete em 2007.....	25
Figura 6 – Ilustração demonstrando a técnica de eletroforese em SDS-PAGE.....	27
Figura 7 – Ilustração de como ocorre a cromatografia por gel filtração.....	28
Figura 8 – Esquema demonstrando uma análise por espectrometria de massas.....	30
Figura 9 – Comparação entre a BUP e TDP.....	
Figura 10 – Extração manual da peçonha de <i>B. pubescens</i>	56
Figura 11 – Isolamento do músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	57
Figura 12 – Efeito das concentrações da peçonha de <i>B. pubescens</i> sobre o músculo <i>biventer cervicis</i> de pintainho.....	59
Figura 13 –Análise por SDS-PAGE do veneno de <i>B. pubescens</i> em condições reduzidas e não reduzidas.....	60

LISTA DE SIGLAS

OMS – Organização mundial da saúde
SVMP – Metaloproteinase de veneno de serpente
SVSP – serinoprotease de veneno de serpente
PLA₂ – Fosfolipase A2
PTM – Modificação pós traducional
PL – Fosfolipase B
LAAO – L-aminoácido oxidase
CTL – Lectinas do tipo C
CRISP – proteínas secretoras ricas em cisteína
HYA – Hialuronidases
NT – Nucleotidases
VEGF – Fator de crescimento vaso-endotelial
NGF – Fator de crescimento de nervo
BPP – Peptídeos potenciadores de bradicinina
SEC – Cromatografia por exclusão de tamanho
RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão de fase reversa
MS – Espectrometria de massas
ESI – Ionização por *electrospray*
MALDI – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz.
BUP – Proteômica *bottom-up*
TDP – Proteômica *top-down*
nTDP – Proteômica *top-down* nativa
dTDP – Proteômica *top-down* desnaturante
TOF – Tempo de voo
FT-ICR – *Fourier transform ion cyclotron resonance*
FT – Orbitrap – *Fourier transform orbital trapping*
CID – *Beam-type collision-induced dissociation*
CAD – *Collisionally activated dissociation*
HCD – *High-energy collision dissociation*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	SERPENTES.....	13
1.2.	GÊNERO <i>Bothrops</i>	15
1.3.	PEÇONHA.....	17
1.4.	COMPONENTES DA PEÇONHA.....	18
1.4.1.	FAMÍLIAS DE PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES NA PEÇONHA DO GÊNERO <i>Bothrops</i>	18
1.4.2.	FAMÍLIAS DE PROTEÍNAS MENOS ABUNDANTES NA PEÇONHA DO GÊNERO <i>Bothrops</i>	21
1.5.	VENÔMICA.....	23
1.6.	PROTEÔMICA.....	26
1.6.1.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	29
1.6.2.	PROTEÔMICA <i>BOTTOM UP</i>	30
1.6.3.	PROTEÔMICA <i>TOP DOWN</i>	31
2.	OBJETIVO.....	34
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	34
2.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	34
CAPÍTULO 1 - ANÁLISE VENÔMICA DA PEÇONHA DE <i>B. pubescens</i>		35
CAPÍTULO 2 - ANÁLISES INICIAIS E TOXINOLÓGICAS.....		55
1	INTRODUÇÃO.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1.	AMOSTRAS DE PEÇONHA.....	55
2.2.	MANUTENÇÃO DE <i>Gallus gallus domesticus</i>	56
2.3.	TÉCNICA MIOGRÁFICA.....	56
2.4.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58

2.5. SDS-PAGE.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.1. EFEITO DA PENHOÇA DE <i>B. pubescens</i> SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR EM PREPARAÇÃO <i>BIVENTER CERVICIS</i> DE PINTAINHO.....	58
3.2. ANÁLISE POR SDS-PAGE.....	60
CONCLUSÃO.....	62
PERSPECTIVAS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes

Todos os ecossistemas da Terra possuem organismos venenosos, somando mais de 170.000 espécies de todos os maiores filos da árvore evolutiva do reino animal, dos cnidários aos anelídeos, equinodermos, moluscos, artrópodes e cordados (Petras *et al*, 2015). A ordem Squamata, grupo monofilético formado principalmente por lagartos, serpentes e anfisbenas, é composto por, aproximadamente, 8.430 espécies, representando o maior componente da diversidade de vertebrados terrestres do mundo (Oguiura *et al*, 2010).

As serpentes, subordem compreendida por cerca de 3.150 espécies, divididas em 24 famílias (Uetz, 2018) são animais de corpo alongado com ausência de apêndices locomotores, pálpebras móveis e ouvido externo (Underwood, 1967), as quais habitam praticamente todo o mundo, excluindo as calotas Polares. O território brasileiro possui uma fauna muito rica, totalizando cerca de 405 espécies de serpentes (Costa & Bérnils, 2018).

Serpentes peçonhentas, pertencentes a superfamília Colubridae, incluem o maior grupo de animais peçonhentos. Entre todas as serpentes, as pertencentes à família Viperidae e a família Elapidae são as mais importantes clinicamente, causando a maioria dos casos de envenenamento e fatalidades em humanos e animais domésticos (Gutierrez *et al*, 2017).

Vários estudos têm demonstrado que picadas de serpentes estão relacionadas a fatores climáticos e o aumento de atividade de trabalhadores em áreas rurais. O número de casos aumenta durante estações quentes e chuvosas, o que coincide com o período de maior atividade humana nestas zonas. Vítimas de picadas de serpentes usualmente são homens e os membros inferiores são geralmente os mais afetados (Ministério da Saúde, 2021; Mamede *et al*, 2020; Chippaux, 2017).

O envenenamento por picada de serpente é considerado uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (*World Health Organization*, 2021). A peçonha é injetada através de presas, que são dentes modificados conectados por um ducto a glândula de veneno (Gutierrez *et al*, 2017)

No Brasil, as serpentes peçonhentas estão distribuídas em duas famílias, Viperidae e Elapidae, das quais contém quatro gêneros com maior relevância epidemiológica: *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis* (Figura 1) (Mamede et al, 2020). De acordo com o Ministério da Saúde, em 2020 mais de 31.000 acidentes ofídicos ocorreram no país, dos quais aproximadamente 121 resultaram em óbito das vítimas. Destes números, 70% dos acidentes ofídicos foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, cerca de 9% causados por serpentes do gênero *Crotalus*, 1,5% causados por serpentes do gênero *Lachesis*, e menos de 1% dos registros foram causados por serpentes do gênero *Micrurus*. (Ministério da Saúde, 2021).

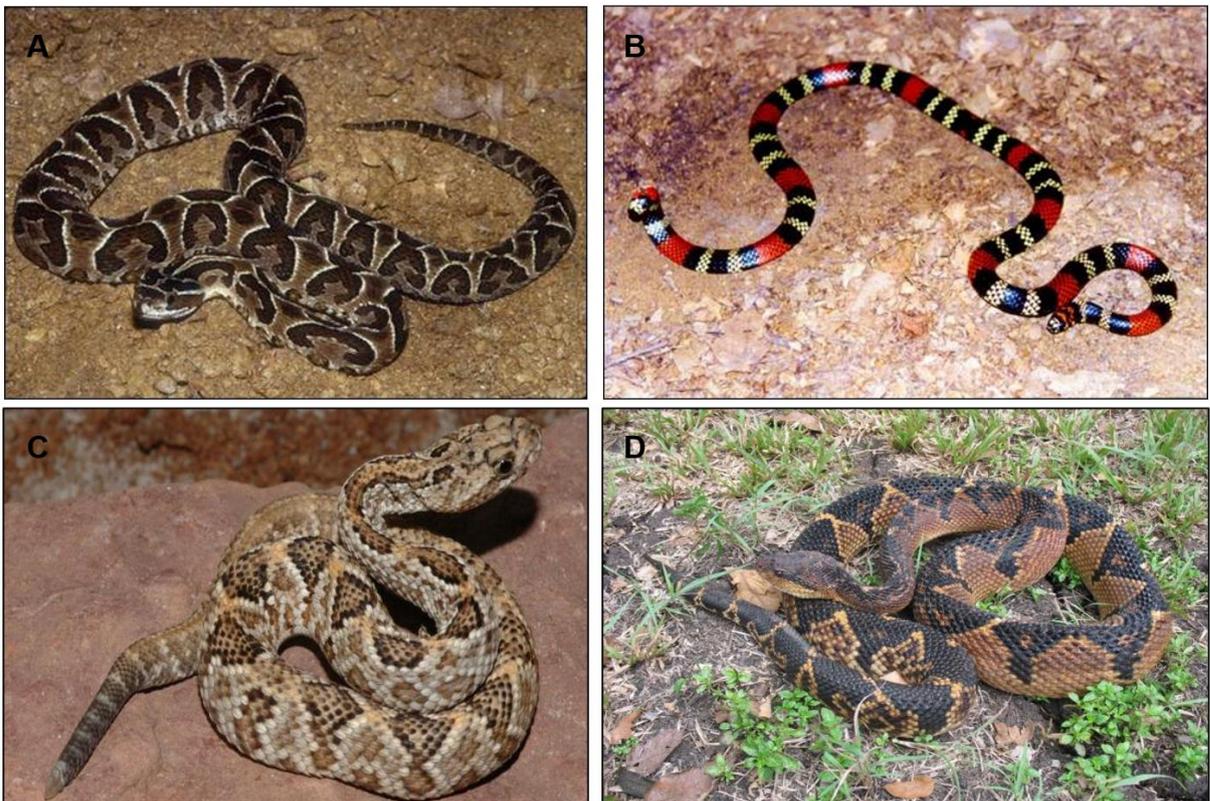


Figura 1. Exemplos de serpentes peçonhentas do Brasil. A – *Bothrops alternatus*; B – *Micrurus altirostris*; C – *Crotalus durissus*; D – *Lachesis muta*. Fonte: A e B - <https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs>; C e D - <http://www.reptile-database.org>.

A família Viperidae é compreendida pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*, apresentam dentição solenóglifa, caracterizada pela presença de dois dentes grandes que se projetam para fora no momento da inoculação da peçonha.

(Alves, 2007; Costa & Bérnils, 2014). Estes gêneros são de maior importância médica devido à sua ampla distribuição geográfica, hábitos terrestres e arborícola, que aumentam as chances de encontro com o homem e, à sua agressividade relacionada ao modo de caça predatório baseado em botes de presas relativamente grandes (Figura 2) (Warrel, 2004).

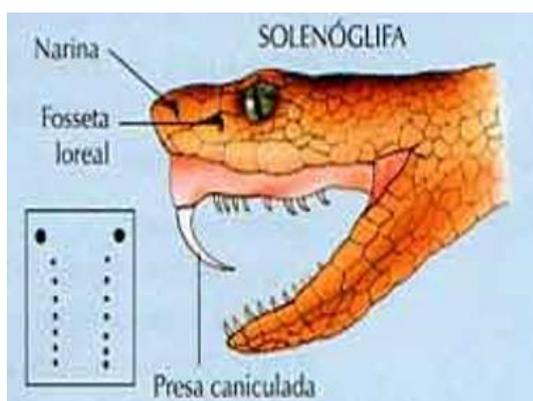


Figura 2: Dentição solenóglifa apresentada pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*. Fonte: <https://planetabiologia.com/os-tipos-de-serpentes-peconhentas>.

1.2 Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* é composto por 47 espécies que estão distribuídos do México até a Argentina (Reptile Database, 2021). Essas espécies habitam principalmente o território brasileiro e são responsáveis por grande parte dos casos de envenenamento por serpente no país, a maioria acontecendo em área rural (Albuquerque, 2020).

As espécies dentro do gênero *Bothrops* exibem uma ampla variedade de formas de corpo e traços de história natural maior do que qualquer outra espécie de serpente mundial. Essa maior diversidade tem sido atribuída ao fato de que o grupo *Bothrops* foi o primeiro grupo de serpentes a chegar à América do Sul, dando assim ampla oportunidade para irradiação adaptativa (Silva & Rodrigues, 2008).

Representantes do grupo *neuwiedi* de *Bothrops* são amplamente distribuídos em áreas que vão do noroeste do Brasil ao sudeste da Argentina. *B. erythromelas* é restrita a região da Caatinga, *B. lutzi*, *B. pauloensis* e *B. marmoratus* ocorrem principalmente no Cerrado, *B. matogrossensis* e *B. diporus* são distribuídas em

Charco, *B. neuwiedi* ocorre nas montanhas do sudeste brasileiro e *B. pubescens* é limitada a região do Pampa, no sul do Brasil e no Uruguai (Machado *et al.*, 2014).

B. pubescens é uma serpente peçonhenta de porte médio que ocorre restritamente no estado do Rio Grande do Sul e no Uruguai. Até recentemente era considerada uma das 12 subespécies de *B. neuwiedi*, mas foi elevada à categoria específica por Silva (2004) (Figura 3). Foi observado que a dieta desta serpente consiste em lacraias, anfíbios, lagartos, serpentes, mamíferos e aves e há variação ontogenética na dieta, onde indivíduos pequenos alimentam-se principalmente de anfíbios e não consomem mamíferos, indivíduos de tamanho mediano predam todas as categorias de presa e indivíduos grandes consomem exclusivamente mamíferos. Essa variação na dieta pode levar a uma alteração na composição interespécie da peçonha (Borges-Martins *et al.*, 2007).

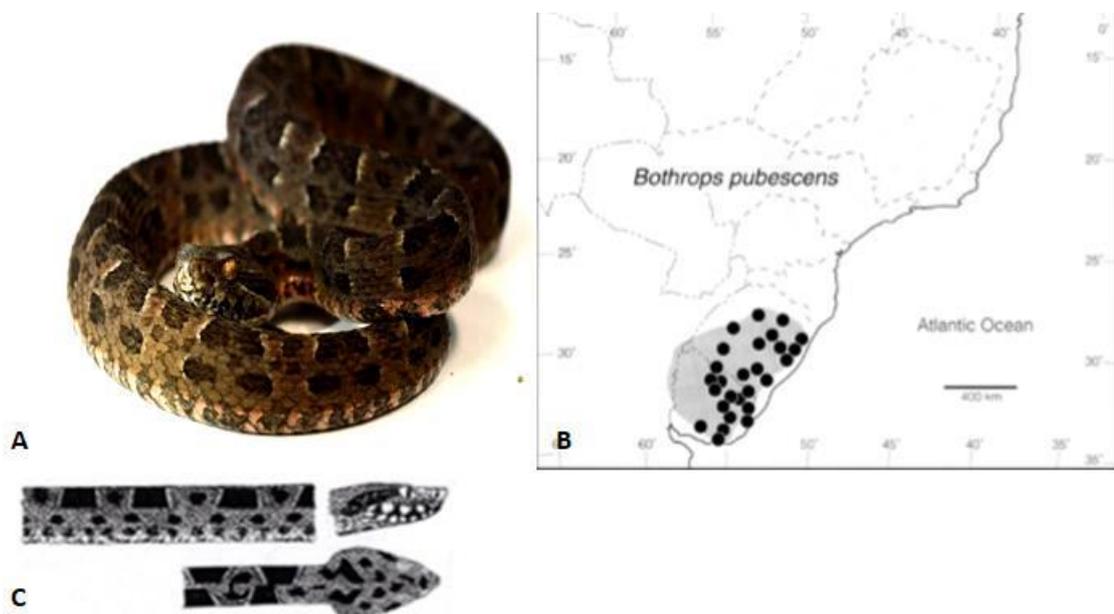


Figura 3: *Bothrops pubescens*. A – Exemplar de *Bothrops pubescens*; B – região onde a espécie ocorre; C – padrão de manchas. Fonte: Maria Eduarda Tabarez.

A composição peptídeo/proteica da peçonha de algumas espécies do gênero *Bothrops* já foi estudada através estudos proteômicos ou indiretamente através de estudos transcriptômicos (Hatakeyama *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2020; Pereira, *et al.* 2020; Nicolau *et al.*, 2017, Andrade-Silva, *et al.*, 2021; Valente, *et al.*, 2018; Sanz *et al.* 2020). Com esses estudos, foi elucidado famílias de proteínas que

compõem a peçonha, como metaloproteinasas de veneno de cobras (SVMP – do inglês, *snake venom metalloproteinase*), serino proteases de veneno de cobras (SVSP – *snake venom serinoprotease*) e fosfolipases A2 (PLA₂), sendo as mais abundantes e mais frequentemente correlacionadas com os sintomas clínicos de envenenamento (Sousa *et al*, 2013).

1.3 Peçonha

A peçonha representa uma inovação que permitiu a transição das serpentes subjugar e digerir as presas de um modo mecânico para um modo químico e representa uma adaptação chave na diversificação desses animais (Alape-Girón *et al*, 2008). A peçonha de serpente é uma adaptação evolucionária que envolve várias toxinas que evoluíram de proteínas cognatas (aquelas que possuem uma função fisiológica normal) através da duplicação de genes seguida por mutações pontuais na sequência codante da proteína e posteriormente ganhando uma nova função (Ohno, 1998).

O uso da peçonha de serpente tem sido documentado desde a antiguidade, como uma arma no campo de batalha, no tratamento de doenças gastrointestinais, artrite e também para longevidade (King, 2013). A primeira vez que foi estabelecido a natureza proteica da peçonha de serpente foi em 1843, por Charles-Lucien Bonaparte, zoólogo francês, que isolou através da precipitação por álcool, substâncias proteicas que reproduziam todos os efeitos do veneno (Calvete, 2013).

