

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CAROLINA BRÁS COSTA

Venenos de serpentes do gênero *Bothrops*: impacto da glicosilação na complexidade dos proteomas e função de toxinas

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data de Depósito na SPG:
28/01/2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CAROLINA BRÁS COSTA

Venenos de serpentes do gênero *Bothrops*: impacto da glicosilação na complexidade dos proteomas e função de toxinas

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Dra. Solange Maria de Toledo Serrano

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C837v	Costa, Carolina Brás Venenos de serpentes do gênero Bothrops: impacto da glicosilação na complexidade dos proteomas e função de toxinas / Carolina Brás Costa. - São Paulo, 2022. 188 p.
	Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Serrano, Solange Maria de Toledo
	1. Ácido siálico. 2. Bothrops. 3. Espectrometria de massas. 4. Glicoproteômica. 5. Veneno de serpente. I. T. II. Serrano, Solange Maria de Toledo, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Venenos de serpentes do gênero *Bothrops*: impacto da glicosilação na complexidade dos proteomas e função de toxinas"

CAROLINA BRÁS COSTA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

Profa. Dra. Solange Maria de Toledo Serrano
(Orientadora e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Graziella Eliza Ronsein
IQ - USP

Prof. Dr. Alexandre Keiji Tashima
UNIFESP

Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme
CNPEM/LNBio

SÃO PAULO
30 de março de 2022

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Venenos de serpentes do gênero Bothrops: impacto da glicosilação na complexidade dos proteomas e função de toxinas.

Pesquisador: CAROLINA BRAS COSTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04612318.9.0000.0086

Instituição Proponente: Fundação Butantan

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.207.055

Apresentação do Projeto:

Trata-se de parecer da análise das respostas às pendências do projeto de Pesquisa Básica, apresentado à FAPESP para solicitação de Bolsa de Doutorado Direto no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada-CeTICS/CEPID, do Instituto Butantan, que utilizará 40mL de sangue de 5 voluntários homens (mulheres apresentam variações hormonais que podem interferir nos resultados dos experimentos), saudáveis, coletados em duas vezes, com pelo menos 3 horas de jejum prévio. O sangue coletado será utilizado para parte dos experimentos que analisarão os proteomas das toxinas presentes no veneno de várias subespécies do gênero Bothrops jararaca de cobras, mais especificamente a ação coagulante de tais toxinas. Tais experimentos, fornecerão mais subsídios para o entendimento do complexo processo evolutivo destas espécies, ampliando o conhecimento sobre os diferentes sub-proteomas de glicoproteínas presentes nas toxinas.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: analisar a variabilidade dos proteomas de venenos do gênero Bothrops com foco em seus sub-proteomas de glicoproteínas. Para isso, os seguintes objetivos específicos são propostos: 1- Identificar por espectrometria de massas as glicoproteínas com afinidade pelas lectinas SNA (Sambucus nigra Lectin), MAL I (Maackia amurensis lectin) e PHA-E (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin) presentes em venenos do gênero Bothrops (B. cotiara, B. insularis, B. jararaca, B.

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3397-2464

CEP: 01.223-010

E-mail: smscep@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.207.055

moojeni, B. neuwiedi, B. jararacussu, B. erythromelas, B. atrox e B. fonsecai). 2- Analisar por espectrometria de massas a interação de duas fosfolípses A2 (ácida e básica) de venenos do gênero Bothrops, que não são glicosiladas, com as lectinas concanavalin A, wheat germ agglutinin e peanut agglutinin. 3- Analisar o papel do ácido siálico presente na porção de carboidratos das proteinases de venenos de Bothrops em suas atividades enzimáticas (coagulante, gelatinolítica e amidolítica).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefícios de qualquer natureza para os participantes. Os riscos inerentes à qualquer punção venosa simples (hematomas, punção arterial, infecção, lesão nervosa e dor) foram devidamente identificados pela pesquisadora que assume a responsabilidade de tratamento e indenização caso ocorram.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, com bom embasamento, que pode ajudar a compreender melhor como o ácido siálico (um componente de algumas toxinas presentes no veneno de várias espécies do gênero Bothrops) pode influenciar na atividade coagulante dos componentes do veneno e assim utilizar esse conhecimento para o desenvolvimento de possíveis estratégias terapêuticas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados, adequadamente, os documentos obrigatórios.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora respondeu a contento às solicitações do CEP:

1) Informar quem serão os participantes e se têm a possibilidade de entender as informações técnicas do TCLE. Caso contrário, reelaborá-lo em linguagem mais acessível.

Para a realização dessa pesquisa, serão recrutados como voluntários para doação de sangue, os estudantes do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – LETA do Instituto Butantan. Considerando que esses estudantes estão na pós-graduação ou realizando sua graduação na área de biologia/bioquímica, espera-se que a linguagem utilizada no TCLE seja o suficiente para que os voluntários compreendam a proposta da pesquisa e como o sangue doado por eles será utilizado no projeto.

Ainda, quanto ao termo de consentimento, será realizada uma reunião em nosso laboratório onde eu, como pesquisadora, irei apresentar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)” e esclarecerei todas as dúvidas que surgirem durante esta etapa. Logo após, os

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3397-2464

CEP: 01.223-010

E-mail: smscep@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.207.055

voluntários irão receber o TCLE para que seja lido com calma, e será concedido um tempo adequado para que cada convidado a participar da pesquisa possa refletir na tomada de decisão. Superada essa etapa, os voluntários que concordarem em participar da pesquisa, deverão assinar as duas vias do TCLE e devolver uma via para o pesquisador.

2) Reelaborar o trecho do TCLE em que a pesquisadora afirma não haver riscos para o participante, pois toda punção venosa apresenta riscos, mesmo que mínimos, e inserir no texto, a assunção de responsabilidade em caso de algum problema decorrente da punção venosa realizada para a pesquisa.

O TCLE foi novamente redigido para atender as modificações requeridas. O novo arquivo foi anexado a Plataforma Brasil.

Dessa forma, foi reformulado o item “Riscos e desconfortos para o participante”, ressaltando os possíveis riscos que o participante estará exposto, como o aparecimento de hematomas na região da coleta do sangue, desconforto decorrente da introdução da agulha no local da punção, e o aparecimento de infecção, risco que será evitado pelo processo de assepsia padrão.

Ainda foi adicionado que a pesquisadora se responsabilizará por qualquer problema decorrente da punção venosa realizada para a pesquisa e que os voluntários que participarão da pesquisa pertencem ao Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA).

Considerações Finais a critério do CEP:

Para início da coleta dos dados, o pesquisador deverá se apresentar na mesma instância que autorizou a realização do estudo (Coordenadoria, Supervisão, SMS/Gab, etc).

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

De acordo com a Res. CNS 466/12, o pesquisador deve apresentar os relatórios parciais e final através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3397-2464

CEP: 01.223-010

E-mail: smscep@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.207.055

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1258285.pdf	08/03/2019 11:47:10		Aceito
Outros	Resposta_as_pendencias_apontadas_no_parecer.pdf	08/03/2019 11:46:26	CAROLINA BRAS COSTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECarolinaBras_Alterado.pdf	08/03/2019 11:04:47	CAROLINA BRAS COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhadoCarolinaBras.pdf	12/12/2018 11:25:57	CAROLINA BRAS COSTA	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoCarolinaBras.pdf	12/12/2018 11:12:20	CAROLINA BRAS COSTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Março de 2019

Assinado por:
SIMONE MONGELLI DE FANTINI
(Coordenador(a))

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.223-010

Telefone: (11)3397-2464

E-mail: smscep@gmail.com

*Ao avô Geraldo,
Aos meus pais Eduardo e Tânia,
A todos que foram essenciais nessa caminhada: irmãos, amigos e mestres.*



AGRADECIMENTOS

Toda conquista é resultado de muitas mãos, dedicação e estrutura para acontecer. Olhar para tudo isso, aos que fizeram história na ciência antes de mim e aos que me possibilitaram finalizar essa etapa, me inspira a agradecer e compreender como somos pequenos diante de tudo isso que chamamos de vida, e que audaciosamente a ciência se prontifica a entender. Então, para todos que fizeram parte direta ou indiretamente deste trabalho, ofereço meu profundo reconhecimento, agradecimento e esta pequena contribuição para a ciência.

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, saúde e pelas oportunidades que me possibilitaram aprender e ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais Eduardo e Tânia por serem meus pilares de amor, força e inspiração. Obrigada por me ensinarem o valor da educação e por sempre reforçarem que o conhecimento é algo que ninguém pode nos tirar. Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui. Eu os amo muito, me orgulho e honro toda trajetória de vocês.

Às minhas irmãs Camila e Fernanda pelo auxílio na finalização da tese, assim como em todos os momentos de ajuda, risadas, abraços e parceria. Ao meu irmão Rodrigo pela torcida, assim como toda sua família linda: Pedrinho, Fefê e Alexandra. Todos vocês têm um lugar especial no meu coração.

Ao meu amor, amigo e parceiro de risadas e de sonhos, Joshua. Obrigada pela ajuda com a tese e pelo apoio nesta etapa final. Amo você, grão 

À minha querida avó Maria e avós Oliveira, Geraldo e Conceição (*in memoriam*) pelos momentos felizes compartilhados e pela alegria de viver, que reverbera aqui dentro e me faz ser grata por todo aprendizado e sabedoria que adquiri com vocês.

À Dra. Solange Serrano, pela orientação, amizade, paciência e pela grande generosidade em ter me acolhido no grupo. Sou grata pelo caminho que percorremos juntas e pelo meu amadurecimento científico ao seu lado. Agradeço por ter compartilhado seu conhecimento comigo e pela confiança depositada em mim.

Agradeço aos queridos colegas antigos do Laboratório de Toxinologia Aplicada, os doutores: Milene Menezes, Daniela Cajado, Dilza Trevisan, Eduardo Shigueo, Débora Andrade, Eric Green e Ana Helena (T), assim como o Ms. Eric Pereira e Jéssica Alcantra pela amizade e pelos ensinamentos compartilhados comigo. Vocês me ajudaram muito no processo de amadurecimento, e com conversas construtivas e momentos agradáveis no laboratório. Aos colegas recentes, Dr. Alison Chaves, Dra. Bianca Barros, Joanderson Pereira e Pedro Candido pelas risadas e pela ajuda final com a tese, em especial ao Dr.

Alison, pelas bonitas reflexões sobre o que é fazer ciência e por sua contribuição nas análises do peptidoma. Ao Ismael, pela paciência e ajuda para operar o espectômetro e à Mariana pela parceria. Vocês foram essenciais para tornar minha jornada no laboratório mais alegre. Obrigada.

A todos os pesquisadores, estagiários, pós-graduandos e funcionários do LETA e a todos que passaram por esse prédio, dentre eles Francisca, Fábio, Carol, Juliana, Ed, Thiago, Soraia e Laura. Obrigada pelos momentos tão agradáveis. À Leda Domingues, Leila Hashimoto e Sueli Pedroza, sempre solícitas na secretaria do LETA, assim como Milton Oliveira, essencial na pós-graduação em Bioquímica, sempre prestativo com todos. Aos prestadores de serviço que atuam no Instituto Butantan, em especial a alguns amigos do refeitório, Emilia, Muriel e no LETA, a Dona Lidia♥ e Eliana.

Ao Dr. Milton Junior e Dr. Marcelo Reis, pelas conversas e aprendizados sobre bioinformática e por serem tão generosos comigo nos momentos em que precisei de ajuda.

Ao querido amigo Alex e sua linda família, que foram meu suporte em São Paulo. Amigo do coração que sempre me auxiliou durante o doutorado com conversas, correções de relatórios e amadurecimento científico. Agradeço ao Universo por termos nos encontrado e sou eternamente grata por nossa linda amizade. Também agradeço por todo cuidado e amorosidade da Mônica, sempre querida e acolhedora.

À amiga e colaboradora Marisa Roxa, que me possibilitou realizar as atividades coagulantes em seu laboratório, sempre solícita e querida. Obrigada por todas as conversas e linda amizade que criamos.

Ao Marquinho pela ajuda com as análises estatísticas e por todo apoio neste processo. Sua presença foi e é essencial na minha vida. Te amo muito, amigo! Espero te ter para sempre na minha vida.

Ao David Silva por me ajudar tantas horas se dedicando na geração de alguns gráficos e por toda sua ajuda, amizade e parceria nesses últimos anos. Sou muito sortuda de ter a sua amizade. Gratidão por tanto!

Ao Edzinho pela prontidão em me ajudar com a edição de algumas imagens, assim como a contribuição do Didi nos momentos finais e por toda amizade nutrida nesses últimos treze anos.

Aos amigos do GEENL, pelo apoio e reuniões na Física, por todo suporte durante estes anos em São Paulo, em especial ao Álvaro com sua postura tão acolhedora. Vocês foram essenciais me fazendo sentir-me em casa.

Aos queridos e lindos amigos do forró!! Di, Zé (*in memoriam*), Carú, João, Vivi, Jójó, Thi, Carol, Bahia, Angela, Tom, Aline, Regiane, Felipe, Renata, Rold, Adja, Tony,

Fran, Paulinho, enfim, todos que alegraram minhas noites e feriados com sorrisos, danças, abraços, sintonia e muito amor pela dança. Vocês foram fundamentais para tornar São Paulo um lugar especial.

Aos amigos e sócios do The Tribe: Max, Marcos, Lívia, Celso, Tati e tantas outras pessoas incríveis que conheci nesse meio. Obrigada pelos momentos compartilhados, pelo apoio e por me auxiliar a desenvolver minhas *soft skills*!

Aos amigos que a vida me deu, Mariana, Evandro, Marcelinha, Marcelo, Florzinha e Breno; assim como minha irmã-amiga Thais, pela amizade, carinho e auxílio de sempre, estando próxima desde antes da pós graduação. Amizade que trouxe junto também o Alejo e tantas outras pessoas especiais na vida. Obrigada a vocês.

Ao 24B. A casa que foi meu lar, meu cantinho de conversas sem fim, de aprendizados e de muitas mudanças em São Paulo. À todes que passaram por aqui, Paulo, Marina, Mariana Vitti, Vic, Thais, Marcela, Merllin, Iza e Gabis³, agradeço muito. Porém em especial à Marina e minha amiga-irmã Vitti, amigas que sempre estiveram ao meu lado por todo esse tempo, cuidando, rindo, chorando e tendo uma presença fundamental na minha história em São Paulo. Amo vocês!

Por fim, ao Prof. Dr. Hugo Armelin, coordenador do Center of Toxins, Immune-response and Cell Signaling-CEPID-FAPESP, pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento de parte do mestrado (processo 2015/23017-1) e desta tese de doutoramento direto (processos 2017/09929-3 e 2019/24760-0), assim como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq por parte do mestrado (processo 151526/2015-0)

Ao Instituto Butantan, pela estrutura e por me possibilitar tantos anos maravilhosos, tardes de contemplação da natureza e por ser uma referência de instituição atualmente: o meu muito obrigada.

À USP, ao Instituto de Química, e em especial a todos os professores, amigos e funcionários da pós-graduação em Bioquímica: obrigada pelos aprendizados compartilhados e pela oportunidade de participar da sua história.

*“Pondes amor em tudo o que fazes,
E as coisas terão sentido”.*
Santo Agostinho

RESUMO

Costa, C.B. **Venenos de serpentes do gênero *Bothrops*: impacto da glicosilação na complexidade dos proteomas e função de toxinas**. 2022. 188p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A variabilidade estrutural é uma característica das proteínas de venenos de serpentes, e a glicosilação é uma das principais modificações pós-traducionais que contribui para a diversificação de seus proteomas. Recentes estudos de nosso grupo demonstraram que venenos do gênero *Bothrops* são marcadamente definidos pelo seu conteúdo de glicoproteínas, e que a maioria das estruturas de *N*-glicanos dos tipos híbrido e complexo identificados em oito venenos deste gênero contêm unidades de ácido siálico. Em paralelo, em glicoproteínas do veneno de *B. cotiara* foi identificada a presença de uma estrutura de *N*-acetilglicosamina bissecada. Assim, com o objetivo de investigar a variação do conteúdo de glicoproteínas, assim como os mecanismos envolvidos na geração dos diferentes venenos de *Bothrops*, neste estudo foram analisados comparativamente os glicoproteomas de nove venenos do gênero *Bothrops* (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*). As abordagens glicoproteômicas envolveram cromatografia de afinidade e ensaio de *pull-down* utilizando, respectivamente, as lectinas SNA (aglutinina de *Sambucus nigra*) e MAL I (lectina de *Maackia amurensis*), que mostram afinidade por unidades de ácido siálico nas posições, respectivamente, $\alpha 2,6$ e $\alpha 2,3$; e cromatografia de afinidade com a lectina PHA-E (eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*), que reconhece *N*-acetilglicosamina bissecada. Ainda, eletroforese de proteínas, *blot* de lectina, e identificação de proteínas por espectrometria de massas foram empregadas para caracterizar os glicoproteomas. As lectinas geraram frações dos venenos enriquecidas de diferentes componentes, onde as principais classes de glicoproteínas identificadas foram metaloprotease, serinoprotease, e L-amino ácido oxidase, além de outras enzimas pouco abundantes nos venenos. Os diferentes conteúdos de proteínas reconhecidas por essas lectinas, com especificidades distintas, ressaltaram novos aspectos da variabilidade dos subproteomas de glicoproteínas desses venenos, dependendo da espécie. Ainda, considerando que metaloproteases e serinoproteases são componentes abundantes nesses venenos e fundamentais no quadro de envenenamento botrópico, e que estas enzimas contêm diversos sítios de glicosilação, o papel das unidades de ácido siálico na atividade proteolítica das mesmas foi avaliado. Assim, a remoção enzimática de ácido siálico (i) alterou o padrão de gelatinólise em zimografia da maioria dos venenos, (ii) diminuiu a atividade proteolítica de alguns venenos sobre o fibrinogênio e a atividade coagulante do plasma humano de todos os venenos, e (iii) alterou o perfil de hidrólise de proteínas plasmáticas pelo veneno de *B. jararaca*, indicando que este carboidrato pode desempenhar um papel na interação das proteases com seus substratos proteicos. Em contraste, o perfil da atividade amidolítica dos venenos não se alterou após a remoção de ácido siálico e incubação com o substrato Bz-Arg-pNA, indicando que ácido siálico não é essencial em *N*-glicanos de serinoproteases atuando sobre substratos não proteicos. Em conjunto, esses resultados expandem o conhecimento sobre a variabilidade de proteomas de venenos do gênero *Bothrops* e apontam a importância das cadeias de carboidratos contendo ácido siálico nas atividades enzimáticas das proteases desses venenos.

Palavras-chave: ácido siálico, *Bothrops*, espectrometria de massas, glicoproteômica, proteólise, veneno de serpente.

ABSTRACT

Costa, C.B. ***Bothrops* snake venoms: impact of glycosylation on the complexity of proteomes and toxins function.** 2022. 188p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry: Institute of Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Structural variability is a feature of snake venom proteins, and glycosylation is one of the main post-translational modifications that contributes to the diversification of venom proteomes. Recent studies by our group have shown that *Bothrops* venoms are markedly defined by their glycoprotein content, and that most hybrid and complex *N*-glycan structures identified in eight venoms of this genus contain sialic acid units. In parallel, the presence of a bisected *N*-acetylglucosamine structure was identified in *B. cotiara* venom glycoproteins. Thus, with the aim of investigating the variation in the content of glycoproteins, as well as the mechanisms involved in the generation of different *Bothrops* venoms, in this study the glycoproteomes of nine *Bothrops* venoms (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) were comparatively analyzed. The glycoproteomic approaches involved affinity chromatography and pulldown using, respectively, the lectins SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) and MAL I (*Maackia amurensis* lectin), which show affinity for sialic acid units at positions, respectively, α 2,6 and α 2,3, and affinity chromatography with PHA-E (*Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin), which recognizes bisected *N*-acetylglucosamine. In addition, protein electrophoresis, lectin blot, and protein identification by mass spectrometry were employed for glycoproteome characterization. The lectins generated venom fractions enriched with different components, where the main classes of glycoproteins identified were metalloprotease, serine protease, and L-amino acid oxidase, in addition to other low abundant enzymes. The different contents of proteins recognized by these lectins of distinct specificities highlighted new aspects of the variability of the glycoprotein subproteomes of these venoms, depending on the species. Furthermore, considering that metalloproteases and serine proteases are abundant components of these venoms and essential in *Bothrops* envenomation, and that these enzymes contain several glycosylation sites, the role of sialic acid units in their proteolytic activities was evaluated. Thus, enzymatic removal of sialic acid (i) altered the pattern of gelatinolysis in zymography of most venoms, (ii) decreased the proteolytic activity of some venoms on fibrinogen and the clotting activity of human plasma of all venoms, and (iii) altered the hydrolysis profile of plasma proteins by *B. jararaca* venom, indicating that this carbohydrate may play a role in the interaction of proteases with their protein substrates. In contrast, the profile of amidolytic activity of the venoms did not change after removal of sialic acid and incubation with the substrate Bz-Arg-pNA, indicating that sialic acid is not essential in *N*-glycans of serine proteases acting on small substrates. Together, these results expand the knowledge about the variability of proteomes of *Bothrops* venoms and point to the importance of carbohydrate chains containing sialic acid in the enzymatic activities of venom proteases.

Keywords: *Bothrops*, glycoproteomics, mass spectrometry, proteolysis, sialic acid, snake venom.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação do sistema de inoculação de veneno da família Viperidae (A) e a distribuição geográfica das espécies do gênero *Bothrops* no Brasil (B).....27
- Figura 2.** Representação gráfica das modificações pós-traducionais que contribuem para a variabilidade das proteínas de venenos de serpentes (A) e representação das estruturas celulares nas quais ocorrem as etapas de *N*- e *O*-glicosilação, os precursores e estruturas obtidas em cada etapa de produção dos glicanos, assim como os principais *cores* de cada glicano, representados em azul claro (B).....33
- Figura 3.** Níveis hierárquicos de complexidade das estruturas de glicanos a partir dos ácidos siálicos presentes nas porções terminais e sua contribuição para a micro- e macro-heterogeneidade de glicoproteínas.....38
- Figura 4.** Ilustração das etapas do ensaio de *pull down* realizado entre a lectina MAL I biotinizada e venenos do gênero *Bothrops*.....46
- Figura 5.** Ilustração do experimento realizado com *pool* de plasma humano e o veneno de *B. jararaca* não tratado e tratado com neuraminidase.....58
- Figura 6.** Perfis das cromatografias de afinidade usando a lectina *Sambucus nigra* aglutinina (SNA) imobilizada em agarose e venenos do gênero *Bothrops*.....62
- Figura 7.** Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) de venenos do gênero *Bothrops* (10 µg) submetidos à cromatografia de afinidade em resina de SNA-agarose.....64
- Figura 8.** Representação gráfica da distribuição de proteínas identificadas nas frações retidas nas cromatografias de afinidade de SNA-agarose com venenos do gênero *Bothrops*.....66
- Figura 9.** Intersecções de proteínas identificadas nas frações de venenos de *Bothrops* retidas na resina de SNA-agarose.....67
- Figura 10.** Perfis das cromatografias de afinidade usando a lectina *Phaseolus vulgaris* eritroaglutinina (PHA-E) imobilizada em agarose e venenos do gênero *Bothrops*.69
- Figura 11.** Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) de venenos do gênero *Bothrops* (10 µg) submetidos à cromatografia de afinidade em resina de PHA-E-agarose.....71
- Figura 12.** Representação gráfica da distribuição das proteínas identificadas nas frações retidas nas cromatografias de afinidade de PHA-E-agarose com venenos do gênero *Bothrops*.....73
- Figura 13.** Intersecções de proteínas identificadas nas frações de venenos de *Bothrops* retidas na resina de PHA-E-agarose.....74
- Figura 14.** Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras dos venenos de *B. jararaca* e *B. cotiara* obtidas em ensaio de *pull down* utilizando a lectina MAL I.....76
- Figura 15.** Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras dos venenos de *B. insularis* e *B. fonsecai* obtidas em ensaio de *pull down* utilizando a lectina MAL I.....76
- Figura 16.** Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras dos venenos de *B. mojeni*, *B. neuwiedi* e *B. atrox* obtidas em ensaio de *pull down* utilizando a lectina MAL I..... 77
- Figura 17.** Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras dos venenos de *B. erythromelas* e *B. jararacussu* obtidas em ensaio de *pull down* utilizando a lectina MAL I.....77
- Figura 18.** Representação gráfica da distribuição de proteínas identificadas nas frações enriquecidas em ensaio de *pull down* entre a lectina MAL I e venenos do gênero *Bothrops*.....79
- Figura 19.** Intersecções de proteínas identificadas nas frações enriquecidas em ensaio de *pull down* entre a lectina MAL I e venenos de *Bothrops*.....80

Figura 20. Representação gráfica de radar da distribuição das proteínas de venenos do gênero <i>Bothrops</i> enriquecidas pelas lectinas SNA (A), PHA-E (B) e MAL I (C), de acordo com os venenos nos quais estas foram identificadas.....	81
Figura 21. Diagrama de <i>Venn</i> ilustrando os grupos de proteínas compartilhadas e exclusivamente identificadas nas frações enriquecidas pelas lectinas SNA, PHA-E e MAL I considerando todos os venenos do gênero <i>Bothrops</i> analisados.....	82
Figura 22. Representação gráfica dos agrupamentos hierárquicos de venenos do gênero <i>Bothrops</i> de acordo com a composição dos subproteomas pelo enriquecimento por cromatografia de afinidade com a lectina SNA, considerando todas as proteínas identificadas.....	89
Figura 23. Representação gráfica dos agrupamentos hierárquicos de venenos do gênero <i>Bothrops</i> de acordo com a composição dos subproteomas pelo enriquecimento por cromatografia de afinidade com a lectina PHA-E, considerando todas as proteínas identificadas.....	91
Figura 24. Representação gráfica dos agrupamentos hierárquicos de venenos do gênero <i>Bothrops</i> de acordo com a composição dos subproteomas pelo enriquecimento por ensaio de <i>pull down</i> com a lectina MAL I, considerando todas as proteínas identificadas.....	93
Figura 25. Representação gráfica dos agrupamentos hierárquicos de venenos do gênero <i>Bothrops</i> de acordo com a composição dos subproteomas pelo enriquecimento com as lectinas SNA, PHA-E e MAL I, considerando todas as proteínas identificadas.....	95
Figura 26. Ensaio de <i>blot</i> de lectina para detectar a presença de ácido siálico em proteínas de venenos do gênero <i>Bothrops</i> utilizando as lectinas SNA e MAA marcadas com digoxigenina.....	97
Figura 27. Ensaio de <i>blot</i> de lectina para detectar a presença da estrutura <i>bisecting</i> GlcNAc em proteínas de venenos do gênero <i>Bothrops</i> utilizando a lectina PHA-E biotinizada.....	98
Figura 28. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) de venenos do gênero <i>Bothrops</i> (10 µg) tratados ou não com a enzima neuraminidase.....	99
Figura 29. Ensaio de <i>blot</i> de lectina para avaliar a eficiência da remoção de resíduos de ácido siálico de proteínas de venenos do gênero <i>Bothrops</i> , utilizando a lectina MAA marcada com digoxigenina.....	100
Figura 30. Atividade gelatinolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i> não tratados e tratados com neuraminidase, avaliada por zimografia.....	101
Figura 31. Atividade gelatinolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i>	102
Figura 32. Atividade amidolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i> , não tratados e tratados com neuraminidase, sobre o substrato Bz-Arg-pNA.....	104
Figura 33. Atividade fibrinogenolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i> não tratados e tratados com neuraminidase. A atividade fibrinogenolítica específica é expressa em U/min/mg.....	105
Figura 34. Atividade fibrinogenolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i> não tratados e tratados com neuraminidase. Fibrinogênio humano foi incubado com os venenos na proporção enzima: substrato 1:500, por 30 min a 37 °C.....	106
Figura 35. Atividade coagulante de venenos do gênero <i>Bothrops</i> não tratados e tratados com neuraminidase.....	108
Figura 36. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) do plasma humano após incubação com o veneno não tratado (<i>B. jararaca</i> Controle- JAC-1,2,3) e tratado (<i>B. jararaca</i> Tratado-JAT-1,2,3) com neuraminidase; do plasma incubado com PBS (Controle 1 - A-B-C) e do plasma incubado com neuraminidase (Controle 2- A-B-C).....	110
Figura 37. Diagramas de <i>Venn</i> ilustrando os números de peptídeos e proteínas identificados por LC-MS/MS nas frações de plasma humano incubado com veneno de <i>B. jararaca</i> não tratado e tratado com neuraminidase.....	112