Efeitos comuns do envenenamento botrópico, tais como edema, dor e mionecrose são causados por ação direta dos componentes do veneno, predominantemente PLA₂ e SVMP e são agravados por indução da inflamação na qual eicosanoides, histaminas e bradicininas são mediadores importantes (Mamede *et al*, 2020). Complicações como necrose, infecção bacteriana secundária, síndrome compartimental e falha renal aguda também podem ocorrer. Mesmo os casos de morte sendo raros, eles estão frequentemente associados com falha renal e respiratória, choque, sepse e hemorragia no sistema nervoso central (Oliveira, 2019).

A variação da composição do veneno pode ocorrer devido ao gênero do espécime, idade de desenvolvimento, dieta, fatores biológicos, assim como fatores

geográficos, tempo de isolamento e mudanças na dieta (Augusto-de-Oliveira *et al.*, 2016; Zelanis *et al.*, 2011, 2016; Freitas-de-Sousa *et al.*, 2020; Gren *et al.* 2019; Mora-Obando *et al.*, 2020; Simizo *et al.*, 2020).

1.4 Componentes da peçonha

Os componentes da peçonha podem ser divididos em famílias mais abundantes, que são responsáveis pelos principais sintomas de envenenamento observados, e famílias menos abundantes, que apresentam grande potencial biotecnológico e farmacêutico (Modahl *et al.*, 2019).

1.4.1. Famílias de proteínas mais abundantes na peçonha do gênero *Bothrops*.

As SVMP são conhecidas por sua atividade hemorrágica, assim como sua habilidade de influenciar vários processos da cascata de coagulação sanguínea, resultando em uma combinação de hemorragia sistêmica e sangue incoagulável nas presas ou vítimas (Markland & Swenson, 2013).

Primeiramente as SVMP clivam a base da membrana e as proteínas de adesão do complexo da matriz celular endotelial para enfraquecer os vasos capilares. Num segundo estágio, as células endoteliais se soltam da base da membrana, que se tornam extremamente finas, resultando no rompimento da parede capilar e efusão de sangue da parede capilar frágil. Além da atividade de proteinase, SVMP impactam na homeostase alterando a coagulação, que contribui para os efeitos tóxicos hemorrágicos (Ferraz *et al.*, 2019).

Tem sido observado diferenças na atividade das SVMP de acordo com a presença ou ausência de domínios. SVMP da classe P-III são compostas de um domínio metaloproteinase, um domínio tipo desintegrina e um domínio rico em cisteína; a classe P-II é composta de um domínio metaloproteinase e um domínio rico em proteína e a classe P-I é composto de apenas um domínio metaloproteinase (Figura 4) (Williams *et al.*, 2019). A perda de domínios tem resultado na criação das classes P-II e P-I. Em comparação a classe P-I, a classe P-III exibe uma maior atividade hemorrágica e sobretudo uma maior diversidade biológica. O processamento pós-traducional de SVMP também gerou atividades adicionais no

veneno. A classe P-III não sofre quebra de domínio pós-traducional, mas desintegrinas presentes no veneno podem ser produtos de processamento proteolítico da classe P-II de SVMP (Modahl *et al*, 2019).

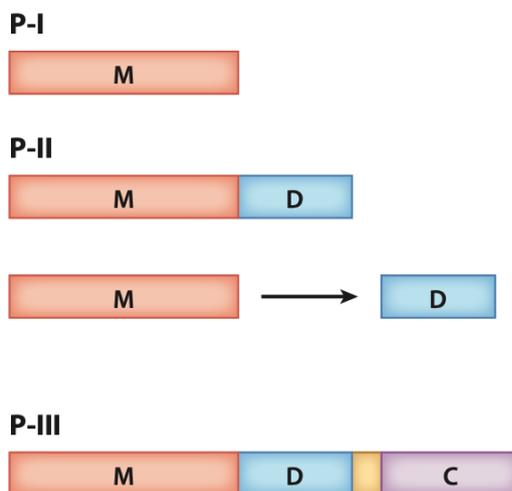


Figura 4: Representação das estruturas de SVMP. SVMP de classe PI apresentam apenas um domínio metaloproteinase (M); SVMP de classe PII possuem um domínio metaloproteinase (M) e um domínio desintegrina (D), a flecha indica a modificação pós-traducional que pode ocorrer nessa classe, gerando uma desintegrina; SVMP de classe PIII são compostas por um domínio metaloproteinase (M), um domínio desintegrina (D) e um domínio rico em cisteína. Fonte: Modahl *et al*, 2019.

Serino proteases de veneno de cobra (SVSP, do inglês *snake venom serine protease*) tem sua toxicidade primária através da alteração do sistema hemostático de suas vítimas, e por induzir edema e hiperalgesia através de mecanismos ainda pouco entendidos. Efeitos hemotóxicos causados por SVSP incluem perturbações da coagulação do sangue (pró-coagulante ou anticoagulante), fibrinólise, agregação de plaquetas e pressão arterial, com consequências potencialmente mortais para vítimas de picadas por serpentes (Ferraz *et al*, 2019)

Uma característica das SVSP é que a maioria são glicoproteínas com um número variável de sítios de glicosilação N e O, resultando diferenças em massas moleculares e pontos isoelétricos nessas modificações pós-traducionais (PTM, do inglês, *post-translational modifications*) (Modahl *et al*, 2019; Soares & Oliveira, 2009)

Fosfolipases (PL), por definição, são enzimas que participam na hidrólise de fosfolípidios de membrana. Elas têm sido classificadas em cinco grupos: A1, A2, B, C e D, baseado na especificidade da hidrólise da ligação éster ao fosfolípido. Fosfolipases A₂ (PLA₂) e B (PLB) são encontradas em venenos botrópico (Djordjevic, 2010).

A presença de um resíduo de aspartato na posição 49 é essencial para a ligação ao Ca²⁺ e então a ocorrência da função catalítica. Entretanto, algumas PLA₂ ofídicas podem apresentar variações no resíduo 49. Por exemplo, um resíduo de lisina pode substituir o aspartato, uma mudança que compromete a ligação ao Ca²⁺ no sítio catalítico. Consequentemente, Lys49 PLA₂ são desprovidas de atividade catalítica, mas elas podem apresentar alta toxicidade e são extensivamente estudadas por sua ação miotóxica (Bustillo *et al*, 2019). Apesar da similaridade estrutural, as PLA₂ de peçonha de serpente exibem uma ampla gama de efeitos, dos quais podem ou não estar relacionados a atividade catalítica, como neurotóxicos, miotóxicos, hemolíticos, edematogênicos, hiperalgésicos, hipotensivo, pró inflamatório, bactericida, anticoagulante e atividade antiplaquetária (Gutiérrez and Lomonte, 2013).

Um número de PLA₂ exercem efeitos miotóxicos fortes, que levam a necrose severa e muitas dessas toxinas também promovem inflamação, incluindo formação de edema, produção de citocinas e recrutamento de leucócitos, dor induzida por alodinia térmica e hiperalgesia mecânica, paralise através do bloqueio da transmissão neuromuscular e intensificação de hemorragia por inibição da coagulação (Ferraz *et al*, 2019).

A ocorrência de PLB em peçonha de serpentes foi inicialmente relatado por Doery e Pearson em 1964. Proteínas PLB encontradas nessas peçonhas existem como formas monoméricas e diméricas com massas moleculares de cerca de 16 kDa e 35 kDa, respectivamente (Djordjevic, 2010).

As L-aminoácido oxidase (LAAO) são glicoproteínas homodiméricas com massas moleculares que variam entre 110 e 150 kDa (Guo *et al*, 2012). As LAAO são produzidas por diferentes organismos, desde bactérias e fungos, até insetos, mamíferos e alguns tipos de serpentes. Flavinas presentes nas LAAO de peçonha de serpente são responsáveis pela cor amarelada da peçonha e contribuem na

toxicidade através do stress oxidativo gerado pela produção de H₂O₂ (Ciscotto *et al*, 2009).

Uma série de efeitos biológicos foram atribuídos à atividade de LAAO, como ativação e/ou inibição de agregação plaquetária, hemorragia, mionecrose e edema (Tan *et al*, 2018). Além disso, LAAOs de diferentes fontes exibem diferenças na especificidade, estabilidade e outras atividades biológicas, como citotoxicidade, hemorragia, hemólise, formação de edema, atividade antitumoral, proliferação, atividades antibacterianas, antivirais, anti-HIV e antiparasitárias (Ribeiro *et al*, 2016).

As LAAO de peçonha de serpente são as mais estudadas e bem caracterizadas, embora seu conteúdo varie entre gêneros e espécies, a maioria dos venenos de Viperidae contêm LAAOs. Em espécies do gênero *Bothrops*, LAAO representam aproximadamente 2% do peso total do veneno bruto, mas esse número é dependente da espécie, habitat e dieta do indivíduo (Ullah, 2012).

As LAAO de peçonha de serpentes *Bothrops* já foram demonstradas como tendo ações anticancerígenas, atividades antiprotozoárias e atividade leishmanicida. (Burin, *et al*, 2020; Machado *et al*, 2019; Barbosa *et al*, 2021; Carone *et al*, 2017)

1.4.2. Famílias de proteínas menos abundantes na peçonha do gênero *Bothrops*.

Moléculas semelhantes à lectina do tipo C (CTL, do inglês, *C-type lectins*), também conhecidas como snaclecs (lectinas do tipo C de peçonha de serpente) se ligam de uma maneira independente de Ca²⁺ e via de interações proteína-proteína com fatores de coagulação IX, X e II prejudicando seus papéis fisiológicos em hemostasia. Snaclecs também reduzem a função plaquetária, inibindo receptores de superfície, como o receptor von Willebrand, GPIb, e o receptor de colágeno, integrina α2β1, ou pela ativação das plaquetas via agrupamento do receptor de colágeno GPVI, fazendo com que sejam retirados da circulação produzindo trombocitopenia (Clemetson, 2010).

As proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP, do inglês, *cysteine-rich secretory protein*) são componentes não enzimáticos presentes em vários organismos. Elas também são encontradas em peçonha de serpente, mas sua função no envenenamento não foi totalmente compreendida até agora. As CRISP de

peçonha de serpente são proteínas de cadeia única com massas moleculares que variam de 20 a 30 kDa. Elas exibem dezesseis resíduos de cisteína altamente conservados que formam oito ligações dissulfeto (Yamazaki & Morita, 2004).

As CRISP são uma classe promissora de componente da peçonha de serpente que pode ser empregada como modelo para futuros medicamentos contra o câncer devido à regulação negativa da angiogênese. Além disso, essa classe de componentes pode auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos contra a leishmaniose e a doença de Chagas (Boldrini-França *et al*, 2017).

As hialuronidases (HYA) de peçonha de serpente são enzimas que hidrolisam preferencialmente o hialuronano, o principal glicosaminoglicano encontrado na matriz extracelular (Bordon, 2015). Elas são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas $\beta \rightarrow 1-4$ dos resíduos N-acetyl- β -D-glucosamina e D-glucuronate de hialurano produzindo tetra e hexasacarídeos. Com isto, durante o envenenamento, hialuronidases facilitam a difusão do veneno no tecido da vítima devido às suas características hidrolíticas, agindo como um "fator de dispersão" e potencializando o efeito das toxinas. Essa classe de enzimas tem sido encontrada em vários organismos, sendo onipresentes em peçonha de serpentes (Boldrini-França *et al*, 2017).

Nucleases e nucleotidases (NT) são enzimas hidrolíticas distribuídas de forma ubíqua em peçonha de serpente. Sua principal função está relacionada à geração de adenosina por meio de sua atividade catalítica. A adenosina pode suportar a biodistribuição da toxina e também contribui para a imobilização da presa, ao mesmo tempo que aumenta a permeabilidade vascular, inibe a liberação de neurotransmissores e promove hipotensão, sedação, depressão locomotora e bradicardia (Boldrini-França *et al*, 2017).

O fator de crescimento vaso-endotelial (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*) estimula a vasculogênese, angiogênese e linfangiogênese. A família de VEGF é dividida em sete grupos, designados como VEGF-A a VEGF-F e fator de crescimento de placenta (Boldrini-França *et al*, 2017). Glândulas de peçonha de serpente apresentam pelo menos 3 VEGF diferentes, com características únicas e com seletividade de receptor distintas, designadas de VEGF-F1 a VEGF-F3 (Yamazaki & Morita, 2006).

Os fatores de crescimento de nervo (NGF, do inglês, *nerve growth factor*) participam na diferenciação neuronal, plasticidade sináptica e neuroproteção no sistema nervoso central e periférico (Mannio *et al*, 1999). A resposta fisiológica para NGF de peçonha de serpente ainda não foi descoberta, entretanto, os efeitos de NGF de mamíferos em células não-neuronais pode ajudar na compreensão de alguns efeitos exercidos por NGF de peçonha de serpente em sistemas de mamíferos (Boldrini-França *et al*, 2017).

NGF de *Naja atra* exerce um efeito sistêmico importante no envenenamento, como extravasamento de plasma e liberação de histamina, que resulta em vulnerabilidade do tecido e facilita a difusão do efeito de toxinas no organismo (Kostiza *et al*, 1996).

Os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP, do inglês, *bradykinin potentiating peptide*) são pequenos oligopeptídeos (5 - 14 resíduos) ricos em prolina com um resíduo piroglutamil amino-terminal, apresentando, invariavelmente, um resíduo prolina no extremidade C-terminal (Munawar *et al*, 2018). Esses peptídeos são conhecidos como inibidores da enzima que converte angiotensina I (ACE, do inglês, *angiotensin-converting enzyme*) em angiotensina II, que é um vasoconstritor potente e um agente hipertensivo. Com a inibição de ACE, as BPP inibem a formação de angiotensina II, reduzindo a pressão arterial (Sciani & Pimenta, 2017).

Os BPPs foram primeiramente descritos no veneno de *B. jararaca* em 1964, por Sergio Ferreira e teve sua atividade como inibidores de ACE demonstrada em 1971, por Ondetti *et al*. (Ferreira, 1964; Ondetti, *et al*, 1971). Investigações posteriores resultaram na aprovação e comercialização do Captopril, que é um medicamento oral peptidomimético de BPP. Este é o melhor e mais conhecido exemplo de investigação e descoberta de drogas a base de peçonha de serpente (Ondetti *et al*, 1971; Cushman & Ondetti, 1999).

1.5. Venômica

As propriedades toxicológicas da peçonha de serpente têm sido estudadas nos últimos 400-500 anos. Entretanto, com o avanço das técnicas de pesquisa moderna, um progresso significativo tem ocorrido em relação a estrutura-função e o

mecanismo pelo qual os componentes da peçonha exercem seus efeitos (Fox & Serrano, 2009).

Na metade do século XX quando bioquímicos começaram a usar diversas formas de cromatografia aplicadas ao estudo de peçonhas de serpentes foi rapidamente observado, mesmo com a tecnologia disponível na época, que a peçonha de serpentes era uma mistura complexa de componentes biológicos ativos (Fox & Serrano, 2008). A partir deste ponto, com a aplicação de métodos mais sofisticados de fracionamento e a subsequente identificação e caracterização de proteínas tem sido temas centrais em toxilogia de venenos com tecnologias mais atuais fornecendo um melhor entendimento dos proteomas (El-Aziz *et al*, 2021).

O termo "venômica" é usado para descrever estudos proteômicos da composição do veneno de serpentes. Contudo, o termo evoluiu para um significado mais amplo e atualmente é usado para descrever estudos que combinam estratégias como genômica, transcriptômica e proteômica para desvendar completamente os componentes do veneno (Boldrini-França *et al*, 2017).

Tecnologias no campo da venômica são ferramentas úteis para explorar a diversidade de toxinas, o que pode resultar de variantes em sequências nucleotídicas em níveis genômicos ou transcriptômicos, assim como modificações pós-traducionais e formação de complexos proteicos observados a níveis proteômicos (Modahl *et al*, 2019).

Primeiramente a venômica seguia um protocolo baseado no fracionamento do veneno total por RP-HPLC, seguido de caracterização inicial de cada fração proteica por uma combinação de sequenciamento N-terminal, análise por SDS-PAGE (em condição reduzida e não reduzida), determinação das massas moleculares e eventualmente, a composição de cisteínas, por espectrometria de massas dos componentes isolados (Figura 5) (Calvete, 2011).

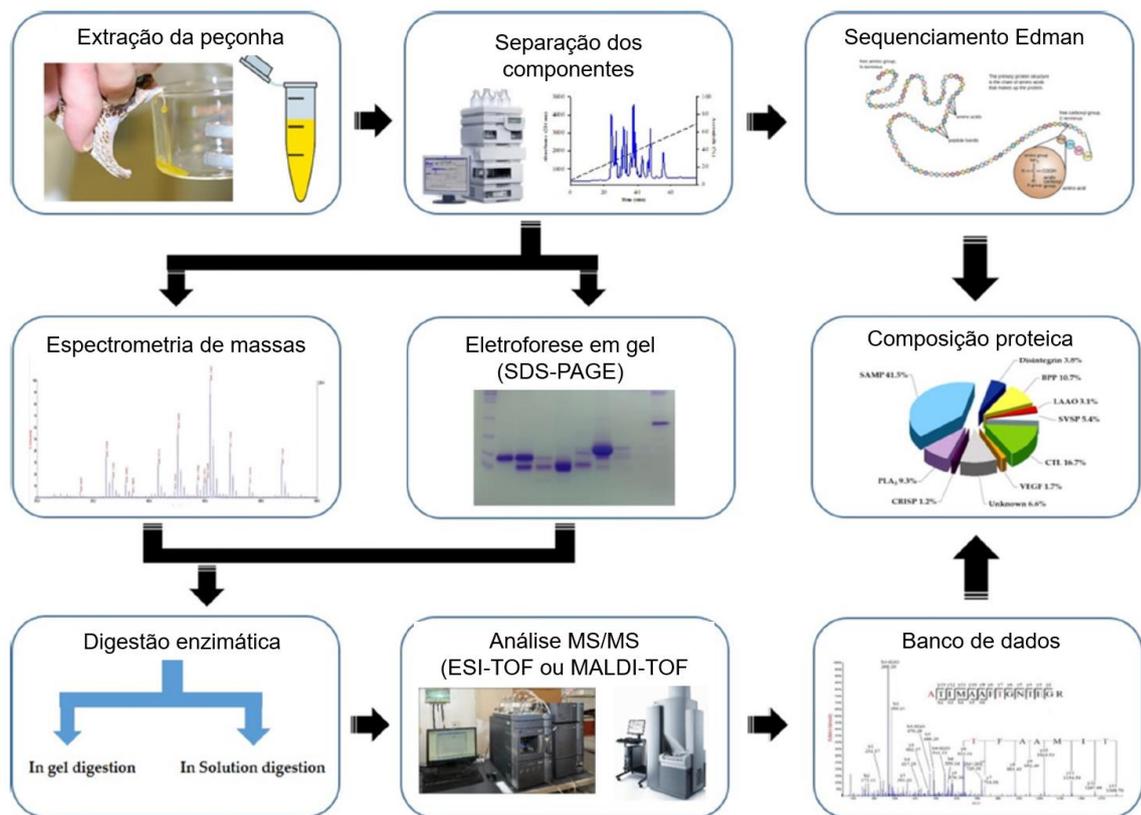


Figura 5. Esquema representando a estratégia venômica desenvolvida por Calvete em 2007. O veneno total é separado por RP-HPLC, as frações são caracterizadas por sequenciamento N-terminal, seguido de uma análise por SDS-PAGE e espectrometria de massas para a determinação das massas moleculares dos componentes. Fonte: Adaptado de El-Aziz *et al*, 2021.

Atualmente mais de 200 espécies de serpentes têm sido estudadas através de técnicas venômicas e esses números continuam a crescer (El-Aziz *et al*, 2021), porém esse número ainda é baixo se considerarmos as mais de 600 espécies medicamente relevante de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae (Calvete, 2013).

A caracterização do proteoma da peçonha de serpentes tem potenciais benefícios para a pesquisa básica, diagnóstico clínico, desenvolvimento de novas ferramentas e potencial para medicamentos de uso clínico. A disponibilidade de informações proteômicas das proteínas individuais torna possível a estimativa detalhada da similaridade e diferenciação dos proteomas das peçonhas de taxas diferentes, que são úteis em desvendar uma ampla gama de padrões evolucionários (Calvete, 2013).

A venômica pode também ter um impacto no tratamento de vítimas e na seleção de espécimes utilizados na fabricação de antivenenos (Calvete, 2011).

O único tratamento adequado para o envenenamento envolve a administração de um antiveneno que neutralize os efeitos letais das toxinas da peçonha. O aumento da eficácia de um antiveneno requer um grande entendimento dos mecanismos moleculares evolucionários que causam essa variação da peçonha. Com isso, um dos objetivos da pesquisa venômica é a caracterização da composição e as variações ontogenética, individual e geográfica das peçonhas (Alangode *et al*, 2020).

Pesquisas com peçonhas têm sido continuamente melhoradas pelo avanço tecnológico, em particular, o desenvolvimento de protocolos de preparação de amostras (nano-HPLC, HPLC *multidimensional* e eletrofórese 2D) acopladas a espectrometria de massas com ionização suave tem sido essencial para a desvendar a complexidade das peçonhas (Calvete, 2011).

1.6. Proteômica

O termo proteômica foi primeiramente utilizado por Marc Wilkins em 1996 para denotar proteínas como complemento do genoma (Aslam, 2016; Wilkins, 1996). A proteômica é o estudo de proteínas, proteoformas e multiproteoformas, incluindo a sua identificação, caracterização e quantificação numa variedade de contextos (Toby *et al*, 2016).

Devido à complexidade tipicamente apresentada em amostras proteicas e ampla gama de componentes relativamente diferentes, a separação prévia dos componentes é especialmente importante (Zhang *et al*, 2014).

Uma das técnicas mais utilizadas para a obtenção de uma análise de alta qualidade de uma mistura de proteínas é o SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletroforeses*). O procedimento envolve a desnaturação inicial das proteínas com um detergente aniônico que se liga a ela, dando a todas as proteínas uma carga negativa proporcional a sua massa molecular (Nowakowski *et al.*, 2014). Esse passo é seguido por eletroforese através de um gel, formado pela reação de acrilamida e bis-acrilamida, que resulta em uma matriz de gel altamente reticulada que separa as proteínas com base na sua massa molecular. Com as

proteínas desnaturadas e negativamente carregadas é possível separá-las com base no seu tamanho através da aplicação de carga e da migração dessas para o polo positivo (Figura 6) (Sambrook *et al*, 1989).

Essa técnica é amplamente utilizada desde que foi desenvolvida no início dos anos 70 e funciona bem em aplicações que não necessitam manter as características nativas ou funções das proteínas (Laemmli, 1970, Nowakowski *et al*, 2014).

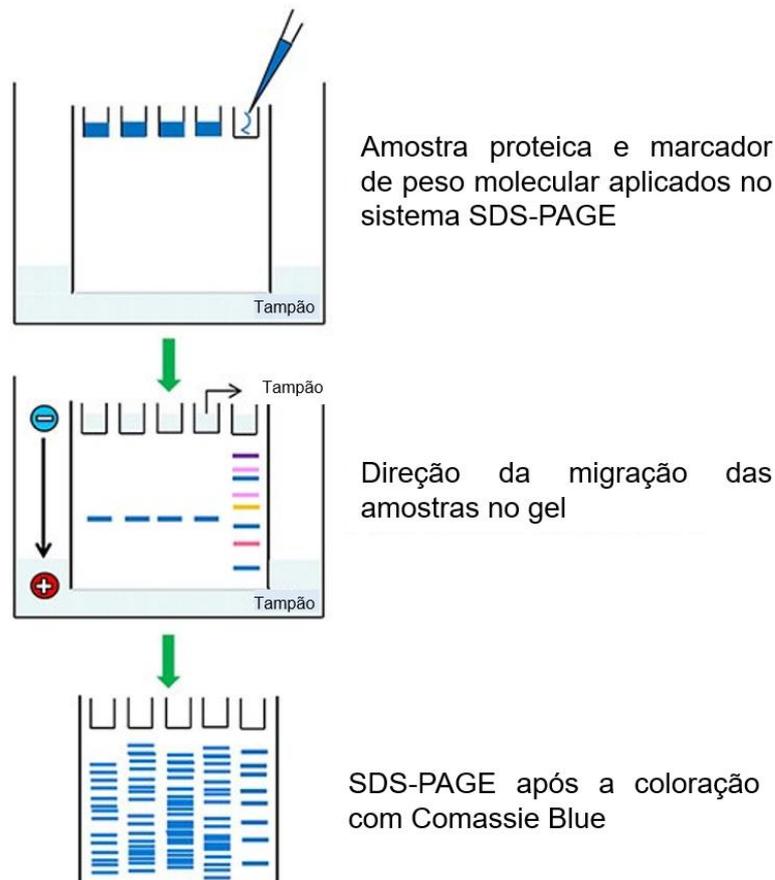


Figura 6. Ilustração demonstrando a técnica de eletroforese em SDS-PAGE. As amostras são aplicadas em um gel de poliacrilamida e migram do polo negativo para o polo positivo de acordo com seu peso molecular. Fonte: adaptado de www.biorad.com

Uma limitação da técnica de SDS-PAGE está na desnaturação das proteínas antes da eletroforese. Atividade enzimática, ligações proteicas, detecção de

cofatores, entre outros, geralmente não podem ser determinados em proteínas isoladas por SDS-PAGE. Com isso, outros métodos devem ser utilizados para separar proteínas nativas para investigação de estrutura-função (Wittig & Schagger, 2005).

A cromatografia é baseada no princípio onde as moléculas em uma mistura quando aplicadas a uma superfície ou uma fase estacionária sólida fluída são separadas uma das outras enquanto se movem com uma fase móvel. Fatores importantes nesse processo de separação estão relacionados a características moleculares como adsorção (líquido-sólido), partição (líquido-sólido), ou afinidade e diferenças em seus pesos moleculares (Coskum, 2016).

Devido a essas diferenças, alguns componentes da mistura permanecem mais tempo na fase estacionária e se movem mais lentamente no sistema cromatográfico, enquanto outros passam rapidamente pela fase móvel e deixam o sistema mais rapidamente (Porath, 1997).

A cromatografia por gel filtração, também conhecida como cromatografia por exclusão de tamanho (SEC, do inglês, *size exclusion chromatography*) é uma técnica que separa compostos baseados no seu tamanho. Com essa técnica não há interações físicas ou químicas entre a molécula da amostra e a fase estacionária (Hagel, 2011). Este método tem algumas propriedades importantes, que incluem estabilidade físico-química, simplicidade de operação e inércia, o que permite a separação de pequenas e grandes moléculas (Figura 7) (El-Aziz *et al*, 2021).

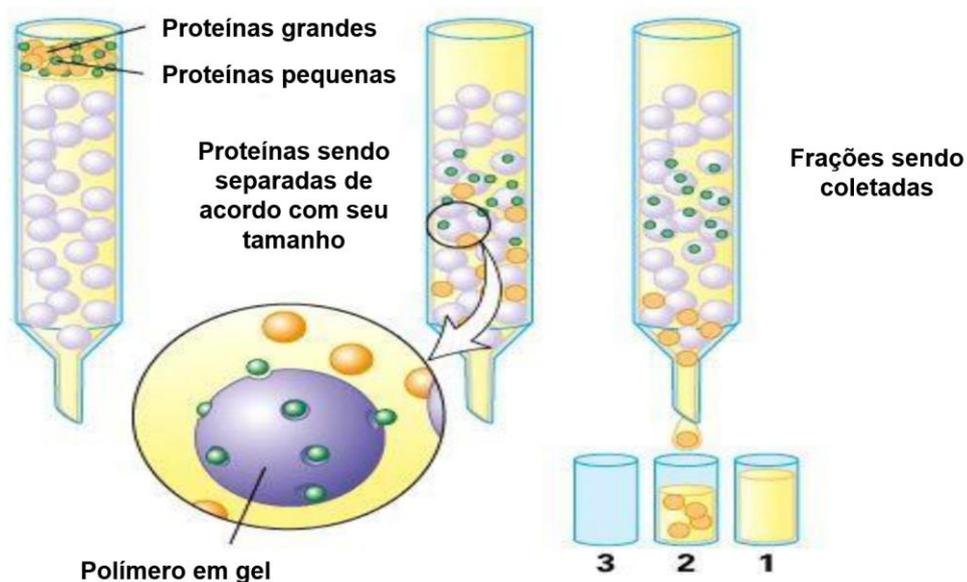


Figura 7. Ilustração de como ocorre a cromatografia por gel filtração. A matriz da coluna é um polímero reticulado com poros de tamanho selecionado. Proteínas maiores migram mais rápido do que as menores, porque são muito grandes para entrar nos poros dos grânulos e, portanto, seguem uma rota mais direta através da coluna. As proteínas menores entram nos poros e são retardadas por seu caminho mais labiríntico através da coluna. Fonte: Adaptado de Atala, 2020.

A técnica de cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa (RP-HPLC, do inglês, *reversed phase – high pressure liquid chromatography*) possui alta precisão, devido a isso é usualmente utilizada como um passo mais acurado durante o processo de purificação que é necessário para a separação de isoformas altamente relacionadas. O princípio da retenção da RP-HPLC é baseado na relação hidrofóbica da molécula que está dissolvida na fase móvel com os ligantes hidrofóbicos ligados a fase estacionária (Aguilar & Hearn, 1996).

1.6.1. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) surgiu com os primeiros estudos de eletromagnetismo, ganhando importância primeiramente na física, onde era utilizada para determinar a existência de isótopos e o peso atômico dos elementos (Zhang *et al*, 2016). Com o passar do tempo e o avanço da tecnologia, a espectrometria de massas se tornou a mais popular e importante técnica para a identificação, caracterização e quantificação de proteínas com um amplo rendimento e em larga escala (Zhang *et al*, 2014).

Em geral, a caracterização de polipeptídeos por espectrometria de massas requer três passos: I - ionização, que permite a passagem do polipeptídeo da fase líquida para a fase gasosa como uma partícula carregada que pode ser manipulada dentro do espectrômetro de massas; II - determinação de massa de polipeptídeos intactos por MS1; III - a aquisição de informação através da ativação da fragmentação de íons precursores ou por MS2 (Toby *et al*, 2016).

Espectrômetros modernos consistem em basicamente de três componentes: a fonte de íons, o analisador de massas, e o detector (Figura 8) (Zhang *et al*, 2016).

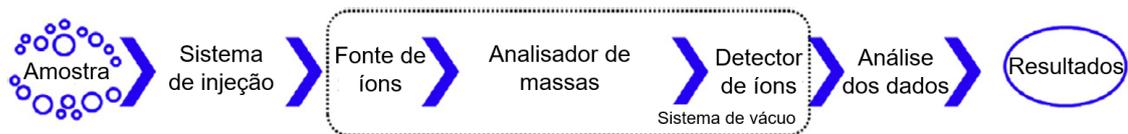


Figura 8. Esquema demonstrando uma análise por espectrometria de massas. Em destaque, os três principais componentes: fonte de íons, analisador de massas e detector de íons. A fonte de íons é dependente do sistema de injeção. Adaptado de Zhang *et al*, 2016.

A ionização por electrospray (ESI, do inglês, *electrospray ionization*) e ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês, *matrix assisted laser desorption/ionization*) são as duas técnicas mais utilizadas para volatilizar e ionizar as proteínas ou peptídeos para análise por espectrometria de massas. Em ESI, há a ionização dos analitos a partir de uma solução e por isso está acoplado a um sistema de separação líquido (como por exemplo, cromatografia ou eletroforese). Em MALDI, há a sublimação e ionização da amostra a partir de uma matrix cristalina e seca, através de pulsos de laser (Aebersold & Mann, 2003).

Baseado no método da caracterização a proteômica pode ser dividida em dois campos analíticos: a proteômica *bottom up* (BUP) e a proteômica *top down* (TDP).

1.6.2. Proteômica *bottom up*

A técnica de BUP, ou *shot gun*, foi desenvolvida para realizar análises rápidas, robustas, em larga escala e análises qualitativas e quantitativas da composição proteica de amostras complexas, com isso produzindo grandes listas de proteínas para as respectivas amostras (Gillet, 2015).

Em um típico experimento de BUP, a mistura de peptídeos é fracionada e submetida a análise LC-MS/MS. A identificação de peptídeos é adquirida através da comparação da massa em sequência dos espectros derivados da fragmentação dos peptídeos gerados a partir da digestão das proteínas com espectros teóricos gerados *in silico* a partir de um banco de dados de proteínas (Zhang *et al*, 2013). A inferência de proteínas é realizada por atribuição de sequências de peptídeos a proteínas. Os peptídeos podem ser atribuídos exclusivamente a uma única proteína ou compartilhado por mais de uma proteína (Zhang *et al*, 2013).

Nesse tipo de técnica, o objetivo é gerar um perfil global dos componentes proteicos em misturas complexas utilizando HPLC combinado com MS. A cromatografia líquida de fase reversa é a técnica cromatográfica mais utilizada devido a compatibilidade das fases móveis da RP- HPLC com a detecção do MS (Zhang *et al*, 2014).

Vários fatores podem influenciar o número de peptídeos/proteínas identificados na técnica de BUP, especialmente na venômica: 1 - o critério utilizado para misturar os venenos (número, gênero e idade dos espécimes selecionados, região geográfica onde os espécimes foram coletados, se o animal estava mantido em cativeiro ou vivendo no habitat natural) (Menezes *et al*, 2006); 2 - o uso eventual de métodos de fracionamento antes da análise por espectrometria de massas, baseado em propriedades físico-químicas dos componentes do veneno (Righetti *et al*, 2005); 3 - as especificações da nano cromatografia (diâmetro interno, comprimento, gradiente de eluição); 4 - as condições utilizadas no espectrômetro de massas (fonte de ionização, modo de fragmentação, tipo de análise); 5 - parâmetros, *databases* e softwares utilizados por busca em banco de dados e filtragem de dados (Nicolau *et al*, 2016)

Com isso, devem ser considerados, além dos números brutos, a qualidade dos dados, a diversidade de classes de proteínas identificadas, assim como a confiabilidade da identificação das proteínas menos abundantes (Knudsen & Chalkey, 2011).