Figura 38. Comparação da sequência de aminoácidos da cadeia α do fibrinogênio humano indicando os produtos de clivagem (peptídeos) gerados após a incubação do plasma com o veneno de <i>B. jararaca</i> não tratado (JAC 1,2,3) e tratado (JAT 1,2,3) com neuraminidase.....	116
Figura 39. Comparação da sequência de aminoácidos da protrombina humana indicando os produtos de clivagem (peptídeos) gerados após a incubação do plasma com o veneno de <i>B. jararaca</i> não tratado (JAC 1,2,3) e tratado (JAT 1,2,3) com neuraminidase.....	117
Figura 40. <i>Motiv</i> de ligação da lectina SNA (retângulo tracejado) em um <i>N</i> -glicano do tipo complexo biantenado terminando com o determinante mínimo definido por Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc, conforme reportado por Smith e colaboradores.....	123
Figura 41. Esquema das vias fisiológicas de coagulação sanguínea/fibrinólise e de agregação plaquetária nas quais ocorrem a ação das SVSPs.....	138
Figura 42. Resumo das principais ideias sugeridas sobre o papel de resíduos de ácido siálico em proteases isoladas de venenos de serpentes e humanas.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cromatografias de afinidade usando a resina SNA-agarose e venenos do gênero <i>Bothrops</i> . Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.....	63
Tabela 2. Distribuição dos grupos de proteínas identificados nas frações de venenos do gênero <i>Bothrops</i> retidas nas cromatografias de afinidade na resina de SNA-agarose.....	65
Tabela 3. Cromatografias de afinidade usando a resina PHA-E-agarose e venenos do gênero <i>Bothrops</i> . Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.....	70
Tabela 4. Distribuição dos grupos de proteínas identificados nas frações de venenos do gênero <i>Bothrops</i> retidas nas cromatografias de afinidade na resina de PHA-E-agarose, de acordo com a classe de toxina.....	72
Tabela 5. Número de grupos de proteínas identificados a partir do ensaio de <i>pull down</i> entre MAL I e venenos do gênero <i>Bothrops</i>	78
Tabela 6. Lista de 102 proteínas únicas identificadas nas frações de nove venenos do gênero <i>Bothrops</i> enriquecidas pelas lectinas SNA, PHA-E e MAL I.....	83
Tabela 7. Atividade gelatinolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i> não tratados e tratados com neuraminidase.....	103
Tabela 8. Dose mínima coagulante (DMC) de venenos do gênero <i>Bothrops</i> sobre o plasma humano.....	107
Tabela 9. Dose mínima coagulante (DMC) de venenos do gênero <i>Bothrops</i> submetidos ou não à dessialilação enzimática com neuraminidase.....	109
Tabela 10. Proteínas do plasma humano identificadas como clivadas a partir da análise por LC-MS/MS da fração de peptídeos após a incubação com o veneno de <i>B. jararaca</i> não tratado (JAC) e tratado (JAT) com neuraminidase. Apenas as proteínas identificadas a partir dos peptídeos comuns às incubações independentes (JAC1-3 e JAT1-3) foram consideradas.....	114
Tabela 11. Resumo do efeito da remoção de ácido siálico sobre as atividades amidolítica e proteolítica de venenos de <i>Bothrops</i>	134
Tabela 12. Enzimas proteolíticas isoladas de venenos de serpente nas quais foi descrita a presença de resíduos de ácido siálico, e a avaliação de seu papel na atividade proteolítica.....	136

LISTA DE ABREVIACÕES

5'-Nase: 5'-nucleotidase
ADAM: *A Disintegrin And Metalloprotease*
ADAMTS: *A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs*
APase: aminopeptidase
BACE1: *beta-secretase enzyme 1*
BPP: *bradykinin-potentiating peptide*
Bz-Arg-pNA: *Benzoyl-DL-Arginine- p-Nitroanilina*
CAAE: Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CG: Complexo de Golgi
CID: *Collision Induced Dissociation*
CLP: *C-type lectin-like protein*
Con A: Concanavalin A
CPase: carboxipeptidase
CRISP: *cysteine-rich secretory protein*
CTL: *C-type lectin/C-type lectin-like*
CVF: cobra venom factor
Da: Dalton
DCIR2: Dendritic Cell Inhibitory Receptor 2
DDA: *Data Dependent Acquisition*
DMC: Dose Mínima Coagulante
DPase: dipeptidase
DPP IV: Dipeptidyl Peptidase-4
DRC: Domínio de reconhecimento de carboidrato
DTT: ditioneitol
FDR: *False Discovery Rate*
FTMS: *Fourier Transform mass spectrometry*
GAL: Galactose
GalNAc: N-Acetil-galactosamina
GCT: *glutaminyl-peptide cyclotransferase*
GlcNAc: N-Acetil-glicosamina
GLP-1: *Glucagon-like peptide 1*
GM2-A: *Ganglioside GM2 activator*
GPX: Glutathion peroxidase
HCD: *Higher-energy C-trap dissociation*
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfônico
Hex: hexosamina
HexNAc: N-acetil-hexosamina
Hyal: *Hyaluronidase*
Hyl: hidroxilisina
Hyp: hidroxiprolina
IAA: iodoacetamida
Kdn: *Keto-3-deoxynonulosonic-acid*
LAAO: *L-amino acid oxidase*
L-BAPNA: *N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide*
LC: *Liquid chromatography*
LC-MS/MS: *Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry*
LTQ: *linear trap quadrupole*
m/z: razão massa/carga

MAA: *Maackia amurensis* aglutinina (mistura de MAL I e MAL II)
MAL I: *Maackia amurensis* leukoagglutinina
MAL II/MAH: *Maackia amurensis* hemagglutinina
Man: Manose
MMP: metaloproteases de matriz
MS: *Mass spectrometry*
Neu5Ac: ácido N-acetilneuraminico
Neu5Gc: ácido N-glicolilneuraminico
NEVAS: Núcleo Estratégico de Venenos e Antivenenos
OT: Outros
PBS: *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato-salina)
PDE: *phosphodiesterase*
PDF: produtos de degradação do fibrinogênio
PHA-E: *Phaseolus vulgaris* eritroagglutinina
PL: *phospholipase*
PLA2: *phospholipase A2*
PLB: *phospholipase B*
PLI: *Phospholipase A2 Inhibitor*
ppm: partes por milhão
RE: Retículo endoplasmático
RIP II: *ribosome-inactivating protein-II*
RVV-V: *factor V activating enzyme from Russell's viper venom*
RVV-X: *factor X activating enzyme from Russell's viper venom*
SDB:XC: Discos do polímero estirenodivinilbenzeno
SDS: *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SNA: *Sambucus nigra* aglutinina
SVMP: *snake venom metalloprotease*
svNGF: *snake venom nerve growth factor*
SVSP: *snake venom serine protease*
svVEGF: *snake venom vascular endothelial growth factor*
svVNN2: *Vascular non-inflammatory molecule 2*
TAME: *N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester*
TBS: *Tris-HCl Buffered Saline* (tampão tris-salina)
TCA: Ácido tricloroacético
TFA: Ácido trifluoroacético
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano
WGA: *Wheat germ* aglutinina

LISTA DE SÍMBOLOS

 **GlcNAc**

 **GalNAc**

 **Glc**

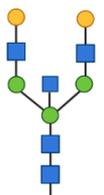
 **Man**

 **Gal**

 **Neu5Ac**

 **NeuGc**

 **Fucose**

 *Bisecting* GlcNAc

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	26
1.2 Composição de venenos de serpentes viperídeas	28
1.3 Modificações pós-traducionais: importante fonte de variabilidade em venenos de serpentes.....	31
1.4 O gênero <i>Bothrops</i> e a variabilidade de seus proteomas de venenos	39
2. OBJETIVOS.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Venenos.....	42
3.2 Obtenção do plasma humano	42
3.3 Quantificação de proteínas	42
3.4 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida	42
3.5 Análise dos glicoproteomas de venenos do gênero <i>Bothrops</i>	43
3.5.1 Cromatografia de afinidade por lectinas	43
3.5.1.1. <i>Sambucus nigra</i> aglutinina (SNA)	43
3.5.1.2. <i>Phaseolus vulgaris</i> eritroaglutinina (PHA-E)	44
3.5.2. Ensaio de <i>pull down</i> de <i>Maackia amurensis</i> leucoaglutinina (MAL I) com venenos do gênero <i>Bothrops</i>	45
3.5.3. Digestão tripsínica de proteínas	47
3.5.3.1. Digestão tripsínica em solução.....	47
3.5.3.2. Digestão tripsínica em gel	48
3.5.4. Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	49
3.5.4.1. LC-MS/MS.....	49
3.5.4.2. Análise bioinformática	50
3.5.5. Comparação de sub-proteomas de proteínas de venenos do gênero <i>Bothrops</i> reconhecidas por lectinas	51
3.5.6. Detecção de glicoproteínas por <i>blot</i> de lectina.....	52
3.6. Efeito da remoção enzimática de ácido siálico na atividade proteolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i>	53
3.6.1. Reação de dessialilação de glicoproteínas.....	53
3.6.2. Avaliação da remoção de ácido siálico pela neuraminidase	53
3.6.3. Atividade gelatinolítica	54
3.6.3.1. Análise por incubação em solução	54
3.6.3.2. Análise por zimografia.....	54

3.6.4. Atividade amidolítica	54
3.6.5. Atividade fibrinogenolítica.....	55
3.6.5.1. Análise por incubação em solução	55
3.6.5.2. Análise da hidrólise do fibrinogênio por eletroforese	55
3.6.6. Atividade coagulante.....	56
3.6.7. Análise estatística.....	56
3.6.8. Efeito da remoção de resíduos de ácido siálico na atividade proteolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> sobre o plasma humano	57
3.6.8.1. Reação de dessialilação de glicoproteínas.....	57
3.6.8.2. Incubação do plasma com o veneno dessialilado	57
3.6.8.3. Análise da fração peptídica do plasma	58
3.6.8.3.1. Preparação da fração peptídica para identificação	58
3.6.8.3.2. LC-MS/MS.....	59
3.6.8.3.3. Análise bioinformática	59
4. RESULTADOS	60
4.1. Análise de glicoproteomas de venenos do gênero <i>Bothrops</i>	60
4.1.1. Cromatografia de afinidade: <i>Sambucus nigra</i> aglutinina (SNA)	60
4.1.1.1. Identificação de proteínas.....	65
4.1.2. Cromatografia de afinidade: <i>Phaseolus vulgaris</i> eritroaglutinina (PHA-E)	68
4.1.2.1. Identificação de proteínas.....	72
4.1.3. Ensaio de <i>pull down</i> da lectina <i>Maackia Amurensis</i> leucoaglutinina (MAL I) com venenos do gênero <i>Bothrops</i>	75
4.1.4. Comparação de sub-proteomas de venenos do gênero <i>Bothrops</i>	80
4.1.5. Detecção de glicoproteínas por <i>blot</i> de lectina.....	96
4.2. Efeito da remoção enzimática de ácido siálico na atividade proteolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i>	99
4.2.1. Reação de dessialilação de glicoproteínas.....	99
4.2.2. Atividade gelatinolítica	100
4.2.2.1. Análise por zimografia de gelatina.....	100
4.2.2.2. Análise por incubação em solução	101
4.2.3. Atividade amidolítica	103
4.2.4. Atividade fibrinogenolítica.....	104
4.2.4.1. Análise por incubação em solução	104
4.2.4.2. Análise da hidrólise do fibrinogênio por eletroforese	105
4.2.5. Atividade coagulante sobre o plasma humano	107
4.2.6. Avaliação do papel do ácido siálico na atividade proteolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> sobre o plasma humano	110
4.2.6.1. Perfil eletroforético do plasma humano incubado com o veneno	110

4.2.6.2. Análise das frações peptídicas do plasma humano incubado com o veneno....	111
5. DISCUSSÃO	118
5.1 Subproteomas de proteínas de venenos de <i>Bothrops</i> com afinidade por lectinas que reconhecem ácido siálico (SNA e MAL)	118
5.2. Subproteomas de proteínas de venenos de <i>Bothrops</i> com afinidade por lectina que reconhece <i>bisecting</i> GlcNAc (PHA-E)	125
5.3. Comparação dos subproteomas de proteínas de venenos de <i>Bothrops</i> enriquecidas pelas lectinas SNA, MAL e PHA-E	129
5.4. Efeito da remoção enzimática de ácido siálico na atividade proteolítica de venenos do gênero <i>Bothrops</i>	133
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
8. ANEXO	177

1. INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes do gênero *Bothrops*

A superfamília Colubroidea, da ordem Squamata, é composta por serpentes que apresentam uma extensa história evolutiva e ampla distribuição geográfica^{1,2}. O grupo de serpentes classificadas como “*Advanced snakes*” inclui quatro principais famílias que abrangem importantes espécies venenosas (Viperidae, Elapidae, Atractaspididae e Colubridae)³, as quais estão envolvidas na maior parte dos acidentes ofídicos reportados na atualidade⁴.