Em um experimento típico de BUP, não é possível a garantia de 100% de cobertura de sequência. Por isso, é provável que os peptídeos identificados sejam compartilhados por mais de uma entrada de proteína, levando a números maiores considerando o número de proteínas identificadas (Nicolau *et al*, 2016). Isso é especialmente verdade em proteínas de peçonha de serpente, uma vez que é estimado que para uma amostra de veneno proteica ser inequivocamente identificada como proteína específica é necessário uma alta cobertura da proteína (<85%) (Knudsen & Chalkey, 2011)

1.6.3. Proteômica *top-down*

Quando a técnica de BUP é utilizada, a maior parte dos pontos de PTM pode ser perdida devido a cobertura incompleta da sequência, especialmente em misturas complexas e a coexistência de múltiplas PTM na mesma proteína é virtualmente impossível de ser localizada. Na TDP, que começa com a proteína intacta, há a possibilidade de identificação de padrões de combinação de modificações distribuídos ao longo da proteína, assim como pequenas mudanças na sequência primária da proteína e processamentos proteolíticos que podem ser não identificados na análise por BUP (Figura 9) (Zhang *et al*, 2014).

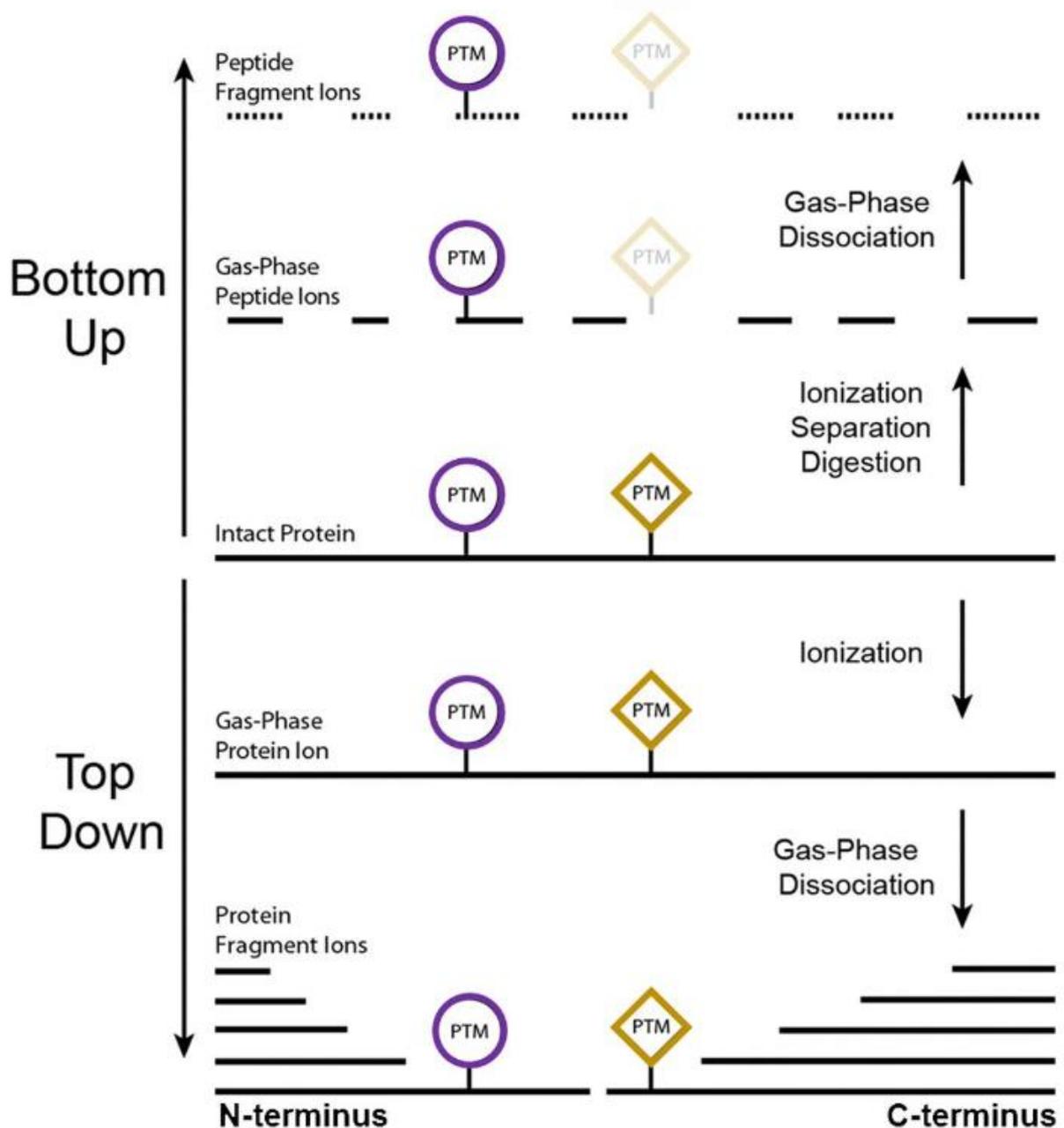


Figura 9: Comparação entre a BUP e TDP. Na BUP temos a digestão das proteínas em peptídeos e então a sua identificação. Na TDP as proteínas são diretamente ionizadas e analisadas.

As metodologias de TDP estão em desenvolvimento desde o advento dos métodos de ionizações suaves para MS ao final dos anos 1980 e podem ser aplicadas tanto para proteômica *top down* nativa (nTDP) quanto para proteômica *top down* desnaturante (dTDP) (Melani *et al*, 2017).

Na TDP, espectrômetros de alta resolução de massa relativa (>50K), alta acurácia de massa (<3 ppm) e alta velocidade de *scan* (>5 Hz) são necessários para o estado de medida do íon produzido a partir da espectrometria de massas (Toby *et al*, 2016). Com isso, espectrômetros de massa baseados em tempo de voo (TOF – *Time of flight*), *Fourier transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR) e *Fourier transform orbital trapping* (FT-Orbitrap), particularmente em uma forma híbrida são geralmente utilizados. A técnica de fragmentação é outra técnica chave para clivar proteínas e localizar sítios de modificações. Em geral, *beam-type collision-induced dissociation* (CID) ou *collisionally activated dissociation* (CAD) e *high-energy collision dissociation* (HCD) produzindo íons tipo b e y são os métodos mais comuns em experimentos de TDP (Ghezellou *et al*, 2019).

A TDP vem sendo aplicada nos últimos anos a diferentes tipos de veneno e mesmo com algumas limitações na área de fracionamento de proteínas, espectrometria de massas e análise de dados. Futuros avanços tornarão a TDP mais acessível e automatizada, ajudando a difundir a técnica na área da venômica (Melani *et al*, 2017).

Considerando o grande potencial das moléculas encontradas em peçonhas do gênero *Bothrops*, a ocorrência da espécie *B. pubescens* exclusivamente no Bioma Pampa e a falta de informações sobre a sua peçonha, esse estudo visou elucidar a composição da peçonha de *B. pubescens* através de técnicas de BUP e TDP para uma completa caracterização do veneno. Com essa caracterização é possível um melhor entendimento da ação do veneno, bem como uma adequação ao soro antibotrópico.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a peçonha de *B. pubescens* através de diferentes técnicas proteômicas e estudar o seu efeito toxinológico.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a peçonha de *B. pubescens* através de técnicas de proteômica *bottom up*.
- Caracterizar a peçonha de *B. pubescens* através de técnicas de proteômica *top down*.
- Analisar a peçonha de *B. pubescens* através de técnicas de proteômica *top down* nativa.
- Analisar o efeito toxinológico da peçonha de *B. pubescens* através de ensaio eletromiográficos em *biventer cervicis* de pintainho.

CAPÍTULO 1: ANÁLISE VENÔMICA DA PEÇONHA DE *Bothrops pubescens*

O artigo intitulado “*Venom characterization of the Brazilian Pampa snake Bothrops pubescens by top down and bottom-up proteomics.*” está no prelo para publicação no periódico *Toxicon*.

Neste artigo analisamos a peçonha de *Bothrops pubescens*, e demonstramos que está é uma peçonha clássica do gênero *Bothrops*, apresentando as principais famílias encontradas nessas peçonhas, mas também tendo suas peculiaridades. Com a técnica de BUP, foi possível a identificação de 89 grupos proteicos, pertencendo a 13 famílias de toxinas. Com a técnica de TDP identificamos 40 proteoformas únicas, pertencentes a 6 famílias de toxinas. Além disso, identificamos um complexo multi-proteofórmico de uma LAAO com nTDP.

Este é o primeiro estudo onde a peçonha de uma serpente do gênero *Bothrops* foi analisada através de técnicas de TDP.

Journal Pre-proof

Venom characterization of the Brazilian Pampa snake *Bothrops pubescens* by top-down and bottom-up proteomics

Darlene Lopes Rangel, Rafael D. Melani, Evelise Leis Carvalho, Juliano Tomazzoni Boldo, Tiago Gomes dos Santos, Neil L. Kelleher, Paulo Marcos Pinto



PII: S0041-0101(22)00288-4

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.106937>

Reference: TOXCON 106937

To appear in: *Toxicon*

Received Date: 17 August 2022

Revised Date: 29 September 2022

Accepted Date: 29 September 2022

Please cite this article as: Rangel, D.L., Melani, R.D., Carvalho, E.L., Boldo, J.T., Gomes dos Santos, T., Kelleher, N.L., Pinto, P.M., Venom characterization of the Brazilian Pampa snake *Bothrops pubescens* by top-down and bottom-up proteomics, *Toxicon* (2022), doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.106937>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

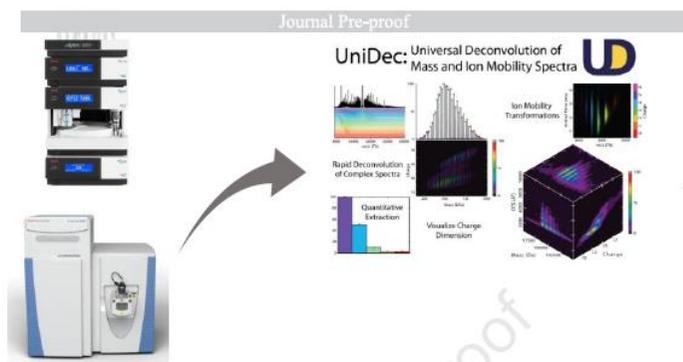
© 2022 Published by Elsevier Ltd.

Credit author statement

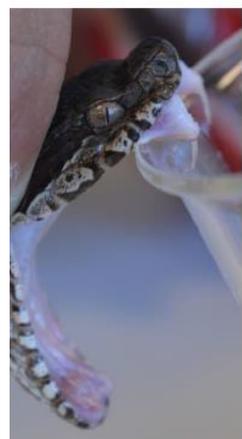
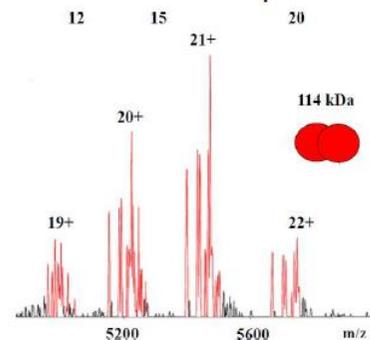
DLR, RDM, ELC and PMP conceived and designed the experiments. DLR, RDM, ELC and TGS performed the experiments. DLR, RDM, ELC, JTB, NLK and PMP analyzed the proteomics data. DLR, RDM, ELC and PMP analyzed the results and wrote the original draft manuscript. All authors participated in the writing, review, and editing of the final manuscript.

Journal Pre-proof

Native top-down



Protein complexes



Bothrops pubescens venom

Top-down



TDPportal

Toxin proteoforms

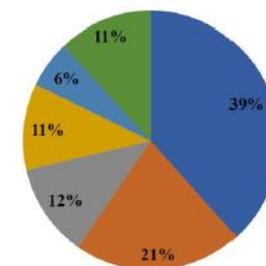
Protein	Protein Family	Accession #	Charge	Mass	Retention Time	Identification
Lactoferrin	LACTO	Q9U1Q4	12+	1.14e6	1.17e30	1.17e30
Lysozyme	LYSO	Q9U1Q4	12+	1.14e6	1.17e30	1.17e30
Lysozyme C	LYSO	Q9U1Q4	12+	1.14e6	1.17e30	1.17e30
...

Bottom-up



ProLuCID Search Engine

Toxin families



1 **Short Communication**

2 **Venom Characterization of the Brazilian Pampa Snake *Bothrops pubescens* by Top-**
3 **Down and Bottom-Up Proteomics**

4 Darlene Lopes Rangel^{1,2§}, Rafael D. Melani^{3§}, Evelise Leis Carvalho^{1,2}, Juliano Tomazzoni
5 Boldo², Tiago Gomes dos Santos⁴, Neil L. Kelleher³ & Paulo Marcos Pinto^{1,2*}

6

7 ¹Applied Proteomics Laboratory, Federal University of Pampa, São Gabriel, Brazil.

8 ²Pos Graduation in Biological Sciences, Federal University of Pampa, São Gabriel, Brazil.

9 ³Departments of Molecular Biosciences, Chemistry, and the Feinberg School of Medicine,
10 Northwestern University, Evanston, Illinois 60208, United States.

11 ⁴Pampa Biodiversity Studies Laboratory (LEBIP), Federal University of Pampa, São Gabriel,
12 Brazil.

13

14 [§] equal contribution

15 * to whom correspondence should be addressed:

16 Paulo Marcos Pinto

17 paulopinto@unipampa.edu.br

18

19 **ABSTRACT**

20 The envenomation from the *Bothrops* genus is characterized by systemic and local
21 effects caused by the main toxin families in the venom. In *Bothrops pubescens* venom we
22 were able to identify 89 protein groups belonging to 13 toxin families with the bottom-up
23 proteomics approach and 40 unique proteoforms belonging to 6 toxin families with the top-
24 down proteomics approach. We also identified multi-proteoform complexes of dimeric L-amino
25 acid oxidase using native top-down mass spectrometry.

26

27 **Keywords:** Venomics; *Bothrops*; Envenomation; L-amino acid oxidase

28

29 **MAIN**

30 The pit viper genus *Bothrops* is responsible for ~90% of snakebite envenoming in
31 Brazil. The envenomation by *Bothrops* genus is generally characterized by local (hemorrhage,
32 necrosis, vessel damage, and edema) and systemic effects (renal failure and coagulopathies)
33 ^[1,2]. These effects are caused by the main toxin families found in the venom, such as snake
34 venom metalloproteinase (SVMP), snake venom serine protease (SVSP), and phospholipase
35 A₂ (PLA2). SVMPs have fibrin(ogen)olytic activity, prothrombin activator action and are
36 responsible for proteolytic degradation of the capillary basement membrane ^[3]. SVSPs are
37 responsible for the cleavage of proteins involved in the clotting system and homeostasis
38 leading to activation/inhibition of proteins involved in the coagulation system and homeostasis.
39 ^[4]. Additionally, PLA2 is accountable for neurotoxicity, myotoxicity, cardiotoxicity, and platelet
40 aggregation/inhibition ^[5]

41 Using snake venomomics ^[6] and other proteomics-based methods many *Bothrops* species
42 have had their venom characterized in the past decade ^[7-16]. These studies are essential for
43 understanding the envenomation process, discovering potential
44 pharmaceutical/biotechnological products ^[17], and supporting phylogeny studies ^[17,18].
45 *Bothrops pubescens* is a venomous snake endemic to the Pampa biome in south Brazil ^[19].
46 Although there are few phylogenetic studies about *B. pubescens* ^[19], the species is neglected
47 regarding its venom composition. In this study, we present for the first time the venom
48 composition of *B. pubescens* that was analyzed by top-down proteomics (TDP), native top-
49 down mass spectrometry, and bottom-up proteomics (BUP).

50 *B. pubescens* venom was milked from 5 different adult specimens (2 males and 3
51 females) collected in the State of Rio Grande do Sul - Brazil. After extraction, the venom was
52 pooled, lyophilized, and kept at -80°C until further use. For the size exclusion chromatography
53 (SEC), crude venom (500 µg) was diluted in 100 mM ammonium acetate and fractionated on
54 a Yarra 3 µm SEC-3000 LC column 300 x 4.6 mm (Phenomenex) using an Agilent 1100 Series
55 liquid chromatography system at a flow rate of 0.2 mL/min. Protein separation was monitored
56 at 280 nm using Agilent OpenLab software. The fractions were subjected to SDS-PAGE,
57 according to Laemmli^[20], and the gel was silver stained.

58 All the proteomics analysis was conducted as described in Melani *et al.* ^[21]. In brief, for
59 BUP, 300 µg of *B. pubescens* crude venom was resuspended in 7 M urea, 2 M thiourea, and
60 reduced using 30 mM DTT for one hour at 37°C. Cysteine residues were carboxamide
61 methylated with 30 mM iodoacetamide for 1 h in the dark at room temperature. The sample
62 was diluted to 1 M urea with Tris 100 mM pH 8.2. MS grade trypsin (Promega) was added
63 (1:25, protease:substrate), and the sample was incubated overnight at 37°C. Peptides were
64 fractionated using an Ultimate 3000 nanoLC (Thermo Fisher Scientific) system on an in-house

65 packed 2 cm x 150 μm i.d. trap-column, and 25 cm x 75 μm i.d. column (Jupiter C18, 3 μm
66 particle size, 300 \AA pore size, Phenomenex) coupled to a Q-Exactive HF (Thermo Fisher
67 Scientific). Chromatography was performed at 300 nL/min. flow rate with 95% water, 5% ACN,
68 and 0.2% formic acid (FA) as mobile phase A and 95% ACN, 5% water, and 0.2% FA as phase
69 B on a 120 min. gradient (5% B for 8 min., 5–10% B over 4 min., followed by 10–45% B over
70 88 min., 45%–94% B over 4 min., 95% for 4 min., 90–5% B for 2 min., and 5% for 10 min.).
71 Mass spectra were acquired by Xcalibur software operating in data-dependent acquisition
72 mode, switching between full scan MS1 (60,000 resolution, 50 ms maximum injection time,
73 AGC 3e^5 charges, spectrum range from 300 to 1,800 m/z) and MS2 (30,000 resolution, 100
74 ms maximum injection time, AGC 1e^5 charges, spectrum range from 200 to 2,000 m/z). MS2
75 spectra were obtained by high-energy collision dissociation (HCD) fragmentation using 28%
76 normalized collision energy. The peptides were analyzed in three technical replicates. Peptide
77 search was performed using ProLuCID v1.3 search engine against sequences in the Serpente
78 database, downloaded from UniprotKB on February 15, 2021. Carboxamidomethylation of
79 cysteines and oxidation of methionine was set as fixed and variable modifications,
80 respectively. Resultant peptides were processed and evaluated by Search Engine Processor
81 (SEPro)^[22] with the following parameters: 10 ppm deviation from theoretical peptide precursor,
82 peptides longer than six amino acid residues, and a 1% estimated protein-level false discovery
83 rate (FDR). Label-free protein quantitation was performed according to the normalized spectral
84 abundance factor (NSAF).

85 For the TDP approach, the pooled venom was resuspended in mobile phase A and
86 then directly analyzed by LC-MS/MS. NanoRPLC analysis was performed using an Ultimate
87 3000 nanoLC (Thermo Fisher Scientific) system on an in-house packed polymeric reverse
88 phase resin (PLRP-S, 5 μm particle size, 1,000 \AA pore size, Agilent Technologies) for the trap-
89 column (2 cm x 150 μm i.d.) and analytical column (20 cm x 75 μm i.d.). The sample was
90 analyzed using a 120 min. gradient (5% B for 10 min., 5–15% B over 2 min., followed by 15–
91 50% B over 88 min., 50%–95% B over 2 min., 95% for 5 min., followed by 90–5% B over 3
92 min., and 5% for 10 min.). Mass spectra were acquired by Xcalibur. MS1 spectra were
93 acquired at 120,000 resolving power (AGC 1e^5 charges, 50 ms maximum injection time,
94 spectrum range 400 – 2,000 m/z) using 4 μscans . Data-dependent MS2 were acquired at
95 60,000 resolving power (AGC 1e^5 charges, maximum injection time 800 ms, spectrum range
96 200–2,000 m/z) using 4 μscans on a Q Exactive HF. MS2 spectra were obtained by HCD
97 fragmentation using an isolation window of 4 m/z and 21%, 22%, and 25% stepped normalized
98 collision energy. The raw data was searched using TDPortal against the Serpente database
99 downloaded from UniProtKB on March 8, 2020, using 2.2 Da precursor window tolerance, 10
100 ppm fragment tolerance, and 1% FDR.

101 For the native top-down characterization, the fractions from SEC were individually
102 analyzed into a Q-Exactive UHMR (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer using a
103 Nanospray Flex Ion Source (Thermo Fisher Scientific), spray voltages between 1,500 to 2,000
104 V, and the ion transfer tube was set to 310° C. The mass spectrometer was run in positive
105 mode, data collected from 700-15,000 *m/z* with 20 μ scans, resolution of 17,500 (at 200 *m/z*),
106 and a target AGC of $1e^5$ charges. The S-lens RF level was set to 200% and extended trapping
107 set to 100V. MS2 spectra were obtained by HCD fragmentation using 21% normalized collision
108 energy. Raw spectra from each experiment were summed across scans, and mass
109 deconvolution was performed using UniDec^[21]. All data are available via ProteomeXchange
110 with identifier PXD027650.

111 We were able to identify 89 proteins (Supplementary Table 1) by BUP that were
112 assigned to 13 toxin families. We estimated the relative abundance of the venom composition
113 using label-free quantification, and SVMP was the most abundant toxin family corresponding
114 to 39% of the total (Figure 1A). The venom composition of *B. pubescens* showed to be similar
115 to other *Bothrops* species, presenting around 80-100 proteins belonging to characteristic toxin
116 families (Figure 1B) ^[10,11,23,24]. When comparing the amount of L-amino acid oxidase (LAAO)
117 among different *Bothrops* venoms, *B. pubescens* (21%) has a slightly higher level than *B.*
118 *moojeni* (17.7%), and superior amounts than venoms from *B. asper* (9.2%), *B. jararaca* (7.9%),
119 and *B. diporus* (7.4%). This could indicate that *B. pubescens* has a stronger myonecrotic,
120 edema-forming, hemorrhage-promoting, platelet-aggregating and/or -inhibiting effect than
121 other *Bothrops* venoms^[25,26]. Furthermore, *B. pubescens* venom showed a lower content of
122 SVSP (6%) compared to *B. moojeni* (19.6%), *B. asper* (18.2%), and *B. jararaca* (26.65%).
123 Such a low amount is comparable to *B. diporus* (7.2%), which belongs to a phylogenetic sister
124 group of *B. pubescens* ^[19].

125 With the TDP approach, we identified 40 proteoforms belonging to 6 toxin families
126 (Supplementary Table 2). From the total, 12 proteoforms mapped to SVMP protein family, 13
127 to PLA2, 7 to bradykinin potentiating peptide (BPP), 6 to LAAO, 1 to SVSP, and 1 to SVSP
128 inhibitor. All proteoforms and the SVSP inhibitor family were only identified by TDP, even
129 without performing multiple fractionation steps before LC-MS/MS and not having genomic data
130 on *B. pubescens*. Further, we were able to identify 5 alpha-amino acetylated residues at the
131 N-terminus of SVSPs, SVMPs, PLA2, and SVSP inhibitor families. TDP applied to snake
132 venoms is a growing field that allows the analysis and characterization of intact toxin
133 proteoforms compared to identifying peptides by BUP ^[27]. However, few snake venoms have
134 been characterized by this technique ^[28-36], and the method still has limitations in identifying
135 proteins larger than 30 kDa. In summary, TDP we were able to locate PTMs, identify unique

136 proteoforms and a toxin family not identified by de BUP approach. This indicates the potential
137 of the technique since a lot of information is lost in the BUP approach.

138 On the other hand, native top-down analysis maintains the non-covalent associations
139 of protein complexes, while this information is inferred in BUP and denaturing TDP [32]. For
140 native TDP, we collected 13 fractions using SEC (Figure 2A), and they were submitted to SDS-
141 PAGE (Figure 2B) to check their molecular composition. In fraction 5, we observed a cluster
142 of peaks in the charge states 19-22+ (Figure 2C), which presented intact masses from 113.3
143 to 115.5 kDa after deconvolution (Figure 2D). Subsequently, a whole charge state was
144 fragmented using HCD, and an amino acid sequence was partially obtained. The sequence
145 tag "PYQFQHFSEALTA" was identified by BLASTP against the protein sequences
146 characterized in the BUP approach as LAAO with 100% sequence identity to B5AR80,
147 Q6TGQ9, P0CC17, and P56742. The observed intact masses correspond to multi-proteoform
148 complexes (MPC) of two monomers of LAAO, a protein complex known to occur in snake
149 venom [10,11,16,23,24].

150 In summary, this work shows the first characterization of the *B. pubescens* venom, a
151 neglected species from the southern cone, using multiple proteomics approaches. BUP and
152 TDP combined were able to identify 14 toxin families and demonstrate that *B. pubescens*
153 venom is a classical *Bothrops* venom, although it presents some peculiarities. Combining
154 complementary BUP and TDP approaches allowed us to understand the *B. pubescens* venom
155 composition, including toxin families, toxin proteoforms, and posttranslational modifications
156 [20]. Also, with the application of native top-down mass spectrometry, we have a better view of
157 the isoforms we have in the venom composition [29]. Furthermore, TDP was used to analyze a
158 bothropic venom for the first time.

159

160 Associated Data (for reviewers only)

161 Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD027650.

162 Username: reviewer_pxd027650@ebi.ac.uk

163 Password: CxtXYyFe

164

165 Conflicts of interest

166 The authors declare that there are no conflicts of interest.

167

168 **Acknowledgments**

169 This work was supported by the National Council for Scientific and Technological
170 Development (CNPq-Brazil), the Coordination for the Improvement of Higher Education
171 Personnel (CAPES-Brazil), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande
172 do Sul (FAPERGS-Brazil), the National Institute of Health in a visiting scholar program
173 supported by a grant from the National Institute of General Medical Sciences P41 GM108569
174 (N.L.K.), and the NIH Office of Director award S10 OD025194. D.L.R. received a research
175 fellowship from CAPES-Brazil, and E.L.C. received a research fellowship from FAPERGS-
176 Brazil. This is for Alice.

177 **References**

178

- 179 [1] Mamede, C. C. N., de Sousa Simamoto, B. B., da Cunha Pereira, D. F., de Oliveira Costa,
180 J., Ribeiro, M. S. M., & de Oliveira, F. (2020). Edema, hyperalgesia and myonecrosis
181 induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. *Toxicon*, *187*, 10-
182 18. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.08.016
- 183 [2] Gutierrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., Lomonte, B., Angulo, Y., & Fox, J. W. (2010).
184 Tissue pathology induced by snake venoms: how to understand a complex pattern of
185 alterations from a systems biology perspective? *Toxicon*, *55*(1), 166-170. doi:
186 10.1016/j.toxicon.2009.08.006
- 187 [3] Markland, F. S., Jr., & Swenson, S. (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, *62*,
188 3-18. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.004
- 189 [4] Sajevec, T., Leonardi, A., & Krizaj, I. (2011). Haemostatically active proteins in snake
190 venoms. *Toxicon*, *57*(5), 627-645. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.01.006
- 191 [5] Hiu, J. J., & Yap, M. K. K. (2020). Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins:
192 phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. *Biochem Soc Trans*, *48*(2), 719-731. doi:
193 10.1042/BST20200110
- 194 [6] Calvete, J. J., Juarez, P., & Sanz, L. (2007). Snake venomomics. Strategy and applications. *J*
195 *Mass Spectrom*, *42*(11), 1405-1414. doi: 10.1002/jms.1242
- 196 [7] Nery, N. M., Luna, K. P., Fernandes, C. F., & Zuliani, J. P. (2016). An overview of Bothrops
197 erythromelas venom. *Rev Soc Bras Med Trop*, *49*(6), 680-686. doi: 10.1590/0037-
198 8682-0195-2016
- 199 [8] Jorge, R. J., Monteiro, H. S., Goncalves-Machado, L., Guarnieri, M. C., Ximenes, R. M.,
200 Borges-Nojosa, D. M., . . . Pla, D. (2015). Venomomics and antivenomics of Bothrops
201 erythromelas from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of
202 northeastern Brazil. *J Proteomics*, *114*, 93-114. doi: 10.1016/j.jprot.2014.11.011

- 203 [9] Mora-Obando, D., Guerrero-Vargas, J. A., Prieto-Sanchez, R., Beltran, J., Rucavado, A.,
204 Sasa, M., . . . Lomonte, B. (2014). Proteomic and functional profiling of the venom of
205 *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with
206 *Bothrops asper* venom. *J Proteomics*, *96*, 159-172. doi: 10.1016/j.jprot.2013.11.005
- 207 [10] Gay, C., Sanz, L., Calvete, J. J., & Pla, D. (2015). Snake Venomics and Antivenomics of
208 *Bothrops diporus*, a Medically Important Pitviper in Northeastern Argentina. *Toxins*
209 (*Basel*), *8*(1). doi: 10.3390/toxins8010009
- 210 [11] Amorim, F. G., Costa, T. R., Baiwir, D., De Pauw, E., Quinton, L., & Sampaio, S. V. (2018).
211 Proteoepitomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of *Bothrops*
212 *moojeni* Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. *Toxins*
213 (*Basel*), *10*(5). doi: 10.3390/toxins10050177
- 214 [12] Mora-Obando, D., Salazar-Valenzuela, D., Pla, D., Lomonte, B., Guerrero-Vargas, J. A.,
215 Ayerbe, S., . . . Calvete, J. J. (2020). Venom variation in *Bothrops asper* lineages from
216 North-Western South America. *J Proteomics*, *229*, 103945. doi:
217 10.1016/j.jprot.2020.103945
- 218 [13] Sanz, L., Quesada-Bernat, S., Perez, A., De Morais-Zani, K., Sant'Anna, S. S.,
219 Hatakeyama, D. M., . . . Caldeira, C. A. S. (2020). Danger in the Canopy. Comparative
220 Proteomics and Bioactivities of the Venoms of the South American Palm Pit Viper
221 *Bothrops bilineatus* Subspecies *bilineatus* and *smaragdinus* and Antivenomics of *B. b.*
222 *bilineatus* (Rondonia) Venom against the Brazilian Pentabothropic Antivenom. *J*
223 *Proteome Res*, *19*(8), 3518-3532. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00337
- 224 [14] Sanz, L., Perez, A., Quesada-Bernat, S., Diniz-Sousa, R., Calderon, L. A., Soares, A. M.,
225 . . . Caldeira, C. A. S. (2020). Venomics and antivenomics of the poorly studied Brazil's
226 lancehead, *Bothrops brazili* (Hoge, 1954), from the Brazilian State of Para. *J Venom*
227 *Anim Toxins Incl Trop Dis*, *26*, e20190103. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-
228 0103
- 229 [15] Goncalves-Machado, L., Pla, D., Sanz, L., Jorge, R. J. B., Leitao-De-Araujo, M., Alves,
230 M. L. M., . . . Calvete, J. J. (2016). Combined venomics, venom gland transcriptomics,
231 bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic
232 isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. *J Proteomics*, *135*, 73-89. doi:
233 10.1016/j.jprot.2015.04.029
- 234 [16] Ohler M, Georgieva D, Seifert J, Von Bergen M, Ami RK, Genov N, Betzel C. (2010). The
235 venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant
236 hemorrhagic and coagulopathic activities. *J Proteome Res*, *9*, 2422-37. doi:
237 10.1021/pr901128x

- 238 [17] Waheed, H., Moin, S. F., & Choudhary, M. I. (2017). Snake Venom: From Deadly Toxins
239 to Life-saving Therapeutics. *Curr Med Chem*, 24(17), 1874-1891. doi:
240 10.2174/0929867324666170605091546
- 241 [18] Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Gutierrez, J. M., & Leon, G. (2013).
242 Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and
243 immunochemical methods. *Biologicals*, 41(2), 93-97. doi:
244 10.1016/j.biologicals.2012.11.001
- 245 [19] Machado, T., Silva, V. X., & Silva, M. J. (2014). Phylogenetic relationships within Bothrops
246 neuwiedi group (Serpentes, Squamata): geographically highly-structured lineages,
247 evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. *Mol*
248 *Phylogenet Evol*, 71, 1-14. doi: 10.1016/j.ympev.2013.10.003
- 249 [20] Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of
250 Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 251 [21] Melani, R. D., Skinner, O. S., Fornelli, L., Domont, G. B., Compton, P. D., & Kelleher, N.
252 L. (2016). Mapping Proteoforms and Protein Complexes From King Cobra Venom
253 Using Both Denaturing and Native Top-down Proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 15(7),
254 2423-2434. doi: 10.1074/mcp.M115.056523
- 255 [22] Reid, D. J., Diesing, J. M., Miller, M. A., Perry, S. M., Wales, J. A., Montfort, W. R., &
256 Marty, M. T. (2018). MetaUniDec: High-Throughput Deconvolution of Native Mass
257 Spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 30(1), 118-127. doi:
258 10.1007/s13361-018-1951-9
- 259 [23] Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Diaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete,
260 J. J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic,
261 Individual and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research*, 7, 3556-3571.
262 doi: 10.1021/pr800332p
- 263 [24] Galizio, N. D. C., Serino-Silva, C., Stuginski, D. R., Abreu, P. A. E., Sant'Anna, S. S.,
264 Grego, K. F., . . . Morais-Zani, K. (2018). Compositional and functional investigation of
265 individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught
266 *Bothrops jararaca* snakes. *J Proteomics*, 186, 56-70. doi: 10.1016/j.jprot.2018.07.007
- 267 [25] Tan, K. K., Bay, B. H., & Gopalakrishnakone, P. (2018). L-amino acid oxidase from snake
268 venom and its anticancer potential. *Toxicon*, 144, 7-13. doi:
269 10.1016/j.toxicon.2018.01.015
- 270 [26] Ribeiro, P. H., Zuliani, J. P., Fernandes, C. F., Calderon, L. A., Stabeli, R. G., Nomizo, A.,
271 & Soares, A. M. (2016). Mechanism of the cytotoxic effect of L-amino acid oxidase
272 isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *Int J Biol Macromol*, 92, 329-337. doi:
273 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.022