Os acidentes por picadas de serpentes têm causado muitas mortes e lesões permanentes em todo o mundo, tornando-se um problema de saúde pública global⁵. Recentemente classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada de importante prioridade, o envenenamento ofídico tem afetado em média de 1 a 2 milhões de pessoas a cada ano, impactando principalmente países tropicais e em desenvolvimento⁶.

Abordar de forma abrangente os acidentes ofídicos, requer tanto a compreensão do contexto ecológico no qual as serpentes se encontram (considerando seu comportamento, habitat e distribuição geográfica)⁴, quanto avaliar a composição e a variabilidade dos venenos desses animais⁷.

Dentre as serpentes que compreendem o grupo de importância médica (famílias Atractaspididae, Elapidae e Viperidae), as viperídeas destacam-se por apresentarem um aparato de inoculação de veneno muito desenvolvido, no qual a estrutura craniana, músculos compressores e presas frontais especializadas (dentição solenóglifa) possibilitam liberar o veneno para o interior dos tecidos de forma eficiente, induzindo a uma morte rápida nas presas⁸ (Figura 1A).

Nas Américas Central e do Sul, a maioria das serpentes peçonhentas e que causam acidentes ofídicos pertencem à família Viperidae^{9,10} e, particularmente no Brasil, o gênero *Bothrops* é responsável por mais de 80% dos acidentes por picadas por serpentes, sendo classificado como um grupo de importante relevância médica^{11,12}.

A distribuição geográfica das espécies de *Bothrops* no território brasileiro é bem diversificada, e algumas se destacam por abrangerem grande extensão territorial, como é o caso da *B. moojeni* nas regiões Centro Oeste, Nordeste e Sudeste, *B. atrox* nas regiões da floresta amazônica, e *B. jararaca* encontrada desde o sudeste da Bahia até nordeste do Rio Grande do Sul ^{11,13,14}. Outras estão restritas a certos biomas ou localidades, como a *B. insularis*, presente apenas na Ilha da Queimada Grande, no litoral de São Paulo (Figura 1B).

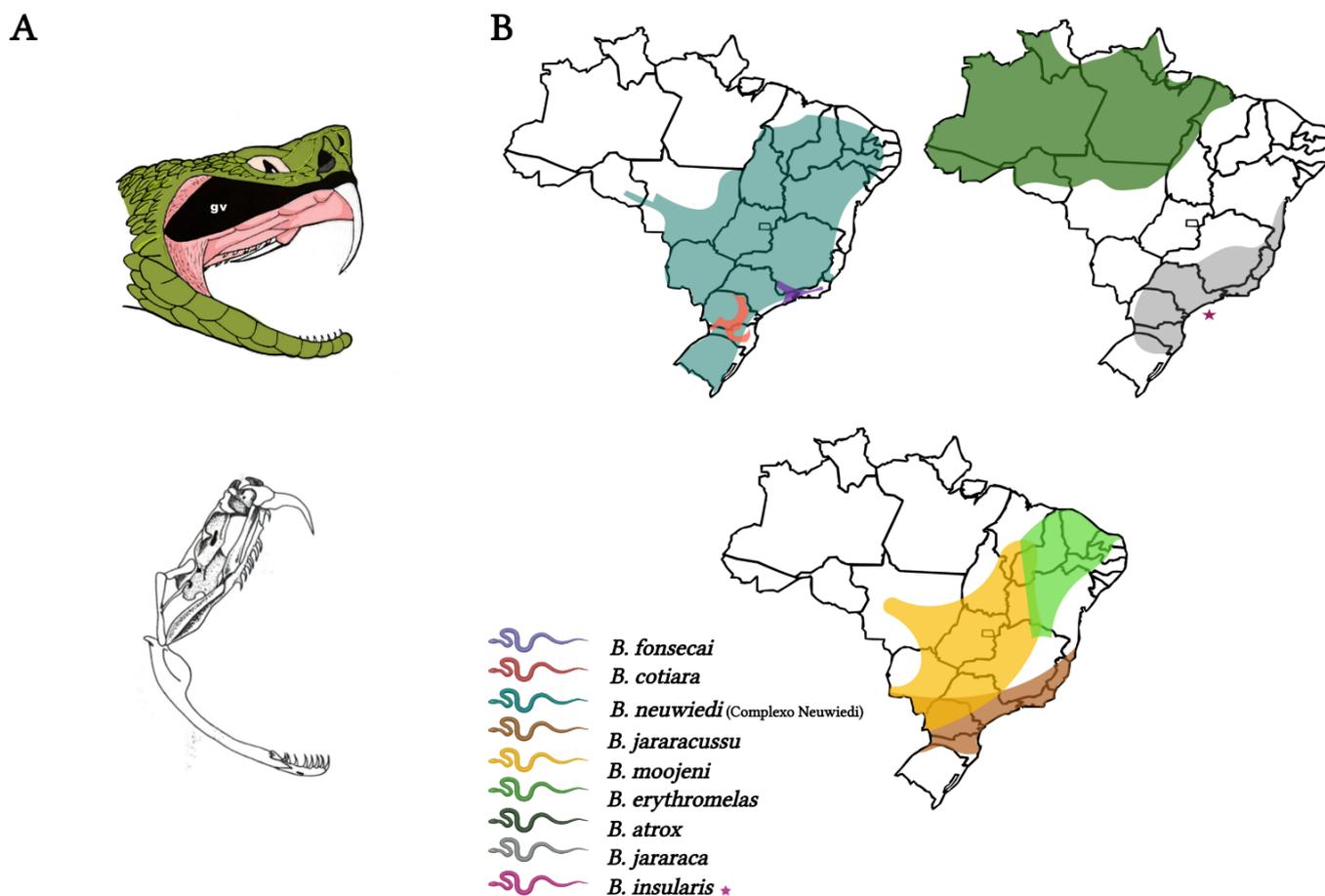


Figura 1. Representação do sistema de inoculação de veneno da família Viperidae (A) e a distribuição geográfica das espécies do gênero *Bothrops* no Brasil (B). O aparato de inoculação de veneno constitui-se da glândula principal de veneno (gv) e da dentição especializada solenóglifa, na qual dentes grandes, agudos e ocos permitem a inoculação eficiente do veneno na presa, enquanto a estrutura craniana permite amplos movimentos através da rotação da maxila em torno de sua articulação pré-frontal. Mapas adaptados de Melgarejo e colaboradores¹¹ e Nogueira e colaboradores¹³. Figura baseada em Melgarejo e colaboradores¹¹.

Há ainda as espécies consideradas endêmicas, como a *B. erythromelas*, *B. neuwiedi* e *B. fonsecai*, com distribuição mais restritas às regiões de Caatinga, mata atlântica e florestas de araucárias, respectivamente ¹³.

A maioria das espécies de *Bothrops* habitam florestas, mas algumas são encontradas exclusivamente em tipos de vegetação mais abertas¹⁴. O gênero compreende espécies exclusivamente terrestres (por exemplo, *B. neuwiedi*), além de várias outras que possuem hábitos semi-arbóreos (*B. jararaca*)¹⁵.

Quanto à hábitos alimentares, as espécies do gênero *Bothrops* são, em sua maioria, de dieta generalista, enquanto outras mostram preferência por presas específicas (especialistas). Algumas espécies mostram mudanças ontogenética em relação à alimentação, ou seja, passam de presas ectotérmicas para endotérmicas¹⁵ e diversos estudos que avaliam a composição dos venenos dessas serpentes têm reportado variabilidade não apenas associadas à idade das serpentes¹⁶⁻²⁰, como também à origem geográfica, habitat, variação sazonal e o sexo, dentro de uma mesma espécie²¹⁻²³.

Com relação às espécies botropóides, muitos estudos de classificação considerando a morfologia, a filogenia e a taxonomia têm sido realizados, porém vários desses trabalhos têm reportado diferentes resultados, o que reflete a grande diversidade dessas serpentes e sua distribuição nas Américas Central e do Sul²⁴⁻²⁷.

Diversas são as características morfológicas e da história natural das serpentes, e do ponto de vista evolutivo, o estudo da composição dos proteomas de venenos de serpentes é um recurso poderoso para compreender os mecanismos que regulam a adaptação destes animais com relação à captura e morte das presas. Mais ainda, identificar a composição dos venenos tem sido de fundamental importância na interpretação dos efeitos patológicos do envenenamento, e neste sentido, compreender os mecanismos que regem a variabilidade de toxinas presentes nos venenos pode contribuir para aprimorar o tratamento.

1.2 Composição de venenos de serpentes viperídeas

Venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas, peptídeos, aminas, carboidratos, lipídios, sal e outras pequenas moléculas²⁸⁻³⁰, que evoluíram ao longo do tempo para desempenhar um papel crítico na captura e imobilização de presas³¹.

Dentre os componentes que integram os venenos, as proteínas e os peptídeos são as principais toxinas, que atuando de forma isolada ou sinérgica, afetam processos vitais da presa, sendo os principais componentes responsáveis pelos efeitos patológicos observados nos quadros de envenenamento³²⁻³⁴.

Estudos transcriptômicos e proteômicos têm demonstrado que grande parte dos venenos são compostos por componentes enzimáticos e não enzimáticos, sendo possível

restringir seu conteúdo a um pequeno número de famílias de proteínas principais. Assim, metaloproteases (SVMP, *snake venom metalloprotease*), serinoproteases (SVSP, *snake venom serine protease*), fosfolipases A2 (PLA2), e L-amino ácido oxidases (LAAO) compõem as principais toxinas enzimáticas, enquanto lectinas tipo-C (CTL), disintegrinas, proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISP, *cysteine rich secretory proteins*), fatores de crescimento, e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), são os principais componentes não enzimáticos presentes nos venenos de viperídeos.

A família das SVMPs é a mais complexa em termos de estrutura, já que é constituída por três classes de proteases, de acordo com sua organização dominial na forma madura (P-I, P-II e P-III; ³⁵). Classificadas na subfamília M12B das metaloproteases, juntamente com as proteínas ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease*) e ADAMTSs (*A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs*), as SVMPs são enzimas dependentes de zinco e que contêm várias pontes de dissulfeto ³⁶. As SVMPs são sintetizadas na forma de zimogênios e processadas por um mecanismo de *Cys-switch* para gerar a forma ativa ³⁷⁻³⁹. Além da diversidade estrutural das SVMPs, muitas proteínas desta família são conhecidas por serem potencialmente glicosiladas ⁴⁰⁻⁴². Consideradas toxinas abundantes em venenos de viperídeos, as SVMPs possuem atividade biológica comumente associada a fibrinogenólise, fibrinólise, ativação de fatores da cascata de coagulação sanguínea e inibição da agregação plaquetária, e estão envolvidas no quadro hemorrágico observado no envenenamento botrópico ^{35,43,44}.

As SVSPs também apresentam atividade proteolítica sobre componentes da cascata de coagulação sanguínea, e dos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina, levando ao desequilíbrio da hemostasia ^{45,46}. Quanto à classificação, as SVSPs integram o clã PA, família S1 (quimotripsina) ⁴⁷, e quanto à especificidade em relação ao substrato, são consideradas enzimas semelhantes à tripsina, clivando ligações peptídicas contendo Arg ou Lys na posição P1 ^{45,48}. São proteínas constituídas de uma única cadeia polipeptídica, e com massa molecular variando entre 25 e 70 kDa, a depender da extensão da glicosilação ⁴⁶.

As PLA2 são enzimas que apresentam diversas propriedades farmacológicas, como neurotoxicidade, interferência na agregação plaquetária, desestruturação da membrana celular e miotoxicidade ⁴⁹. Essas toxinas constituem uma superfamília de enzimas que hidrolisam a ligação éster na posição sn-2 da estrutura do glicerol em fosfolipídios ⁵⁰⁻⁵²; no entanto algumas PLA2 não apresentam atividade enzimática ^{53,54}.

As PLA2 são compostas por 120-125 resíduos de aminoácidos, podendo formar complexos de proteínas entre si ou com outras classes de toxinas por ligações covalentes ou não covalentes ⁵⁵.

As LAAOs são flavoproteínas que catalisam de forma estereoespecífica a desaminação oxidativa de um L-aminoácido ao seu α -cetoácido, com a correspondente liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia (NH_3) ^{56,57}. Geralmente as LAAOs apresentam massa molecular variando de 110 a 140 kDa e exibem várias atividades patológicas, incluindo indução de apoptose, edema, indução ou inibição da agregação de plaquetas, e atividades hemorrágica e anticoagulante ⁵⁸⁻⁶⁰.