- 274 [27] Melani, R. D., Nogueira, F. C. S., & Domont, G. B. (2017). It is time for top-down venomics.
275 *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23, 44. doi: 10.1186/s40409-017-0135-6
- 276 [28] Carvalho, P. C., Fischer, J. S., Xu, T., Cociorva, D., Balbuena, T. S., Valente, R. H., . . .
277 Barbosa, V. C. (2012). Search engine processor: Filtering and organizing peptide
278 spectrum matches. *Proteomics*, 12(7), 944-949. doi: 10.1002/pmic.201100529
- 279 [29] Gocmen, B., Heiss, P., Petras, D., Nalbantsoy, A., & Sussmuth, R. D. (2015). Mass
280 spectrometry guided venom profiling and bioactivity screening of the Anatolian
281 Meadow Viper, *Vipera anatolica*. *Toxicon*, 107(Pt B), 163-174. doi:
282 10.1016/j.toxicon.2015.09.013
- 283 [30] Petras, D., Heiss, P., Harrison, R. A., Sussmuth, R. D., & Calvete, J. J. (2016). Top-down
284 venomics of the East African green mamba, *Dendroaspis angusticeps*, and the black
285 mamba, *Dendroaspis polylepis*, highlight the complexity of their toxin arsenals. *J*
286 *Proteomics*, 146, 148-164. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.018
- 287 [31] Calderon-Celis, F., Diez-Fernandez, S., Costa-Fernandez, J. M., Encinar, J. R., Calvete,
288 J. J., & Sanz-Medel, A. (2016). Elemental Mass Spectrometry for Absolute Intact
289 Protein Quantification without Protein-Specific Standards: Application to Snake
290 Venomics. *Anal Chem*, 88(19), 9699-9706. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02585
- 291 [32] Zhou, M., Lantz, C., Brown, K. A., Ge, Y., Pasa-Tolic, L., Loo, J. A., & Lemyte, F. (2020).
292 Higher-order structural characterisation of native proteins and complexes by top-down
293 mass spectrometry. *Chem Sci*, 11(48), 12918-12936. doi: 10.1039/d0sc04392c
- 294 [33] Petras, D., Heiss, P., Sussmuth, R. D., & Calvete, J. J. (2015). Venom Proteomics of
295 Indonesian King Cobra, *Ophiophagus hannah*: Integrating Top-Down and Bottom-Up
296 Approaches. *J Proteome Res*, 14(6), 2539-2556. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00305
- 297 [34] Ainsworth, S., Petras, D., Engmark, M., Sussmuth, R. D., Whiteley, G., Albulescu, L. O.,
298 Calvete, J. J. (2018). The medical threat of mamba envenoming in sub-Saharan Africa
299 revealed by genus-wide analysis of venom composition, toxicity and antivenomics
300 profiling of available antivenoms. *J Proteomics*, 172, 173-189. doi:
301 10.1016/j.jprot.2017.08.016
- 302 [35] Kazandjian, T. D., Petras, D., Robinson, S. D., van Thiel, J., Greene, H. W., Arbuckle, K.,
303 Casewell, N. R. (2021). Convergent evolution of pain-inducing defensive venom
304 components in spitting cobras. *Science*, 371(6527), 386-390. doi:
305 10.1126/science.abb9303
- 306 [36] Calvete, J. J., Pla, D., Els, J., Carranza, S., Damm, M., Hempel, B. F., Encinar, J. R.
307 (2021). Combined Molecular and Elemental Mass Spectrometry Approaches for
308 Absolute Quantification of Proteomes: Application to the Venomics Characterization of
309 the Two Species of Desert Black Cobras, *Walterinnesia aegyptia* and *Walterinnesia*
310 *morgani*. *J Proteome Res*, 20(11), 5064-5078. doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00608

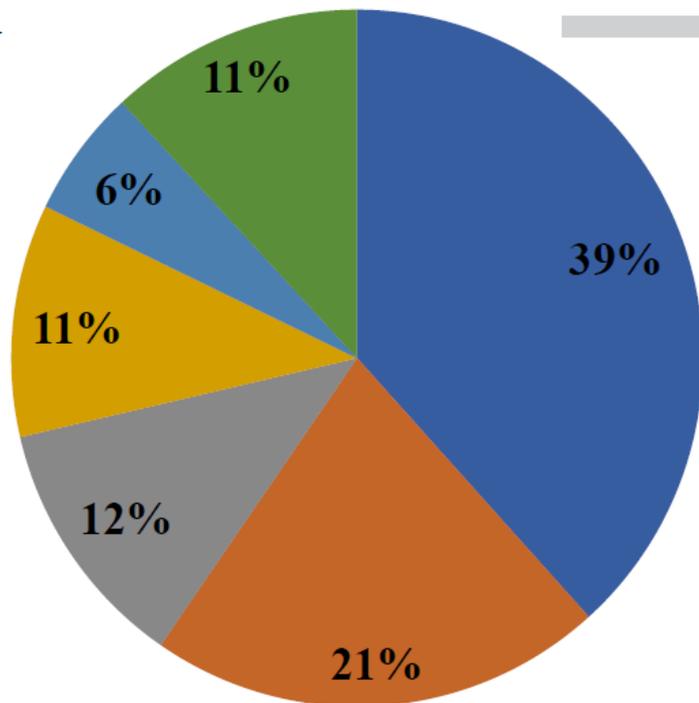
311

312 **Figure legends:**

313 **Figure 1. Relative protein composition of *B. pubescens* venom.** The venom was
314 analyzed by LC-MS/MS. Peptide search was performed on ProLuCID v1.3, and peptides were
315 filtered by Search Engine Processor (SEPro). (A) Relative protein composition (%) of *B.*
316 *pubescens* venom was estimated by label-free protein quantitation performed according to the
317 normalized spectral abundance factor (NSAF). (B) Comparison between *B. pubescens*, *B.*
318 *moojen*^[21], *B. asper*^[20], *B. jararaca*^[12], and *B. diporus*^[11] venom composition. SVMP - snake
319 venom metalloproteinase, LAAO - L-aminoacidic oxidase, CTL - C-type lectin, PLA₂ -
320 phospholipase A₂, SVSP - snake venom serine protease. Toxin families with less than 2% in
321 the venom (others) include VEGF – vascular endothelial growth factor, BPP - bradykinin
322 potentiating peptides, CRISP - cysteine-rich secretory protein, NGF - nerve growth factor, PDE
323 - phosphodiesterase, GPC - glutamine-cyclotransferase, PLB - phospholipase B, NT -
324 nucleotidases.

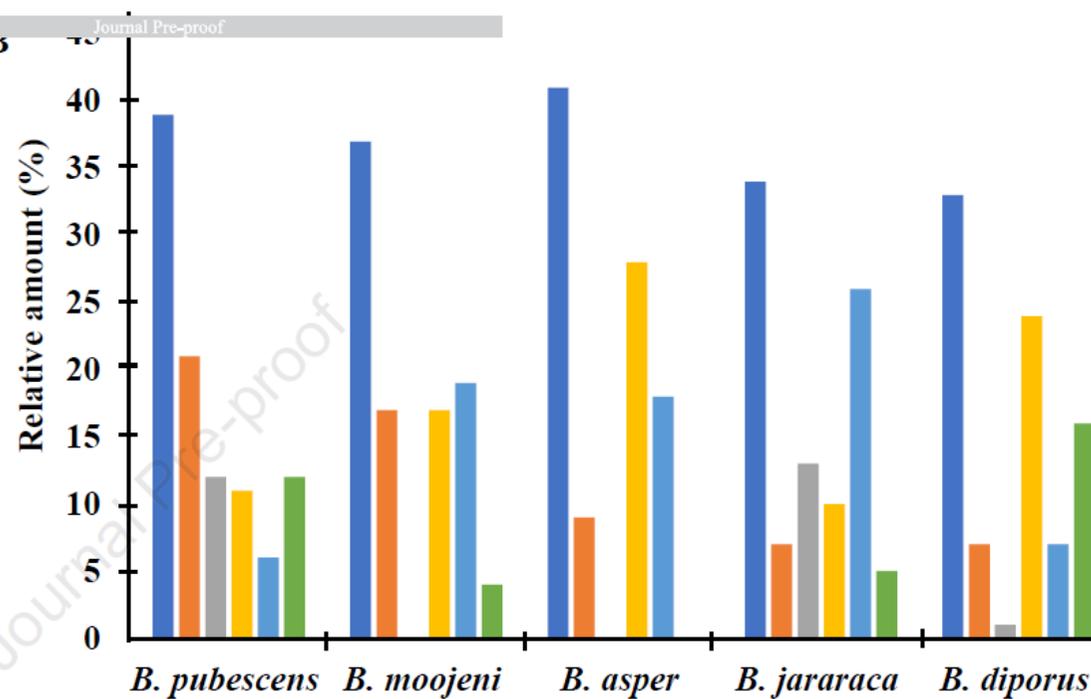
325 **Figure 2. Identification of dimeric L-amino acid oxidase (LAAO) in *B. pubescens***
326 **venom.** (A) Chromatogram trace at 280 nm of the venom proteins highlighting the 13 fractions
327 collected by size-exclusion chromatography (SEC). (B) Silver-stained SDS-PAGE analysis of
328 the 13 SEC fractions. (C) Spectrum obtained using native top-down proteomics showing in
329 red the charge state distribution of different LAAO multiproteoform complexes (MPC). (D)
330 Deconvoluted MS1 spectrum and the intact mass of 8 different LAAO MPCs (a-h). The red
331 squares indicate the fraction containing LAAO, and the red circle the LAAO bands region in
332 the SDS-PAGE gel.

A

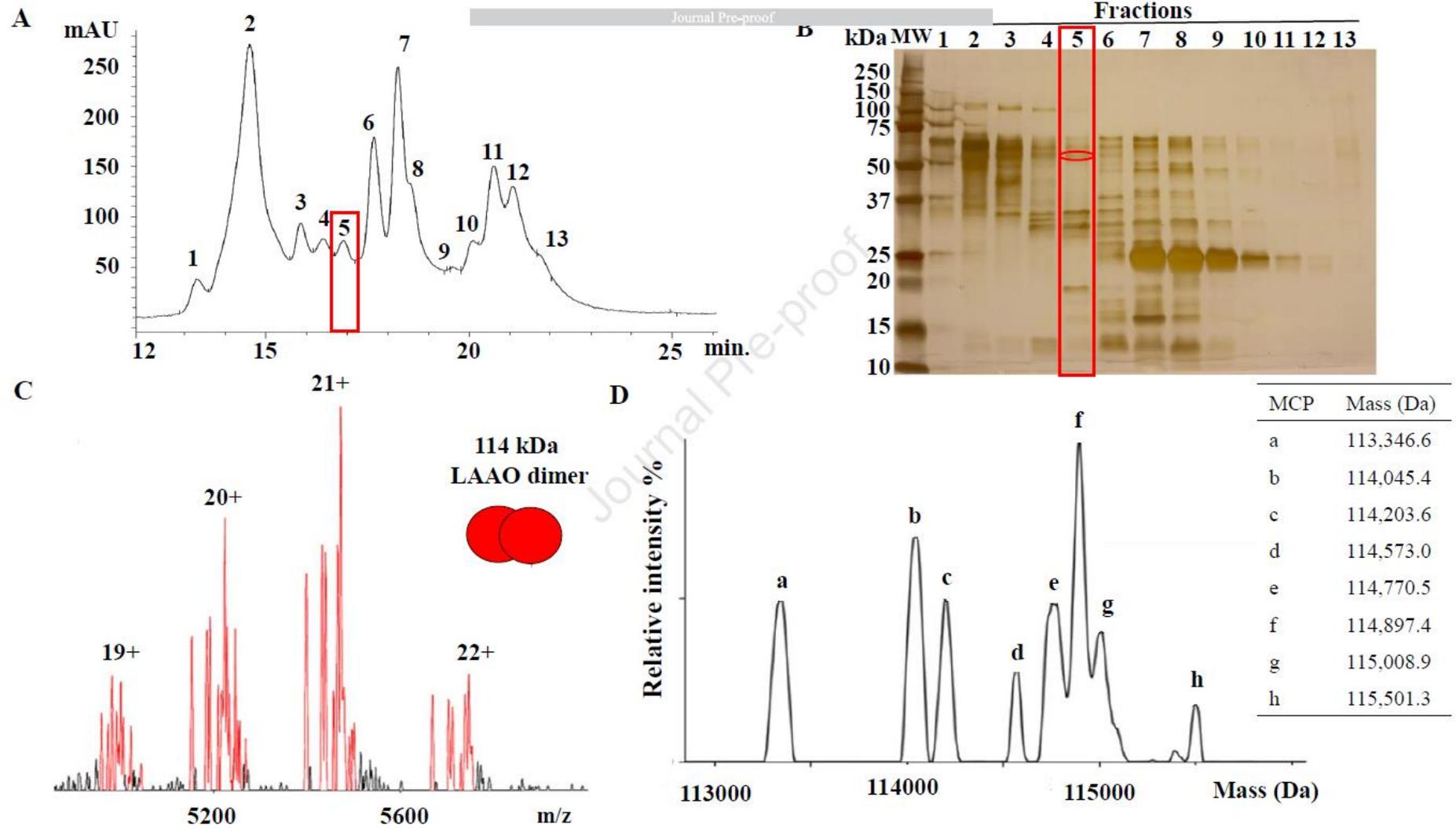


- SVMP
- LAAO
- CTL
- PLA2
- SVSP
- Others

B



- SVMP
- LAAO
- CTL
- PLA2
- SVSP
- Others



Highlights

- *Bothrops pubescens* is a venomous snake endemic of Pampa Biome in south Brazil.
- *B. pubescens* venom has 14 different toxins families.
- *B. pubescens* venom has 89 different proteins identified by bottom-up proteomics.
- We were able to identify 40 proteoforms in *B. pubescens* venom with the Top-Down proteomics approach.
- *B. pubescens* venom is a classical *Bothrops* venom.

Journal Pre-proof

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Journal Pre-proof

Ethical Statement

Paulo Marcos Pinto (corresponding author), consciously assure that for the manuscript entitled "Venom Characterization of the Brazilian Pampa Snake *Bothrops pubescens* by Top-Down and Bottom-Up Proteomics", the following is fulfilled:

- 1) This material has not been published in whole or in part elsewhere;
- 2) The manuscript is not currently being considered for publication in another journal;
- 3) All authors have been personally and actively involved in substantive work leading to the manuscript and will hold themselves jointly and individually responsible for its content.

Date: 16 August 2022.

CAPÍTULO 2: ANÁLISES INICIAIS E TOXINOLÓGICAS

Neste capítulo serão apresentados os testes proteômicos iniciais e a análise toxicológica da peçonha de *B. pubescens*.

1. Introdução

A peçonha de espécies do gênero *Bothrops* é composto por cerca de 12 famílias diferentes de proteínas e causam efeitos como dor, hemorragia, edema e mionecrose (Mamede *et al*, 2020).

Zamuner e colaboradores (2004) demonstraram atividade neurotóxica no veneno de *B. neuweidi*, apresentando que o veneno causou enfraquecimento do músculo do pescoço, perda de equilíbrio e falha respiratória em ensaios *in vivo* com pintainhos. Em ensaios *in vitro*, utilizando preparações de músculo *biventer cervicis* de pintainho, também foi demonstrada a ação miotóxica do veneno de diversas espécies do gênero *Bothrops* (Harvey *et al*, 1993; Lôbo de Araújo *et al*, 2002; Borja-Oliveira *et al*, 2003; Zamuner *et al*, 2004; Cavalvante *et al*, 2011; Fernandes *et al*, 2014)

Com isso, analisamos a ação da peçonha de *B. pubescens* em músculo *biventer cervicis* de pintainho e também o perfil eletroforético apresentado pela peçonha.

2. Material e métodos

2.1. Amostras de peçonha

A peçonha de cinco espécimes de *B. pubescens* (2 machos e 3 fêmeas) foi extraído através do massageamento da glândula de veneno e aplicação de pressão das presas contra um béquer e coletado com auxílio de uma pipeta (Figura 10). As peçonhas extraídas foram misturadas, liofilizadas e posteriormente armazenadas em ultrafreezer (- 80° C) até o uso.



Figura 10: Extração manual da peçonha de *B. pubescens*. Na imagem podemos observar a realização da massagem nas glândulas de peçonha e a pressão contrária exercida pelo béquer nas presas para a saída da peçonha. (Fonte: Do autor).

2.2. Manutenção de *Gallus gallus domesticus*.

Para a preparação do músculo *biventer cervicis* foram utilizados 4 pintainhos (*G. gallus domesticus*) por concentração de peçonha com idades entre 3 – 8 dias, de ambos os sexos, adquiridos através da Agropecuária Sinuelo LTDA situada na cidade de São Gabriel, Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em gaiolas, no biotério da Universidade Federal do Pampa, campus São Gabriel, com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz), recebendo água e ração. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética no Uso de Animais (CEUA / UNIPAMPA, Protocolo n ° 037/2012) de acordo com o Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONSEA

2.3. Técnica miográfica.

A preparação do músculo *biventer cervicis* foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados por via inalatória com aflotoxinas e, após o isolamento (Figura 11), o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs ((mM/L): NaCl

136mM; KCl 5mM; CaCl₂ 2,5mM; NaHCO₃ 23,8mM; MgSO₄ 1,2mM; KH₂PO₄ 1,2mM e glicose 11mM). A solução foi areada de modo constante com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), mantida a 37°C e estabilizada por 30 minutos antes do uso.

A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1 grama/força e foram aplicados pulsos supramáximos de até 10 V de 0,5 Hz de frequência e 0,2 ms. As contrações musculares resultantes de estímulos elétricos máximos e as contraturas em resposta à adição de ACh (120 µM) e KCl (40 mM) foram realizados na ausência de estimulação elétrica e registrado em fisiógrafo, por meio de transdutores isométricos. Os registros das contraturas para KCl e ACh foram realizados no início do experimento (antes da adição da peçonha) e no final do experimento (após 120 minutos de incubação com a toxina). Seis a oito lavagens foram efetuadas sempre após a adição de KCl e de ACh. Após 5 minutos de estabilização no banho de órgãos, o músculo foi exposto a peçonha de *B. pubescens* nas concentrações de 70, 140 e 280 µg/mL. O controle foi realizado somente com a solução Krebs.



Figura 11: Isolamento do músculo *biverter cervicis* de pintainho (Fonte: Do autor).

2.4. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A significância das diferenças foi determinada pelo teste ANOVA, com $p < 0,05$ considerado significativo. Para a criação dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 7.

2.5. SDS-PAGE

A mistura das peçonhas coletadas foi submetida a SDS-PAGE 15%, segundo Laemmli (1970). Foram utilizados 20 e 40 μg da mistura de peçonhas em condições reduzidas e não reduzidas. O gel de poliacrilamida foi corado com Comassie Blue G250 de acordo com as instruções do fabricante (BioRad).

3. Resultados e discussão

3.1. Efeito da peçonha de *B. pubescens* sobre a junção neuromuscular em preparação *biventer cervicis* de pintainho

Nas preparações de controle de junção neuromuscular de *biventer cervicis* de pintainho não houve mudanças significativas na amplitude das contrações musculares em resposta a estimulação indireta e as contraturas de ACh e KCl também se mantiveram estáveis (dados não apresentados). A peçonha de *B. pubescens* nas concentrações de 70 e 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produziu inibição progressiva e reversível por lavagem e na concentração de 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ houve bloqueio total e irreversível das contrações musculares. A força de contração diminuiu proporcionalmente a concentração de peçonha utilizada e o tempo de exposição do músculo a peçonha com inibições de 20, 40 e 60% nos tempos de 40, 60 e 110 minutos, respectivamente para a concentração de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$; inibições de aproximadamente 15, 40 e 60% em 20, 40 e 120 minutos na concentração de 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e de 20, 80 e praticamente 100% em 20, 80 e 120 minutos, respectivamente, de bloqueio da força de contratura na concentração de 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 12).

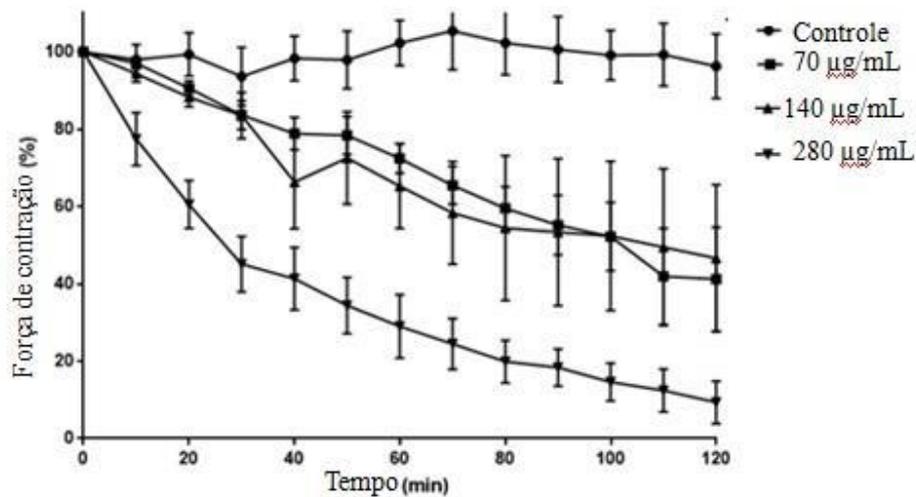


Figura 12. Efeito das concentrações da peçonha de *B. pubescens* sobre o músculo *biventer cervicis* de pintainho nas concentrações de 70, 140 e 280 µg/mL a 37°C. O gráfico mostra a curva de resposta à concentração-tempo para atividade de bloqueio neuromuscular da peçonha em comparação ao controle

O efeito da peçonha de *B. pubescens* sobre o músculo *biventer cervicis* de pintainho é semelhante a outros venenos botrópicos (Rodrigues-Simioni *et al*, 1983; Cogo *et al*, 1993; Lôbo-Araújo *et al*, 2002; Borja-Oliveira *et al*, 2003; Prianti *et al*, 2003; Abreu *et al*, 2007).

Quando comparamos outros ensaios neurotoxicológicos de espécies de *Bothrops* observamos as diferenças na toxicidade dos venenos de serpentes do mesmo gênero, a peçonha de *B. pauloensis*, nas concentrações de 5 – 20 µg/mL causou bloqueio total e irreversível em 120 minutos e na concentração de 100 µg/mL causou bloqueio total da força de contração em apenas 40 minutos de exposição (Soares *et al*; 2000); a peçonha de *B. leucurus* nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL causou bloqueio parcial na contração de força de *biventer cervicis* de pintainho de 80 e 40%, respectivamente (Prianti *et al*; 2003); *B. alcatraz*, na concentração de 5 µg/mL, não causou nenhum tipo de dano da força de contração do músculo *biventer cervicis*, porém na concentração de 50 µg/mL levou apenas 80 minutos de exposição para a inibição total da contração muscular e com 100 µg/mL pouco mais de 40 minutos foi o suficiente para a inibição total (Moraes *et al*; 2011).

As diferenças apresentadas na ação da peçonha entre serpentes do gênero *Bothrops* corroboram com as diferenças na composição proteica do veneno botrópico.

3.2. Análise por SDS-PAGE

No gel de poliacrilamida (Figura 13) é possível a observação de proteínas entre 14 kDa e 55 kDa. Dentre as condições analisadas (reduzido e não reduzido), é possível a observação de bandas um pouco abaixo de 50 kDa e em torno de 35 kDa no veneno reduzido, bandas estas que estão ausentes na condição não reduzida. Na condição reduzida também podemos visualizar bandas de 14 kDa mais proeminentes.

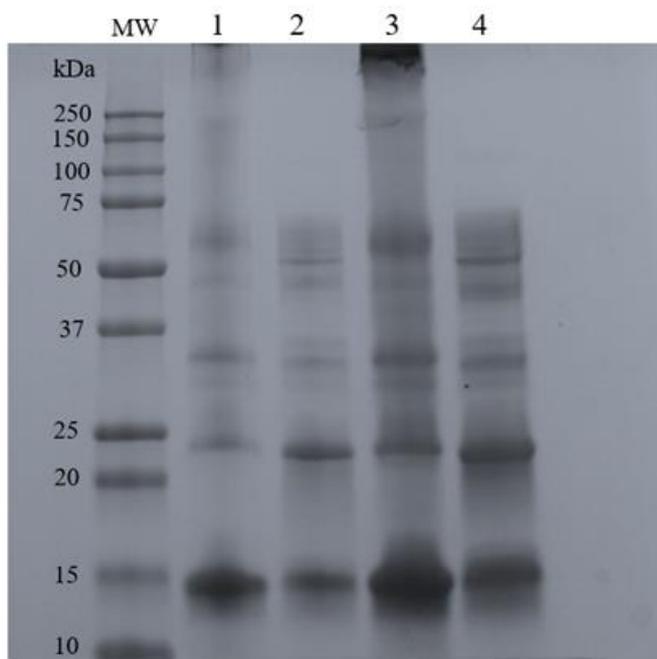


Figura 13. Análise por SDS-PAGE da peçonha de *B. pubescens* em condições reduzidas e não reduzidas. MW – Marcador de massa molecular; 1 - 20 µg de peçonha não reduzida; 2 - 20 µg de peçonha reduzida; 3 - 40 µg de peçonha não reduzida; 4 - 40 µg de peçonha reduzida. Corado com Comassie Blue G250.

O perfil eletroforético de diferentes serpentes do gênero *Bothrops* já foram elucidados em outros estudos, como Baptista, 2016, que estudou a peçonha de *B. jararaca* nascidas e mantidas em cativeiro, Debono, 2016 que estudou a peçonha de 6 espécies do gênero *Bothrops* e, Sousa *et al*, 2013, que estudou a peçonha de *B. jararacussu* (Baptista, 2016, Debono, 2016, Sousa *et al*, 2013).

Ao comparar o perfil eletroforético de *B. pubescens* com os perfis apresentados por Debono, 2016, podemos perceber a presença de proteínas com massa molecular de 50 kDa, possivelmente SVMP de classe PIII, que normalmente são encontradas entre 48 e 60 kDa, percebemos a alta intensidade de bandas em *B. lateralis*, *B. marchi*, *B. neuwiedi bolivianus*, no entanto esta banda não está presente em *B. asper*, *B. schlegelli*, em *B. pubescens*, podemos observar essa banda nas canaletas que apresentam o veneno reduzido, mas não no veneno não reduzido. Ao estudar a peçonha de *B. jararacussu*, Sousa e colaboradores, 2013, demonstra bandas intensas com massa molecular de 30 kDa, ausentes nas duas condições estudadas da peçonha de *B. pubescens*. Baptista, 2016, apresentou o perfil de *B. jararaca* nascidas e mantidas em cativeiro, esta peçonha apresentou bandas em torno de 23 kDa, também presentes no veneno reduzido e não reduzido de *B. pubescens* (Baptista, 2016, Debono *et al*, 2016, Sousa *et al*, 2013)

CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentamos o proteoma de *B. pubescens* analisado por três diferentes técnicas proteômicas: BUP, TDP e nTDP. No total, foram identificadas 15 famílias únicas de toxinas e demonstramos as semelhanças e peculiaridades da peçonha de *B. pubescens* em comparação com outras peçonhas de *Bothrops*. Também identificamos uma L-aminoácido oxidase dimérica utilizando nTDP. Além disso, apresentamos o efeito toxinológico da peçonha de *B. pubescens* frente ao músculo biventer cervicis, onde na maior concentração testada a peçonha foi capaz de bloquear irreversivelmente a contração muscular.

Com isso, demonstramos que a peçonha de *B. pubescens* é uma clássica peçonha botrópica, apresentando altas porcentagens de SVMP e LAAO, justificando os efeitos hemorrágicos apresentados por vítimas de picada por esta espécie, mas também apresentando pequenas porcentagens de moléculas com grande interesse nas áreas de biotecnologia e farmacêutica.

Esta é a primeira vez que a TDP foi utilizada para caracterizar uma peçonha botrópica.

PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos neste trabalho abrimos um grande leque para pesquisas futuras.

As moléculas identificadas podem ser isoladas e então testadas, sempre na busca do entendimento do seu mecanismo de ação, diversas dessas moléculas, encontradas em outras espécies do gênero *Bothrops*, já demonstraram potencial antifúngico, anticarcinogênico e antibacteriano.

Estudos futuros irão explorar o potencial das frações advindas da peçonha de *B. pubescens* frente a linhagens celulares carcinogênicas.

REFERÊNCIAS

- ABREU A. V. *et al.* **Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*).** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 148, n 1, p 142-149, 2007.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature, v. 422, 2003.
- AGUIAR, W. S., *et al.* **Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations.** PLOS ONE, 2019.
- AGUILAR, M. I., HEARN, M. T. W. **High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins.** High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules Part A: Fundamentals, p. 3–26, 1996.
- ALANGODE, A. *et al.* **Snake Antivenom: challenges and alternate approaches.** Biochemical Pharmacology, v. 181, 2020.
- ALAPE-GIRÓN, A. *et al.* **Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: Geographic, individual, and ontogenetic variations.** Journal of Proteome Research, v. 7, p. 3556-3571, 2008.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* **Clinical assessment and pathophysiology of *Bothrops* venom-related acute kidney injury: a scoping review.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.
- ALVES, R.M. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox*.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 2007;
- ANDRADE-SILVA, D. *et al.* **Venom profiling of the insular species *Bothrops alcatraz*: Characterization of proteome, glycoproteome, and N-Terminome using terminal amine isotopic labeling of substrates.** Journal of Proteome Research, v. 20, n. 2, p. 1341–1358, 2021.
- ASLAM, B. *et al.* **Proteomics: Technologies and Their Applications.** Journal of Chromatographic Science Advance, p. 1-15, 2016.
- ATALA, M. L. **Bioseparation.** International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology, v.7, n. 6, 2020.
- AUGUSTO-DE-OLIVEIRA, C., *et al.* **Dynamic rearrangement in snake venom gland proteome: Insights into *Bothrops jararaca* intraspecific venom variation.** Journal of Proteome Research v. 15, n. 10, p. 3752–3762, 2016.

BAPTISTA I. **Estudo comparativo do veneno botrópico de referência em relação ao veneno das serpentes *Bothrops jararaca* nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.** Instituto Butantan. São Paulo, 2016.

BARBOSA, L. G. *et al.* **A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjussuLAAO-II and BmooLAAO-II isolated from Brazilian *Bothrops* snake venoms.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 167, p. 267-278, 2021,

BERNHEIMER, A. W. *et al.* **Isoelectric analysis of some australian elapid snake venoms with special reference to phospholipase b and hemolysis.** Toxicon, v. 24, n. 8, p. 841-847, 1986.

BOLDRINI-FRANÇA, J. *et al.* **Minor Snake proteins: structure, function and potential applications.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v.1861, n. 4, p. 824-838, 2017.

BORGES-MARTINS, M., *et al.* **Répteis** p. 292-315. In: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (orgs.) Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007.

BORDON, K. C. F. *et al.* **Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 21, n. 43, 2015.

BORJA-OLIVEIRA C. R. *et al.* **The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission.** Braz. J. Med. Biol. Res. p. 617-624. 2003.

BURIN, S. M. *et al.* ***Bothrops moojeni* L-amino acid oxidase induces apoptosis and epigenetic modulation on Bcr-Abl+ cells.** Journal of Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2020.

BUSTILLO, S. *et al.* **Isolation of two basic phospholipases A2 from *Bothrops diporus* snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49 variants.** Toxicon, v. 168, p. 113-121, 2019.

CALVETE, J. J. *et al.* **Snake venomomics. Strategy and applications.** Journal of mass Spectrometry, v. 42, p. 1405-1414, 2007.

CALVETE, J. J. **Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming.** Expert Review Proteomics, v. 8, n. 5, p. 739-758, 2011.

CALVETE, J. J. **Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology.** Toxicon, v. 75, p. 44-62, 2013.

CARONE, S. E. I. *et al.* **A new L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacuçu* snake venom: isolation, partial characterization, and assessment of pro-**

apoptotic and antiprotozoal activities. International Journal of Biological Macromolecules, v. 103, p. 25-35, 2017.

CAVALCANTE, W. L. *et al.* **Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom.** Journal of venom research, v. 2, p. 37-41, 2011;

CHIPPAUX, J. P. **Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 23, n. 38, 2017.

CLEMETSON, K. J. **Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors.** Toxicon, v. 56, p. 1236-1246, 2010.

CISCOTTO, P. *et al.* **Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom.** Toxicon, v. 53, p. 330-341, 2009.

COGO J. C. *et al.* **Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse na chicknerve-muscle preparation.** Toxicon, v. 31, p. 1237-1247, 1993.

COSKUM, O. **Separation techniques: Chromatography.** North Clin Istanbul, v. 2, n. 2, p 156- 160, 2016.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. **Répteis brasileiros: lista de espécies.** Herpetologia Brasileira, v. 3, p.74 – 84, 2014;

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. **Design of angiotensin converting enzyme inhibitors.** Nature Medicine, v. 5, n. 10, 1999.

DEBONO J., *et al.* **Canopy Venom: Proteomic Comparison among New World Arboreal Pit-Viper Venoms.** Toxicons, v. 8, 2016.

DHANANJAYA, B. L.; Souza, C. J. M. **The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms.** Cell Biochemistry and Function, v. 28, p. 171-177, 2010.

DJORDJEVIC, J. T. **Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development – lessons from *Cryptococcus neoformans*.** Frontiers in Microbiology, v. 1, 2010.

EL-AZIZ, T. M. A. *et al.* **Advances in venomics: Modern separation techniques and mass spectrometry.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2021.

FARIAS, I. B., *et al.* **Functional and proteomic comparison of *Bothrops jararaca* venom from captive specimens and the Brazilian Bothropic Reference Venom.** Journal of Proteomics, v. 174, p. 36-46, 2018.

FERNANDES, C. T. *et al.* **Neuromuscular activity of *Bothrops fonsecai* snake venom in vertebrate preparations.** Journal of Venom Research, v. 5, p. 6-15, 2014.

FERRAZ, C. R. *et al.* **Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis.** *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 19, 2019.

FERREIRA, S. H. **A bradykinin-potentiating factor (bpf) presente in the venom of *Bothrops jararaca*.** *Brit. J. Pharmacol.* V. 24, p. 163-169, 1965.

FONTANA F. **Traité sur le vnin de la vipere sur les poisons americains sur le laurier-cerise et sur quelques autres poisons végétaux: on y a joint des observations sur la structure primitive du corps animal. Differentes expériences sur la reproduction des nerfs et I. Vol. 1.** Nyon l'Aine, 1781.

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

FOX, J., W; SERRANO, S. M. T. **Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research.** *Journal of Proteomics*, v. 72, p. 200-209, 2009.

FREITAS-DE-SOUSA, L. A., *et al.* **Size matters: An evaluation of the molecular basis of ontogenetic modifications in the composition of *Bothrops jararacussu* snake venom.** *Toxins*, v. 12, n. 12, 2020.

GHEZELLOU, P. *et al.* **A perspective view of top-down proteomics in snake venom research.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 33, n. S1, p. 20-27, 2019.