As CRISPs estão relacionadas com o bloqueio de canais iônicos e modulação da inflamação ⁶¹⁻⁶³, enquanto as CTLs, proteínas que possuem um domínio funcional de reconhecimento de carboidratos (DRC), atuam ativando as plaquetas por ligação a GPVI, afetando a função plaquetária via integrina alpha2beta1 ou induzindo a ligação do fator de von Willebrand à GPIb ⁶⁴. Aqui a sigla CTL compreende dois tipos de lectinas presentes nos venenos de serpentes: as lectinas verdadeiras, que se ligam a carboidratos (*C-type lectins*; CTLs) e as proteínas semelhantes às lectinas do tipo C (*C-type lectin-like protein*; CLPs) ^{65,66}. Ambas apresentam homologia de sequência, porém as lectinas verdadeiras se apresentam como homodímeros de 26–28 kDa, enquanto as CLPs são em sua maioria heterodímeros, não possuindo a capacidade de reconhecer carboidratos, pela ausência da alça de ligação de Ca^{2+} envolvida na ligação do açúcar. Porém sabe-se que as CLPs possuem diversos alvos biológicos, e acredita-se que evoluíram para desorganizar o sistema homeostático da presa, ao ter como alvo principal, os receptores de glicoproteínas plaquetárias ^{65,67}.

Por fim, com relação aos componentes presentes em menor abundância em venenos do gênero *Bothrops*, encontram-se as nucleotidases (5'-Nase), hialuronidases (Hyal), glutaminil ciclotransferases (GCT), aminopeptidases (APases) e fatores de crescimento. Em comparação com os componentes mais abundantes, poucos estudos abrangem a complexidade destas toxinas minoritárias, porém acredita-se que essas proteínas possuam funções auxiliares, atuando em diversos contextos fisiológicos na presa ⁶⁸.

Assim, as nucleases (como fosfodiesterases, PDEs) e nucleotidases (5'-Nase ATPase e ADPase) são enzimas hidrolíticas, que apresentam como uma de suas principais funções a geração final de nucleotídeos, com consequente produção de adenosina. A adenosina auxilia na biodistribuição de toxinas contribuindo para a imobilização da presa,

enquanto aumenta a permeabilidade vascular e promove hipotensão, sedação e bradicardia^{69,70}. As hialuronidases, da mesma forma, hidrolisam o hialurano encontrado na matriz extracelular⁷¹, facilitando a difusão do veneno no tecido da vítima durante o envenenamento⁷². O fator de crescimento endotelial vascular (svVEGF), estimula a vasculogênese⁷³ enquanto o fator de crescimento de nervo (svNGF) exerce importantes efeitos sistêmicos contribuindo na vulnerabilidade tecidual e facilitando a difusão das toxinas no organismo da presa⁷⁴. Por fim, as fosfolipases B (PLB) clivam fosfolípidos na posição sn-1 e sn-2⁷⁵ enquanto as aminopeptidases (APases) atuam como exo-metalopeptidases removendo resíduos de aminoácidos terminais de proteínas e peptídeos, na presença de cálcio⁷⁶.

1.3 Modificações pós-traducionais: importante fonte de variabilidade em venenos de serpentes

A família Viperidae abriga espécies de serpentes que possuem um alto grau de especialização em seu aparato venenífero, e em especial, as glândulas produtoras de veneno no gênero *Bothrops* têm sido alvo de vários estudos⁷⁷⁻⁸²

As glândulas produtoras de venenos apresentam um lúmen central onde é armazenado o veneno produzido pelas células secretoras. Investigações sobre a produção de veneno *in vivo* demonstraram um longo ciclo de produção, no qual observou-se o aumento do volume das células secretoras, assim como alguns de componentes (retículo endoplasmático e aparelho de Golgi) e subcomponentes celulares (vesículas secretoras), reforçando a intensa atividade biossintética dessas células^{77,78}. Ainda, com relação à dinâmica da biossíntese dessas biomoléculas, foi reportado por estudos de proteômica, que a síntese de toxinas é assíncrona entre as toxinas, e que muito dessas proteínas estão presentes no chamado estágio “quiescente”, quando o lúmen permanece cheio de veneno⁷⁹.

Como a maioria das proteínas secretadas, acredita-se que as proteínas de veneno são sintetizadas no citoplasma de células secretoras na glândula, transferidas para o retículo endoplasmático rugoso, em seguida ao aparelho de Golgi, e finalmente transportadas por grânulos de secreção para o lúmen da glândula³⁵. As SVMs, proteínas sintetizadas na forma zimogênica, passam por processamento proteolítico, que, segundo Portes-Junior e colaboradores⁸⁰ aparenta ter início dentro de vesículas secretoras, e continuando no lúmen da glândula de veneno, até a secreção.

Os produtos de síntese da glândula de veneno são altamente complexos, e a manutenção da integridade proteica requer da estrutura glandular um controle fino e manutenção da homeostase dentro do lúmen³⁵. Esta etapa é altamente regulada, sendo crucial para a expressão das atividades catalíticas das proteases. Assim, tanto a presença de inibidores, quanto a manutenção do pH ácido, e a presença de alguns sais contribuem para a homeostase da glândula, e para manutenção da integridade das proteínas⁸³⁻⁸⁵.

Os desafios envolvidos na caracterização completa de venenos de serpentes estão relacionados principalmente à sua complexidade. No caso dos venenos de viperídeos, essa característica não se deve apenas ao número de diferentes classes de toxinas, mas também a várias formas de toxinas com alto grau de variabilidade na estrutura primária, resultantes da duplicação de genes⁸⁶⁻⁸⁸, de evolução acelerada, caracterizada por mutações pontuais em regiões codificadoras de mRNAs de toxinas⁸⁹⁻⁹¹, e de neofuncionalização⁹²⁻⁹⁵.

Além das diferentes classes de proteínas encontradas nos venenos e suas diversas proteoformas, existem ainda mecanismos moleculares que são responsáveis por aumentar a complexidade dos proteomas de venenos de serpentes, tais como a variação de sequência de aminoácidos em algumas regiões, e as diferentes modificações pós-traducionais, incluindo o processamento proteolítico, a oligomerização, a formação de pontes de dissulfeto e a glicosilação (Figura 2A)^{35,97}.

Estas características resultam em proteínas com propriedades biofísicas e bioquímicas variáveis dentro da mesma família de toxinas, podendo exibir diferentes atividades biológicas sobre a presa, como ilustrado, tanto para as SVMPs, que sofrem processamento proteolítico e oligomerização³⁵, quanto para as SVSPs, que apesar de apresentarem estruturas primárias semelhantes, possuem variações em níveis de glicosilação, massas moleculares, pontos isoelétricos e especificidade por substratos macromoleculares^{46,98}.

Os eventos pós-traducionais são os maiores responsáveis pela variabilidade encontrada nos proteomas das células e por isso são considerados como uma elegante ferramenta da natureza para aumentar a diversidade das proteínas, sem acessar o genoma. Muitos trabalhos têm relatado a importância das modificações pós-traducionais em proteínas, em diferentes níveis celulares,⁹⁹⁻¹⁰¹ onde os principais eventos citados de modificações sobre as proteínas são: a fosforilação, a sulfatação, o processamento por proteólise, a ligação a lipídeos e a glicosilação.

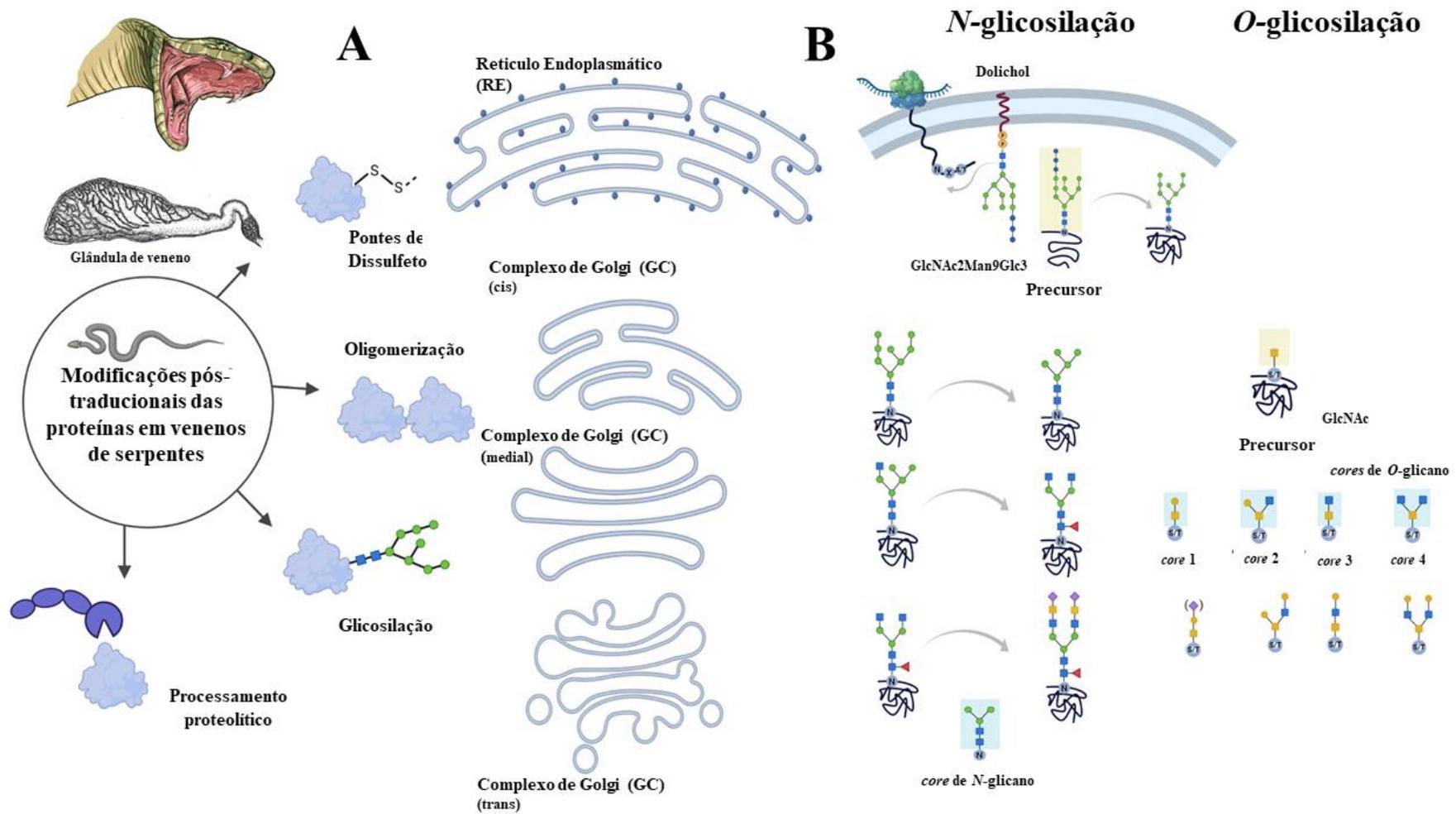


Figura 2. Representação gráfica das modificações pós-traducionais que contribuem para a variabilidade das proteínas de venenos de serpentes (A) e representação das estruturas celulares nas quais ocorrem as etapas de *N*- e *O*-glicosilação, os precursores e estruturas obtidas em cada etapa de produção dos glicanos, assim como os principais *cores* de cada glicano, representados em azul claro (B). Figura baseada em Stanley e colaboradores⁹⁶

A glicosilação de proteínas é a modificação pós-traducional mais abundante e complexa em venenos de serpentes viperídeas, afetando de forma significativa o dobramento, a conformação, a estabilidade e a farmacocinética de diversas proteínas, bem como no aumento da complexidade dos proteomas e na diversificação das funções das toxinas^{16,34,41,102-104}.

A classificação da glicosilação pode ser feita baseada na natureza da ligação química entre os resíduos específicos da proteína e os carboidratos ligantes, incluindo a *N*-glicosilação, a *O*-glicosilação, a *C*-manosilação e a fosfoglicosilação⁹⁹.

A *N*-glicosilação de proteínas extracelulares ocorre com mais frequência no resíduo de asparagina das sequências Asn-X-Ser/Thr e em casos mais raros na sequência Asn-X-C, onde X é qualquer aminoácido, exceto prolina (Pro)¹⁰⁵. A transferência dos *N*-glicanos para as proteínas ocorre no lado luminal da membrana do retículo endoplasmático (RE) durante ou após a translocação da proteína nascente (Figura 2B).

A presença de aminoácidos na posição “X”, pode tanto reduzir a eficiência da glicosilação quando o resíduo X for um aminoácido de caráter ácido (Asp ou Glu), quanto aumentar, quando presente um resíduo de Phe⁹⁶. Em geral, a *N*-glicosilação desempenha papel fundamental em muitos processos biológicos, atuando em diferentes níveis estruturais e funcionais das proteínas, tais como dobramento, estabilidade, solubilidade¹⁰⁶, proteção contra proteases¹⁰⁷, adesão celular, migração celular e transdução de sinais.

A *O*-glicosilação de proteínas intracelulares e extracelulares ocorre predominantemente na hidroxila dos resíduos de Ser e Thr, sendo também encontrada em resíduos de Tyr, hidroxilisina (Hyl) e hidroxiprolina (Hyp)¹⁰⁸. A ligação GalNAc- α -Ser/Thr está presente numa variedade de glicoproteínas presentes nos eucariotos, e os *O*-glicanos desempenham, neste contexto, importantes papéis na localização e tráfico de proteínas, em sua solubilidade e nas interações célula-célula¹⁰¹.

A biossíntese de *N*-glicanos ocorre em duas etapas, assim como em dois compartimentos celulares. A primeira fase é uma via altamente conservada que ocorre na membrana do retículo endoplasmático (RE), no qual um oligossacarídeo (GlcNAc2Man9Glc3) (Figura 2B) é montado em um transportador lipídico (Dolichol-P-P) e transferido para o resíduo selecionado de Asn (Asn-X-Ser/Thr) de uma proteína recém-sintetizada, que é translocada para o RE. A segunda fase começa com o processamento dos *N*-glicanos por glicosidases e glicosiltransferases no lúmen do RE, e finalizando no Golgi. Muitas das glicosidases e glicosiltransferases são expressas diferencialmente, sendo sensíveis ao estado fisiológico da célula^{96,109}. Dessa forma, o

resultado da glicosilação requer a ação conjunta de diversas enzimas, sem se basear em um *template*, como ocorre com o genoma e o proteoma. Quanto à *O*-glicosilação, a primeira etapa é realizada no Golgi por uma GalNAc transferase (Figura 2B), seguida por extensões e ramificações, que resultam em diferentes subtipos de glicano central ¹¹⁰.

Muitas proteínas glicosiladas têm sido descritas em proteomas de venenos, principalmente por meio da identificação de sequências consenso (*sequons*) de *N*-glicosilação, que permitem inferir a presença de sítios putativos para tal modificação covalente ¹¹¹⁻¹¹³.

Dessa forma, a utilização de técnicas adicionais que permitam enriquecer as amostras de misturas complexas de proteínas, como os venenos de serpentes, são de fundamental importância para a caracterização dos glicoproteomas; e nesse contexto as cromatografias por afinidade que utilizam lectinas com diferentes especificidades surgem como uma ótima opção para aumentar a concentração de diferentes glicoproteínas e ao mesmo tempo revelar diferenças sutis nos proteomas. Outra vantagem interessante de se utilizar a cromatografia por afinidade é que esta técnica permite recuperar todas as proteínas ligados às lectinas sem, contudo, desnaturá-las. Esse fato é de extrema importância para estudos que têm como objetivo a caracterização e a análise de atividade biológica das proteínas ⁴¹.

A presença de grandes porções de carboidratos em algumas famílias de toxinas importantes no processo de envenenamento tem motivado muitos pesquisadores a realizarem seus estudos sobre a glicosilação em toxinas purificadas ^{114,115} e assim, há poucos relatos de trabalhos sobre o perfil de glicosilação de venenos como um todo.

Gowda e Davidson ¹¹⁶ analisaram venenos de várias espécies de serpentes utilizando as lectinas MAA, SNA e DAS em experimentos de *blot*, e demonstraram que as glicoproteínas dos venenos de *Bitis arietans arietans*, *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atra* e *Bungarus fasciatus* continham tanto ácidos siálicos ligados na configuração α 2-3 e 2-6, bem como resíduos de β -galactosil.

Nawarak e colaboradores ¹¹⁷ ao analisar dez venenos de serpentes (*Bungarus multicinctus*, *B. fasciatus*, *Naja n. Atra*, *Naja n. kaouthia*, *Ophiophagus hannah*, *Vipera russelli formosensis*, *V. r. siamensis*, *Trimeresurus mucrosquamatus*, *T. stejnegeri*, e *Deinagkistrodon acutus*) utilizando glicoconjugados de lectinas marcados com isotiocianato de fluoresceína, evidenciaram que as glicoproteínas de cada veneno tinham porções diferentes de carboidratos em sua estrutura. Em outro estudo, Birrell e colaboradores ¹¹⁸ também utilizaram oito lectinas para mostrar os variáveis perfis de

glicoproteínas em venenos dos gêneros *Notechis*, *Pseudonaja*, *Austrelaps*, *Pseudechis*, *Acanthophis*, *Oxyuranus*, *Tropidechis*, *Rhinoplocephalus* e *Hoplocephalus*.

Diferente dos trabalhos relatados anteriormente, Andrade-Silva e colaboradores⁴¹, analisaram sete venenos do gênero *Bothrops* (*B. cotiara*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu*, e *B. erythromelas*) utilizando três tipos de lectinas imobilizadas em uma resina (Sephrose) para cromatografia de afinidade. A utilização dessa técnica permitiu aumentar a cobertura de glicoproteínas identificadas por espectrometria de massas nesses venenos, e seus resultados indicaram que a escolha de múltiplas lectinas é de fundamental importância para conseguir acessar em profundidade os glicoproteomas de venenos de serpentes.

Uma característica estrutural muito bem estudada sobre glicoproteínas é a presença de ácido siálico nas extremidades terminais das cadeias de carboidratos, sendo este capaz de conferir à proteína carga negativa e influenciar seu ponto isoelétrico (pI). Portanto, de acordo com a quantidade de sítios de glicosilação ocupados em uma proteína e de quantas moléculas de ácido siálico são adicionadas às cadeias de carboidrato, as glicoproteínas podem apresentar diferentes massas moleculares e pontos isoelétricos, como observado, no caso de algumas serinoproteases e LAAOs presentes em venenos viperídeos¹¹⁹⁻¹²¹, sugerindo assim que esta modificação pós-traducional pode ser usada como um fino ajuste molecular para diversificar o arsenal de toxinas. Além disso, as cadeias de carboidrato contendo ácido siálico são hidrofílicas e, portanto, podem influenciar na solubilidade da proteína, protegendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que porventura estejam presentes na superfície da proteína.

Diversas são as contribuições dos resíduos de ácido siálico e uma delas decorre da complexidade adicional oferecida por esse monossacarídeo às estruturas dos glicanos nas glicoproteínas (Figura 3). Além das diversas modificações que resíduos de ácido siálico sofrem, bem como diversas ligações nas posições terminais dos glicanos (o que os torna bem adequados para transportar informações de reconhecimento entre glicano-proteína, célula-célula e patógeno-célula), os ácidos siálicos ainda podem estar ligados a diversos carboidratos subjacentes contribuindo para a diversidade das cadeias de glicanos (Figura 3).

Com mais de 60 monossacarídeos estruturalmente diferentes, os ácidos siálicos (Sia) somam um grande subconjunto da família dos alfa-cetoácidos de nove carbonos chamados ácidos nonulosônicos¹²². Embora o ácido 5-N-acetilneuramínico (Neu5Ac) seja o ácido siálico mais comum, a família Sia é composta de estruturas que variam no

carbono C-5, incluindo o ácido 5-N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e 2-ceto-desoxi-nonulosônico (Kdn), com um grupo hidroxila em C-5 ¹²³. Diversas modificações adicionais nos ácidos siálicos são geradas pela ação enzimática, por meio de reações que ocorrem principalmente no lúmen do Golgi e organelas relacionadas, assim como em sialoglicoconjugados maduros, como exemplo a O-acetilação e a sulfatação ¹²⁴ (Figura 3, item 1).

A diversidade também resulta das diferentes formas pelas quais os ácidos siálicos estão ligados às cadeias de glicano subjacentes (Figura 3) por meio de seu carbono anomérico C-2 na configuração α , comumente às posições C-3 ou C-6 da galactose, à posição C-6 de *N*-acetilgalactosamina, ou à posição C-8 ou C-9 de outro ácido siálico. As sialiltransferases (STs) geram cada um desses tipos de ligação (Figura 3, item 2).

A maioria dos *N*-glicanos complexos e híbridos têm ramos resultantes da adição de Gal ao GlcNAc do *core* dos *N*-glicanos, produzindo o bloco de construção Gal β 1-4GlcNAc, conhecido como tipo 2 *N*-acetilactosamina (LacNAc), ou a adição de GalNAc ao GlcNAc produzindo antenas com uma extensão GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc), estruturas essas que contribuem para a diversidade dos *N*-glicanos (Figura 3, item 3).

Outro nível de variabilidade, além dos ácidos siálicos e os subsequentes carboidratos nas estruturas de glicanos, são as classes de glicanos adicionados às proteínas (Figura 3, item 4). Considerando que os glicanos são monossacarídeos ligados covalentemente por ligações glicosídicas, a forma como esses oligossacarídeos são montados compõem as classes de *N*- e *O*-glicanos. Ainda, considerando a ausência de um molde que indique os tipos de glicanos que são produzidos e seus locais específicos de ligação às proteínas, diferentes glicofomas de uma mesma proteína podem ocorrer devido à ligação de glicanos estruturalmente diferentes (microheterogeneidade), ou que podem ocupar (em diferentes graus) os sítios de glicosilação das proteínas (macroheterogeneidade) ^{125,126} (Figura 3, item 5).

A microheterogeneidade dos oligossacarídeos em um único sítio de glicosilação pode resultar da competição entre as glicosiltransferases na linha de montagem na endomembrana do RE e Complexo de Golgi; assim, a extensão da ramificação origina-se da competição das diferentes glicosaminiltransferases ¹²⁷. A variedade em suas atividades produzirá várias antenas, assim como a transferência dos glicanos, para um sítio putativo de glicosilação nem sempre pode ocorrer, devido a restrições conformacionais durante o dobramento da glicoproteína (macroheterogeneidade) ^{96,128}. Dessa forma a regulação específica da produção dos glicanos e sua transferência para as proteínas é o resultado da

combinação de muitos fatores, podendo variar entre espécies e tipos de células, de acordo com o momento metabólico e do conjunto das glicosiltransferases/glicosidases expressas durante a biossíntese do glicano.

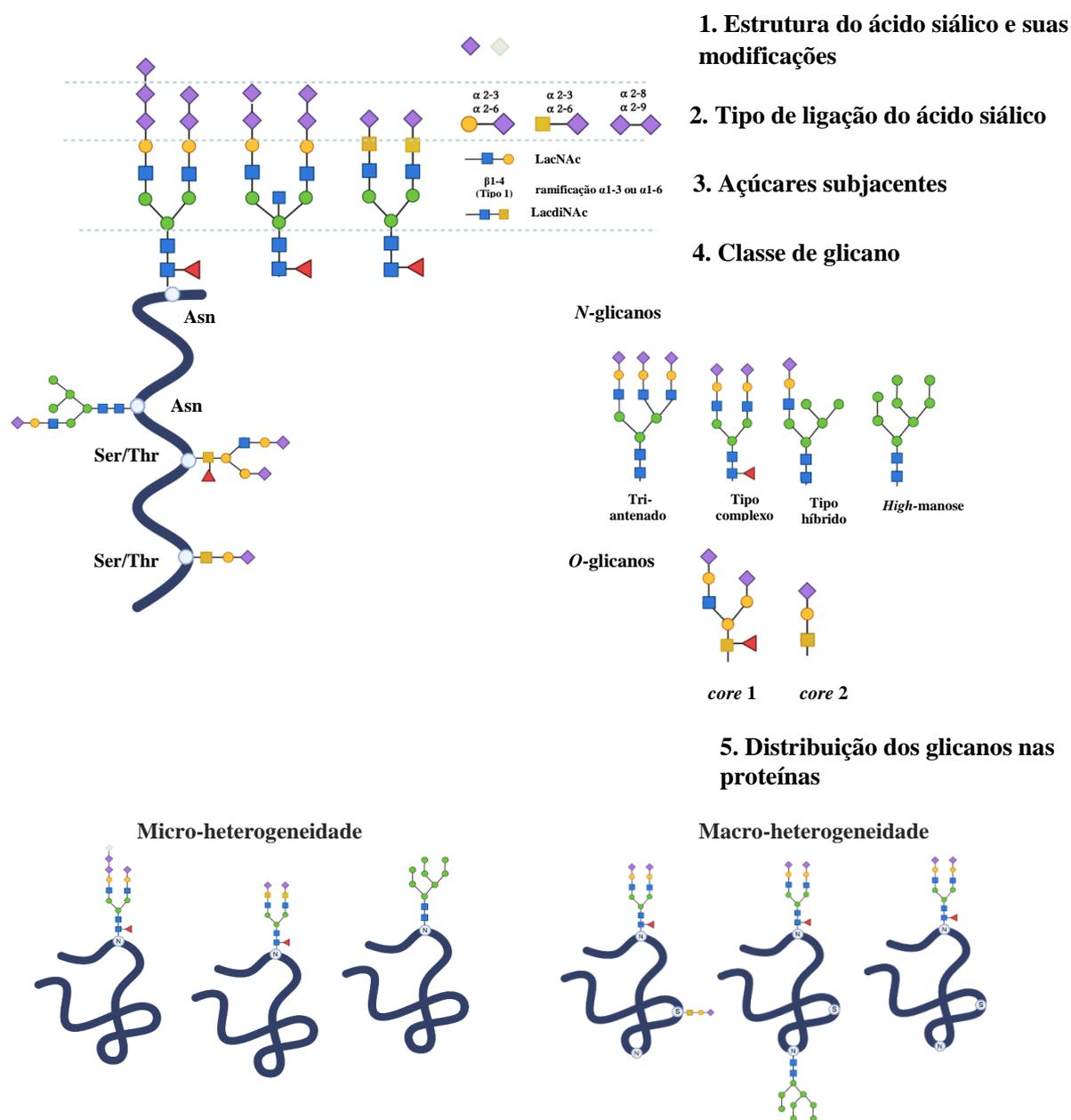


Figura 3. Níveis hierárquicos de complexidade das estruturas de glicanos a partir dos ácidos siálicos presentes nas porções terminais e sua contribuição para a micro- e macro-heterogeneidade de glicoproteínas. Figura baseada em Varky e colaboradores¹²⁴.