GREN, E. C. K. *et al.* **Comparative analysis of the high molecular mass subproteomes of eight *Bothrops* snake venoms.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 30, p. 113–121, 2019

GUO C. *et al.* **Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase.** *Toxicon*, v. 60, n. 3, p. 301-311, 2012.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. **Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins.** *Toxicon*, v. 62, p. 27-39, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M. **Understanding and confronting snakebite envenoming: The Harvest of cooperation.** *Toxicon*, v. 109, p. 51-62, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M., *et al.* **Snakebite Envenoming.** *Nature Reviews*, v. 3, n. 17063, 2017.

HAGEL, L. **Gel Filtration: Size Exclusion Chromatography.** *Protein Purification*, p. 51–91, 2011.

HARVEY A. L. *et al.* **Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks.** *Toxicon*, v. 32, n.3, p. 257-65, 1994

HATAKEYAMA, D. M., *et al.* **Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings.** Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases, v. 26, 2020.

KING, G. F. **Venoms to drugs: translating venom peptides into therapeutics.** Australian Biochemist, v. 44, n. 3, p. 13-15, 2013.

KNUDSEN, G. M.; CHALKEY, R. J. **The effect of using an inappropriate protein database for proteomic data analysis.** PLoS ONE, v. 6, n. 6, 2011.

KOSTIZA, T. *et al.*, **Nerve growth factor from the venom of the Chinese cobra *Naja naja atra*: purification and description of non-neuronal activities.** Toxicon, v. 33, n. 10, p. 1249-61, 1996.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LÔBO DE ARAÚJO A. *et al.* **Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom and a casein olytic fraction.**Toxicon, v. 40, p.1283-1289, 2002.

PORATH, J. **From Gel Filtration to Adsorptive Size Exclusion.** Journal of Protein Chemistry, v. 16, n. 5, 1997.

MACHADO, T., SILVA, V. X., SILVA, M. J. de J. **Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification.** Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 71, p. 1 -14, 2014.

MACHADO, A. R. T. *et al.* **Cytotoxic, genotoxic, and oxidative stress-inducing effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararacussu* venom in a co-culture model of HepG2 and HUVEC cells.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 127, p. 425-432, 2019.

MAMEDE, C. C. N., *et al.* **Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade.** Toxicon, v. 187, p. 10 -18, 2020.

MANNION, R.J. *et al.* **Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 96, n. 16, p. 9385-90, 1999.

MARKLAND, F. S.; Swenson S. **Snake venom metalloproteinases.** Toxicon, v. 62, p. 3-18, 2013.

MELANI, R. D.; *et al.* **It is time for top-down venomomics.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 23, n. 44, 2017.

MELGAREJO A.R. **Serpentes peçonhentas do Brasil.** In Cardoso J.L.C., França F.O.S., Wen F.H., Málaque C.M.S. & Haddad Jr V. (Eds), Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sarvier Editora, São Paulo. p.42-69. 2009;

MENEZES, M. C. *et al.* **Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings.** *Toxicon*, v. 47, p. 306-312, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde alerta para os impactos dos acidentes relacionados às picadas de cobras.** <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021-1/setembro/ministerio-da-saude-alerta-para-os-impactos-dos-acidentes-relacionados-as-picadas-de-cobras>. Acessado em 08 de dezembro de 2021.

MODAHL, C. M. *et al.* **Omics Technologies for Profiling Toxin Diversity and Evolution in Snake Venom: Impacts on the Discovery of Therapeutics and Diagnostic Agents.** *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 8, p. 91-116, 2020.

MORA-OBANDO, D. *et al.* **Venom variation in *Bothrops asper* lineages from North-Western South America.** *Journal of Proteomics*, v. 229, 2020.

MUNAWAR, A. *et al* **Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery.** *Toxicon*, v. 10, n. 474, 2018.

NICOLAU, C. A. *et al.* **An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*.** *Journal of Proteomics*, v. 151, p. 214-231, 2017.

NICOLAU, C. A. *et al.* **An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*.** *Journal of Proteomics*, v. 151, p. 214 – 231, 2017

NOWAKOWSKI, A. B. *et al.* **Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions.** *Metallomics*, v. 5, n. 5, p. 1068-1078, 2014.

OGUIURA, N; FERRAREZZI, H; BATISTIC, R.F. **Cytogenetics and molecular data in snakes: a phylogenetic approach.** *Cytogenetic and Genome Research*, v. 127, p. 128 – 142, 2010.

OHNO M. *et al.* **Molecular Evolution of Snake Toxins: Is the Functional Diversify of Snake Toxins Associated with a Mechanism of Accelerated Evolution?** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. V. 59, p. 307-364, 1997.

OLIVEIRA, R. C. *et al.* **Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos.** In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; JR, V.H. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica. 2 ed. São Paulo: SARVIER, 2009;

OLIVEIRA, S. S. et al. **Factors Associated with Systemic Bleeding in *Bothrops* Envenomation in a Tertiary Hospital in the Brazilian Amazon.** *Toxins*, v. 11, n. 22, 2019.

ONDETTI, M. A. et al. **Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis.** *Biochemistry*, v. 19, n. 22, 1971.

PENG, J.; GYGI, S. P. **Proteomics: the move to mixtures.** *Journal of Mass Spectrometry*, v. 36, p. 1083-1091, 2001.

PEREIRA, L. M. et al. **In-depth transcriptome reveals the potential biotechnological application of *Bothrops jararaca* venom gland.** *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 2020.

PETRAS, D. et al. **Venom proteomics of Indonesian King Cobra, *Ophiophagus hannah*: Integrating top-down and bottom-up approaches.** *Journal of Proteome Research*, v. 14, n. 6, p. 2539-556, 2015.

PRIANTI J. R. et al. **Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick *Biventer cervicis* preparations.** *Toxicon*, v. 41, p. 595-603. 2003.

REPTILE DATABASE. <http://www.reptile-database.org/>. Acessado em 03 de maio de 2021.

RIBEIRO, P. H. et al. **Mechanism of the cytotoxic effect of l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops alternatus* snake venom.** *International Journal of Biological Macromolecules*. V. 92, p. 329-337, 2016.

RIGHETTI, P. G. et al. **Prefractionation techniques in proteome analysis: The mining tools of the third millennium.** *Electrophoresis*, v. 26, p. 297-319, 2005.
RODRIGUES-SIMIONI L. et al. **The effects of *Bothrops jararacussu* venom on its components of rognerve-muscle preparation.** *Neuroscience*, v. 10, n. 2, p. 475-89, 1983.

RODRIGUES, C. R., et al. **Proteomic and toxinological characterization of Peruvian pitviper *Bothrops brazili* (“jergón shushupe”), venom.** *Toxicon*, v. 184, p. 19- 27, 2020.

Sambrook J, et al. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHES, E. F. et al. **Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: Structural, biochemical features and therapeutic potential.** *Toxins*, v. 9, p. 392, 2017.

SANZ, L. et al, **Venomics and antivenomics of the poorly studied Brazil's lancehead, *Bothrops brazili* (Hoge, 1954), from the Brazilian State of Pará.** *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 2020.

SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C. **The modular nature of bradykinin potentiating peptides isolated from snake venoms.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 23, n. 45, 2017.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R.C. **Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved.** Toxicon, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.

SERRANO, S. M. The long road of research on snake venom serine proteinases. Toxicon, v. 62, p. 19-26, 2013.

SILVA, V. X. **The Bothrops neuwiedi complex.** The venomous reptiles of the western hemisphere, v. 5, p. 2, 2004.

SILVA, V. X.; RODRIGUES, M.T. **Clinical assessment and pathophysiology of Bothrops venom-related acute kidney injury: a scoping review.** Phyllomedusa, v. 7, n. 1, p. 45-90, 2008.

SIMIZO, A. *et al.* **Comparative gender peptidomics of Bothrops atrox venoms: are there differences between them?** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2020.

SOARES, A. M. *et al.* **Structural and functional characterization of BnSP-7 a Lys49 myotoxic phospholipase A (2) homologue from Bothrops neuwiedi pauloensis venom.** Arch. Biochem. Biophys., v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, S. G.; OLIVEIRA, L. L. **Venom-Sweet-Venom: N-Linked Glycosylation in Snake Venom Toxins.** Protein and peptides letters, v. 16, p. 913-919, 2009.

SOUSA, L. F. *et al.* **Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of Bothrops complex.** PLOS Neglected Tropical Disease, v. 7, n. 9, 2013.

TAN, K. K. *et al.* **L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential.** Toxicon, v. 144, p. 7-13, 2018.

TIPTON, J. D.; *et al.* **Analysis of intact protein isoforms by mass spectrometry.** Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 29, 2011.

TOBY, T. K. *et al.* **Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms.** Annual Review of Analytical Chemistry, v. 9, 2016.

UETZ, P. **The reptile database.** Karlsruhe: Research Center, 2009. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em 08 de dezembro de 2021.

ULLAH, A. *et al.* **Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 421, p. 124-128, 2012.

UNDERWOOD, G. **A contribution to the classification of snakes.** Brit. Must. Nat. Hist., n.653, p. 1-179, 1967;

Valente, R. H. *et al.* **Bothrops jararaca accessory venom gland is an ancillary source of toxins to the snake.** Journal of Proteomics, v. 177, p. 137–147, 2018.

WARREL, D.L., Snake bites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management In: Campbell, J.A.; LAMAR, W.W. (Eds). **The venomous reptiles of the western Hemisphere.** New York: Coronell University, p. 709 – 761. 2004;

WILKINS, M. R. *et al.* **Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.** Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 13, n. 1, 1996.

WILLIAMS, H. E. *et al.* **The Urgent Need to Develop Novel Strategies for the Diagnosis and Treatment of Snakebites.** Toxins, v. 11, 2019.

WITTIG, I.; SCHÄGGER, H. **Advantages and limitations of clear-native PAGE.** Proteomics, v. 5, p. 4338-4346, 2005.

WOHLRAB, J. *et al.* **Use of hyaluronidase for pharmacokinetic increase in bioavailability of intracutaneously applied substances.** Skin Pharmacology and Physiology, v. 27, p. 276-282, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases: enhancing safe treatment for more than 1 billion people annually.** <https://www.who.int/news/item/16-08-2021-neglected-tropical-diseases-enhancing-safe-treatment-for-more-than-1-billion-people-annually>. Acessado em 02 de dezembro de 2021.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. **Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins.** Toxicon, v. 44, p. 227-231, 2004.

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

ZHANG, Y. *et al.* **Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics.** Chem. Rev. V. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013

ZHANG, Z. *et al.* **High-Throughput Proteomics.** Annual Review of Analytical Chemistry, v. 7, p. 427-454, 2014.

ZHANG, Y. V. *et al.* **Liquid chromatography–tandem mass spectrometry an emerging technology in the toxicology laboratory.** Clinics in Laboratory Medicine, v. 36, n. 4, 2016.

ZAMUNÉR S. R. *et al.* Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon* v. 44, n. 3. p. 259-271, 2004.

ZELANIS, A., *et al.* *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. *Proteomics*, v. 11, n. 21, p. 4218–4228, 2011.

ANEXOS

Tabela suplementar 2 referente ao artigo intitulado “Venom characterization of the Brazilian Pampa snake *Bothrops pubescens* by top down and bottom-up proteomics.”

Supplementary Table 2. Proteins identified by top-down proteomics from crude *B. pubescens* venom. The pooled venom was directly analyzed by LC-MS/MS. The raw data was searched using TDPortal.

Identified protein	Protein Family	Accession #	p-Score	E-Value	Observed Mass (Da)
L-amino-acid oxidase	LAAO	Q6TGQ9	1.2 e ⁻¹⁰²	1.8 e ⁻⁹³	3,571.80
MP_I2 SVMP	SVMP	E3UJL4	1.0 e ⁻⁸⁴	1.5 e ⁻⁷⁵	3,982.95
L-amino acid oxidase	LAAO	X2JCV5	5.3 e ⁻⁷⁶	7.8 e ⁻⁶⁷	3,292.65
L-amino acid oxidase	LAAO	B5AR80	5.3 e ⁻⁷⁶	7.8 e ⁻⁶⁷	3,292.65
Zinc metalloproteinase/disintegrin	SVMP	Q072L5	2.2 e ⁻⁶⁹	3.3 e ⁻⁶⁰	4,088.22
Snake venom metalloproteinase neuwiedase	SVMP	Q919R4	3.5 e ⁻⁶⁶	5.2 e ⁻⁵⁷	3,147.67
Snake venom metalloproteinase leucurolysin-A	SVMP	P84907	1.2 e ⁻⁵⁷	1.7 e ⁻⁴⁸	3,262.71
Bradykinin-potentiating peptide 9a	BPP	POC7S4	7.0 e ⁻²³	1.0 e ⁻¹⁶	1,100.57
Zinc metalloproteinase/disintegrin	SVMP	Q5XVW8	4.4 e ⁻⁴⁸	6.4 e ⁻³⁹	2,902.56
Bradykinin-potentiating and C-type natriuretic peptides	BPP	Q6LEM5	9.5 e ⁻²⁰	1.4 e ⁻¹³	1,882.91
Bradykinin-potentiating peptide 13a	BPP	POC7S0	7.2 e ⁻²⁰	1.1 e ⁻¹³	1,369.68
Acidic phospholipase A2 BpPLA2-TXI	PLA2	DOUGJ0	3.3 e ⁻⁴³	4.8 e ⁻³⁴	3,277.54
Basic phospholipase A2 homolog BaTX	PLA2	P86453	1.8 e ⁻³⁰	9.0 e ⁻²⁵	14,080.56
Bradykinin-potentiating peptide 11	BPP	POC7S5	3.8 e ⁻²⁹	2.0 e ⁻²³	1,100.57
MP_Ila SVMP	SVMP	E3UJM0	1.5 e ⁻³⁸	2.2 e ⁻²⁹	3,257.65
L-amino-acid oxidase	LAAO	POCC17	2.8 e ⁻³⁶	4.1 e ⁻²⁷	2,894.65
Basic phospholipase A2 homolog BmatTX-II	PLA2	P0DMK0	3.9 e ⁻²⁵	2.0 e ⁻¹⁹	2,822.37
Bradykinin-potentiating peptide 14a	BPP	P85163	3.8 e ⁻²⁹	2.0 e ⁻²³	1,100.57
Bradykinin-potentiating and C-type natriuretic peptides	BPP	Q9PW56	5.4 e ⁻¹⁷	2.6 e ⁻¹¹	1,294.64
Metalloproteinase of class P-II MP11-3	SVMP	A0A1I9KNS3	3.1 e ⁻²⁹	4.5 e ⁻²⁰	1,396.73
Zinc metalloproteinase/ disintegrin	SVMP	P31989	1.8 e ⁻¹²	2.6 e ⁻⁶	7,735.16
Disintegrin saxatilin	SVMP	Q9DGH6	3.2 e ⁻¹²	4.7 e ⁻⁶	7,849.15
Zinc metalloproteinase/disintegrin VMP-II	SVMP	C9E1R9	1.5 e ⁻¹¹	2.2 e ⁻⁵	7,845.29
Basic phospholipase A2 homolog 2	PLA2	Q9I834	2.0 e ⁻¹²	1.0 e ⁻⁶	13,928.59
L-amino-acid oxidase apoxin-1	LAAO	P56742	6.3 e ⁻²⁶	9.3 e ⁻¹⁷	1,728.02
BATXSVSP18	SVSP	A0A1L8D5U3	4.0 e ⁻²⁵	5.8 e ⁻¹⁶	2,568.39
Disintegrin jarastatin	SVMP	Q0NZX5	2.0 e ⁻¹⁷	9.8 e ⁻¹²	7,870.14
Bradykinin-potentiating peptide 12c	BPP	P85162	4.9 e ⁻¹⁷	2.3 e ⁻¹¹	1,100.57
L-amino-acid oxidase	LAAO	Q6WP39	4.3 e ⁻²⁴	6.3 e ⁻¹⁵	2,273.08
Serine-type endopeptidase inhibitor	iSVSP	C1IC53	1.1 e ⁻⁵	15.49	2,412.37
Basic phospholipase A2 homolog BaTX	PLA2	P86453	1.3 e ⁻²⁶	7.1 e ⁻²¹	14.02
Basic phospholipase A2 homolog 2	PLA2	P0DTS8	6.1 e ⁻¹⁷	3.1 e ⁻¹¹	13,958.23
Basic phospholipase A2 homolog bothropstoxin-1	PLA2	Q90249	2.4 e ⁻¹⁵	1.3 e ⁻⁹	13,768.47
Basic phospholipase A2 homolog BnSP-7	PLA2	Q9IAT9	2.3 e ⁻¹⁵	1.2 e ⁻⁹	13,913.09
Basic phospholipase A2 homolog 2	PLA2	P24605	2.4 e ⁻¹¹	1.3 e ⁻⁵	13,912.28
Basic phospholipase A2 homolog piratoxin-2	PLA2	P82287	2.3 e ⁻¹¹	1.3 e ⁻⁵	13,943.07
Basic phospholipase A2 homolog 2	PLA2	Q9I834	1.6 e ⁻¹⁰	8.2 e ⁻⁵	13,993.31
Basic phospholipase A2 homolog piratoxin-1	PLA2	P58399	9.0 e ⁻¹⁰	0.00047	13,912.22
Basic phospholipase A2 PeBP(R)-I/II	PLA2	Q2PG81	5.8 e ⁻⁸	0.0065	15,691.37
Zinc metalloproteinase/disintegrin	SVMP	P31989	7.7 e ⁻⁸	0.0086	7,433.02