Os ácidos siálicos são dotados de uma rica diversidade dentro de um único monossacarídeo, do qual a evolução usou para mascarar os glicanos subjacentes, modular o ambiente biofísico e para aprimorar o reconhecimento específico por proteínas que medeiam os processos biológicos. Dessa forma, os ácidos siálicos desempenham diversas funções no organismo, podendo ter funções que não são mutuamente exclusivas^{124,129,130}.

Segundo resultados obtidos em um estudo de nosso grupo, a análise estrutural do glicoma de oito venenos de *Bothrops* (*B. alcatraz*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, e *B. neuwiedi*) revelou a presença de ácido siálico na maior parte das 52 composições de *N*-glicanos identificadas¹³¹. Somado a esse resultado, Andrade-Silva e colaboradores⁴¹ identificaram também em seu trabalho uma grande quantidade de glicoproteínas que se ligaram a uma lectina que reconhece especificamente ácido siálico (*Wheat Germ Agglutinin*), confirmando assim a presença desse epítipo na porção glicosídica das glicoproteínas de venenos de *Bothrops*, fator que deve ter contribuído para a solubilidade das proteínas e favorecido o pH levemente ácido, típico dos venenos. Lin e colaboradores¹³² observaram a importância da presença de ácido siálico no reconhecimento e nas propriedades farmacocinéticas de uma serinoprotease com alta atividade fibrinogenolítica do veneno da serpente *Deinagkistrodon acutus*. Da mesma forma, Chen e colaboradores¹³³ perceberam que os resíduos terminais de ácido siálico exercem grande influência sobre a atividade enzimática das proteases, como no caso da metaloprotease de *D. siamensis*, que mostrou uma diminuição da sua atividade sobre o fibrinogênio, após o processo de remoção de ácido siálico.

1.4 O gênero *Bothrops* e a variabilidade de seus proteomas de venenos

A composição dos venenos pode fornecer informações importantes a respeito da história evolutiva de espécies congêneres. De fato, diversos trabalhos têm utilizado abordagens proteômicas na tentativa de compreender quais os mecanismos regem a variação da composição dos venenos. Como exemplo, estudos envolvendo o veneno de *B. jararaca* mostraram a clara existência de variabilidade ontogenética e sexual^{16,85,134}, e geográfica^{135,136}. No caso de *B. atrox* há a observação de paedomorfismo, onde as características de venenos de espécimes juvenis são mantidas nos indivíduos adultos e essa diferença está intimamente relacionada as diferenças de localização geográfica do habitat¹³⁷. Outro trabalho a respeito da variabilidade entre as espécies do gênero *Bothrops*, foi realizado por Paes Leme e colaboradores¹³⁸ que objetivou a comparação dos sub-proteomas de oito espécies (*B. jararaca*, *B. cotiara*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. bilineata*, *B. erythromelas*, *B. insularis* e *B. neuwiedi*) utilizando anticorpos específicos, análise por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Para a análise dos sub-proteomas de proteínas com afinidade pela heparina foi utilizado uma cromatografia de afinidade. Por fim, um estudo bastante expressivo, foi realizado por

Sousa e colaboradores ¹³⁹ que caracterizaram os proteomas dos venenos de *Bothropoides jararaca*, *B. neuwiedi* (subespécies *B. n. pauloensis*, *B. n. matogrossensis*, *B. n. marmoratus*, *B. n. neuwiedi* e *B. n. diporus*), *Rhinocerothis alternatus*, *R. cotiara*, *Bothrops jararacussu* e *B. atrox*, reconhecendo que a classificação filogenética por si só não estava diretamente ligada à composição proteômica do veneno. Porém diferente do que foi observado por Sousa e colaboradores, Andrade-Silva e colaboradores ⁴¹ mostraram que as glicoproteínas dos venenos contribuem para a formação da assinatura proteômica de venenos sete espécies do gênero *Bothrops* analisadas, refletindo um agrupamento entre as espécies que espelhou exatamente a organização taxonômica descrita por Fenwick e colaboradores ²⁵.

Estes e outros estudos têm apontado para variabilidade significativa que ocorre em venenos de serpentes, porém as bases moleculares da variabilidade estrutural, gerada por modificações pós-traducionais, tais como a glicosilação, ainda são pouco conhecidas, assim como as relações com processos de seleção e adaptação das serpentes, e o papel de carboidratos na estabilidade e funcionalidade das toxinas.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral analisar a variabilidade dos proteomas de venenos do gênero *Bothrops* com foco em seus sub-proteomas de glicoproteínas. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1- Identificar por espectrometria de massas as glicoproteínas com afinidade pelas lectinas SNA (*Sambucus nigra* aglutinina), MAL I (*Maackia amurensis* leucoaglutinina) e PHA-E (*Phaseolus vulgaris* eritroaglutinina) presentes em venenos do gênero *Bothrops* (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*).

2- Analisar o papel do ácido siálico presente na porção de carboidratos das proteases de venenos de *Bothrops* em suas atividades enzimáticas (amidolítica, coagulante do plasma, fibrinogenolítica e gelatinolítica), assim como na degradação de proteínas do plasma humano pelo veneno de *B. jararaca*.

Estratégia experimental do estudo

Serpentes *Bothrops*

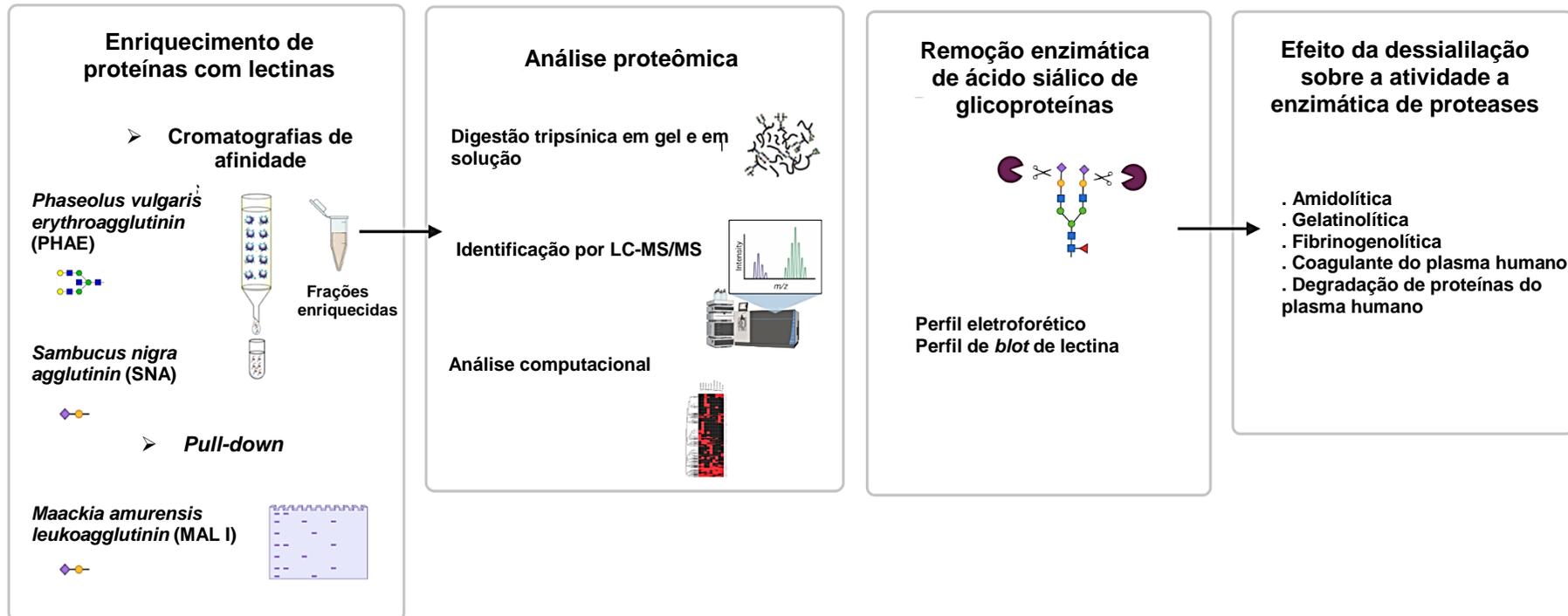
B. atrox
B. cotiara
B. erythromelas
B. fonsecai
B. insularis

B. jararaca
B. jararacussu
B. moojeni
B. neuwiedi



Venenos

Caracterização de glicoproteomas



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Venenos

Os venenos das espécies do gênero *Bothrops* utilizados neste trabalho (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) foram fornecidos na forma liofilizada pelo Núcleo Estratégico de Venenos e Antivenenos (NEVAS) do Instituto Butantan.

3.2 Obtenção do plasma humano

O uso do plasma humano foi aprovado pela Comissão de Ética Nacional em Pesquisa, conforme CAAE: 04612318.9.0000.0086. O sangue humano foi coletado de voluntários homens, saudáveis, com idade entre 20 e 30 anos, em tubo plástico contendo solução de citrato de sódio na concentração final de 0,38%, e centrifugado a 1.000 g, por 10 min, a 4 °C, para obtenção do plasma. Para o ensaio de atividade coagulante, amostras de plasma de cinco doadores foram combinadas em um *pool*. Para o ensaio de incubação de plasma com o veneno de *B. jararaca* foi utilizado um *pool* de 3 doadores. Em todos os casos, as amostras de plasma foram armazenadas a -80 °C até a utilização.

3.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas presentes nos venenos e de suas respectivas frações foi realizada utilizando o reagente de Bradford¹⁴⁰ e uma curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich).

3.4 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

Para a visualização do perfil proteico das amostras foi realizada a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%), como descrito por Laemmli¹⁴¹. Foram utilizados géis nas dimensões de 10 cm x 8 cm x 1.5 mm e um sistema de eletroforese Hoefer (GE Healthcare). As corridas eletroforéticas ocorreram à temperatura ambiente sob voltagem constante (150 V) e as proteínas foram coradas com nitrato de prata seguindo o método de (Mortz et al., 2001) ou, alternativamente, com o Coomassie Blue Coloidal [(NH₄)₂SO₄ 8%, ácido fosfórico 0,68%, Coomassie Brilliant Blue-G250 (Sigma) 0,08%, metanol 25%]. Para as análises em condições redutoras o β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) foi utilizado como agente redutor.

3.5 Análise dos glicoproteomas de venenos do gênero *Bothrops*

3.5.1 Cromatografia de afinidade por lectinas

As cromatografias de afinidade foram realizadas utilizando lectinas imobilizadas em agarose, com diferentes especificidades: *Sambucus nigra* aglutinina (SNA-agarose), que reconhece resíduos de ácido siálico na posição α 2-6 (Neu5Ac(α 2-6)Gal/ GalNAc) (Shibuya e colaboradores, 1987), e *Phaseolus vulgaris* eritroaglutinina (PHA-E-agarose), que reconhece uma estrutura de *N*-glicano do tipo complexo (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 (GlcNAc β 1-4) (GlcNAc β 1-2Man α 1-3) Man β 4) na qual um resíduo de *N*-acetilglicosamina encontra-se bissecado (*bisecting* GlcNAc)¹⁴³.

As resinas (SNA-agarose e PHA-E-agarose- Vector Laboratories) (1 mL) foram acondicionadas em seringas de 3 mL, contendo na porção inferior um disco de papel e uma fina camada de lã de vidro.

3.5.1.1 *Sambucus nigra* aglutinina (SNA)

Após o preparo das colunas cromatográficas, a resina SNA-agarose (3 mg lectina/ml gel - >1,5 mg fetuína/ml gel - capacidade de *binding*) foi pré-equilibrada em tampão HEPES salina (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM) contendo CaCl₂ 0,1 mM, pH 7,5, de acordo com as instruções do fabricante.

Para a cromatografia, amostras de veneno contendo 20 mg de proteínas (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) foram ressuspendidas em 1 mL do tampão de equilíbrio e aplicadas à coluna cromatográfica. A incubação ocorreu à temperatura ambiente por 20 min, com agitações periódicas da solução a cada 5 min por meio de perturbação do sistema bifásico manualmente, com o auxílio de pipeta. A fração de proteínas não retidas em cada cromatografia foi coletada por meio da lavagem da resina com 15 mL do tampão de equilíbrio. Durante todo o processo, houve o monitoramento da absorbância das frações eluídas, em espectrofotômetro, a 280 nm. Após a eluição das proteínas que não interagiram com a lectina, a solução comercial *Glycoprotein eluting solution for sialic acid-binding lectins* – ES-7100 (Vector Laboratories) foi aplicada para a eluição das proteínas retidas na resina, em 4 alíquotas sequenciais de 1 mL, que interagiram com a resina por 10 min.

Ao final do procedimento, duas frações foram obtidas: das proteínas não reconhecidas pela lectina (fração não retida), e das proteínas reconhecidas e retidas na resina (fração retida).

As proteínas presentes na fração retida foram concentradas e dessalinizadas por precipitação, utilizando-se uma mistura de acetona gelada e metanol. Para este procedimento foi utilizada a proporção 8:1 (v:v) de acetona:metanol, com incubação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 3 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 90 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 50 μL de tampão HEPES 10 mM, pH 8.

Ambas as frações foram submetidas à quantificação de proteínas pelo método de Bradford, avaliação do perfil eletroforético de proteínas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, digestão com tripsina (3.5.3.1) e análise por espectrometria de massas (3.5.4).

3.5.1.2 *Phaseolus vulgaris* eritroaglutinina (PHA-E)

Para a cromatografia de afinidade em suporte contendo a lectina PHA-E-agarose (3 mg lectina/ml ge l- 7,5 mg tiroglobulina/ml gel - capacidade de *binding*) utilizou-se o tampão de equilíbrio HEPES salina (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM) contendo CaCl_2 0,1 mM e MnCl_2 0,1 mM, pH 8,0. Após o condicionamento da resina, de acordo as instruções do fabricante, amostras contendo 20 mg de proteínas dos venenos do gênero *Bothrops* (como descrito em 3.5.1.1.) foram aplicadas à coluna cromatográfica. A incubação ocorreu à temperatura ambiente por 20 min, com agitações periódicas da solução a cada 5 min por meio de perturbação do sistema bifásico manualmente, com o auxílio de pipeta. A fração de proteínas não retidas em cada cromatografia foi coletada por meio da lavagem da resina com 15 mL do tampão de equilíbrio. Durante todo o processo, houve o monitoramento da absorbância das frações eluídas, em espectrofotômetro, a 280 nm. Em seguida, as proteínas retidas na resina foram eluídas com a aplicação de 4 alíquotas sequenciais de 1 mL de ácido acético 100 mM, pH 3, que interagiram com a resina por 10 min.

As proteínas que interagiram com a lectina foram concentradas por centrifugação a vácuo. Após esta etapa, as proteínas foram ressuspensas em 50 μL de tampão HEPES 10 mM, pH 8,0, com posterior ajuste do pH para 8,0, utilizando solução NaOH 100 mM.

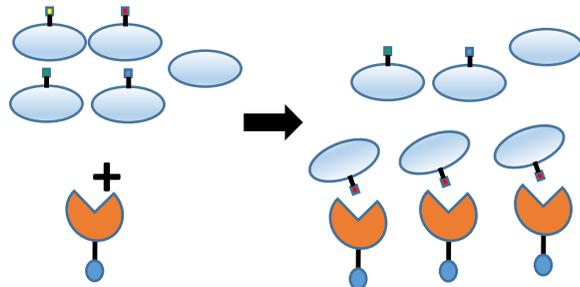
Ao final desse processo, as amostras obtidas foram submetidas à quantificação de proteínas pelo método de Bradford, avaliação do perfil eletroforético de proteínas por

eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, digestão com tripsina (3.5.3.1), e análise por espectrometria de massas (3.5.4).

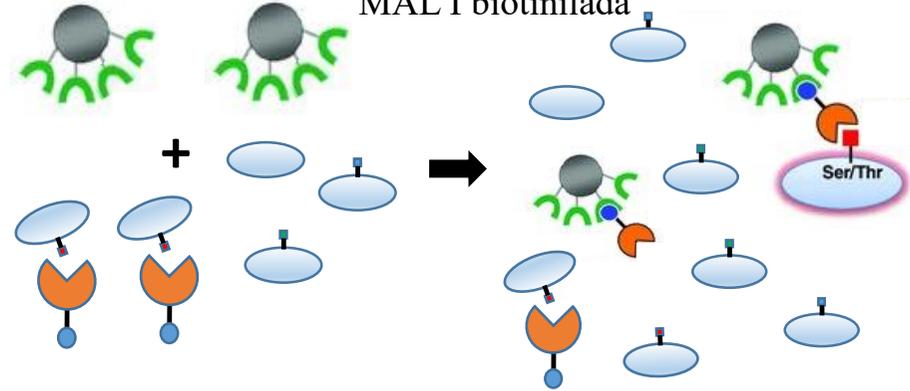
3.5.2 Ensaio de *pull down* de *Maackia amurensis* leucoaglutinina (MAL I) com venenos do gênero *Bothrops*

Os ensaios de *pull down* realizados neste trabalho foram realizados utilizando as instruções do fabricante da resina *Streptavidin-SepharoseTM High Performace* (GE Healthcare Life Science) e da lectina MAL I biotinizada (Vector Laboratories), conforme ilustrado na Figura 4.

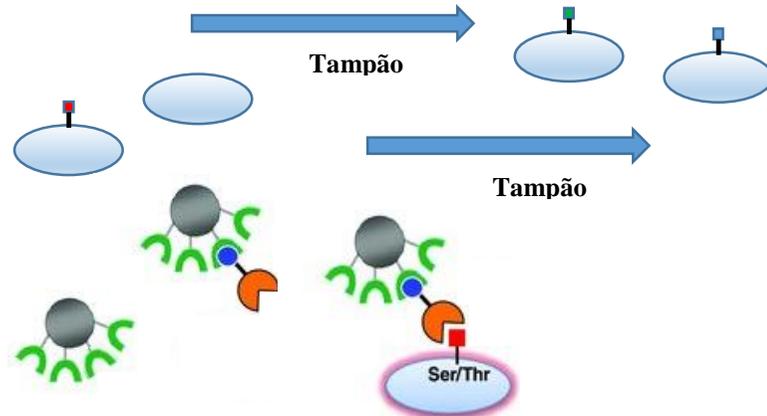
Etapa 1: Interação entre MAL I biotinilada e toxinas



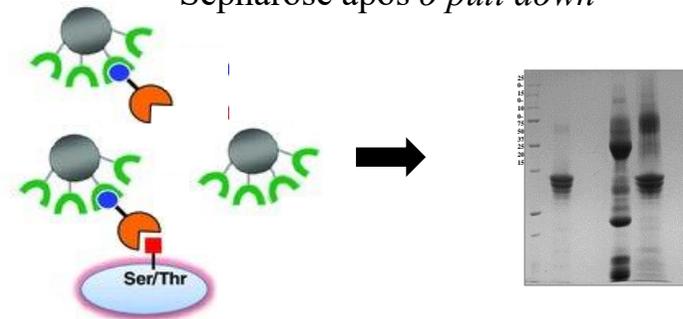
Etapa 2: Interação entre *beads* de estreptavidina-Sepharose e MAL I biotinilada



Etapa 3: Precipitação e lavagem dos *beads* de estreptavidina-Sepharose



Etapa 4: Análise eletroforética dos *beads* de estreptavidina-Sepharose após o *pull down*



Legenda

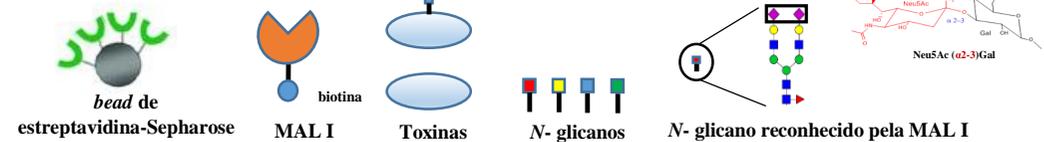


Figura 4. Ilustração das etapas do ensaio de *pull down* realizado entre a lectina MAL I biotinilada e venenos do gênero *Bothrops*.

As amostras de venenos do gênero *Bothrops* (800 µg de proteínas) foram solubilizadas em tampão de equilíbrio (HEPES 10 mM, pH 7,5) e incubadas com 40 µg da lectina MAL I biotinizada, por 30 min, a 20 °C. Após a incubação, a mistura foi adicionada a 20 µL da resina estreptavidina-Sepharose previamente lavada com 50 volumes de tampão de equilíbrio. A interação entre a resina e a mistura de proteínas de veneno e MAL I biotinizada ocorreu por 90 min, a 4 °C, sob constante agitação. Como controle negativo do ensaio foi utilizada a mesma quantidade de veneno (800 µg) com a resina de estreptavidina-Sepharose (20 µL), e como controle positivo, a mesma quantidade de lectina MAL I biotinizada (40 µg) com a resina de estreptavidina-Sepharose, nas mesmas condições do ensaio.

Após as etapas de incubação, a resina foi lavada e centrifugada a 4.000 g por 5 min, com 4 volumes de 300 µL do tampão de equilíbrio. Em paralelo, o processo de lavagem foi monitorado pela determinação da absorvância das amostras em espectrofotômetro, em 280 nm, com o objetivo de confirmar total remoção das proteínas que não foram capturadas pela estreptavidina-Sepharose.

Ao final do procedimento, o volume correspondente a 10 µL de resina foi submetido à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida para visualização dos perfis das proteínas retidas na resina. A identificação das proteínas que interagiram com a lectina MAL I foi realizada por digestão em gel com tripsina, como descrito no item 3.5.3.2., e análise por espectrometria de massas (3.5.4).

3.5.3. Digestão tripsínica de proteínas

3.5.3.1 Digestão tripsínica em solução

Para a digestão das proteínas com tripsina em solução foi utilizado o método descrito por Kinter e Sherman ¹⁴⁴. Neste protocolo, a desnaturação e redução das pontes de dissulfeto das proteínas dos venenos ocorreu utilizando como agente desnaturante a ureia (Sigma-Aldrich) e como agente redutor o ditioneitol (DTT) (2-Amino-2-hidroxi-metil-propano-1,3-diol) (Sigma-Aldrich).

Amostras de proteínas do veneno (30 µg) foram dissolvidas em 50 µL do tampão desnaturante (6 M ureia em Tris-HCl 100 mM, pH 8) e logo após reduzidas com a adição de 5 µL da solução redutora (DTT 20 mM em Tris-HCl 100 mM, pH 8) por 1 h, à temperatura ambiente. Em seguida a reação de carbamidometilação das cisteínas foi realizada pela adição de 10 µL da solução alquilante (iodoacetamida 20 mM em Tris-HCl

100 mM, pH 8) e posterior incubação à temperatura ambiente, por 1 h, protegida da luz. Ao final do procedimento, o excesso de iodoacetamida foi consumido pela adição de 10 µL da solução de DTT por 1 h de incubação, à temperatura ambiente.

Com o objetivo de reduzir a concentração de uréia para 600 mM, 630 µL de água deionizada foram adicionados. O pH da amostra foi conferido e ajustado para aproximadamente 8. A proporção utilizada de tripsina:substrato foi de 1:50 (m/m) (Sigma-Aldrich) e a reação foi mantida a 37 °C por 16 h.

A eficiência da digestão das proteínas foi avaliada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%), e após a confirmação da digestão total das proteínas presentes na amostra, os peptídeos resultantes foram dessalinizados utilizando a metodologia de StageTips, descrita por Rappsilber e colaboradores ¹⁴⁵, na qual 3 discos de membranas SDB-XC (Empore) foram utilizados para dessalinizar as amostras.

O material recuperado das StageTips foi seco por centrifugação a vácuo e dissolvido em 30 µL ácido fórmico 0,1%. Posteriormente a concentração de peptídeos foi estimada utilizando uma curva padrão construída com concentrações crescentes de peptídeos tripsínicos de soro albumina bovina (Sigma-Aldrich). A leitura da absorbância das soluções foi realizada no comprimento de onda de 214 nm, utilizando o instrumento NanoVue Plus (GE Healthcare). A solução de peptídeos foi reservada para identificação por LC-MS/MS.

3.5.3.2. Digestão tripsínica em gel

Para a digestão das proteínas com tripsina em gel foi utilizado o método descrito por Hanna e colaboradores ¹⁴⁶, com algumas modificações. As soluções utilizadas foram preparadas no momento do uso.

Os fragmentos de géis recortados foram incubados em 500 µL de solução de metanol 50% contendo ácido acético 5%, por 2 h, em temperatura ambiente. Em seguida, essa solução foi removida e mais 500 µL dessa solução foram adicionados aos fragmentos de gel por uma hora. A etapa de desidratação ocorreu pela incubação por 10 min (2 vezes por 5 min) em 200 µL de acetonitrila (100%). Após a remoção dessa solução e evaporação do excesso de solução no sistema de centrifugação a vácuo, os pedaços de gel foram reidratados por 30 min em 30 µL da solução redutora DTT (ditiotretiol 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Decorrido o tempo de reidratação, na presença de DTT, a solução foi retirada e os fragmentos de gel foram incubados por 30 min, em 30 µL, com a solução alquilante IAA (iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM).

Em seguida, a solução IAA foi removida e os géis foram lavados com 100 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM. Após essa etapa, 200 μ L de acetonitrila foram adicionados, e após 5 min removidos. A reidratação ocorreu com a adição de 100 μ L bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min e uma nova desidratação ocorreu com adição de 200 μ L de acetonitrila 100% por 5 min, sendo essa etapa realizada duas vezes. Logo após a retirada de acetonitrila, os fragmentos de gel foram reidratados com 30 μ L de uma solução de tripsina (Sigma), na concentração de 20 ng/ μ L em bicarbonato de amônio 50 mM. Essa mistura permaneceu no gelo por 30 min e em seguida o gel foi coberto pela adição de bicarbonato de amônio 50 mM, e os tubos contendo os fragmentos de gel foram incubados a 37 °C, por 16 h.

A extração dos peptídeos gerados pela tripsina ocorreu com a adição de 30 μ L da solução de ácido fórmico 5% e incubação dos pedaços do gel por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo tubo, e uma nova extração foi realizada com a adição de 12 μ L de uma solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Após incubação por 20 min (duas vezes por 10 min), a solução com os peptídeos foi armazenada juntamente com a solução anterior de extração, ficando ambas armazenadas no mesmo tubo. Essa solução final (que representa o sobrenadante das duas extrações) foi concentrada por centrifugação à vácuo e os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 20 μ L de ácido fórmico 0,1%, para posterior identificação por LC-MS/MS.

3.5.4 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Em ambos os processos de digestão das proteínas (digestão tripsínica em solução e digestão em gel) os peptídeos obtidos foram submetidos à análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado a um sistema de nanoLC Easy II (Proxeon), como descrito a seguir.

3.5.4.1 LC-MS/MS

Os peptídeos oriundos da digestão com tripsina em solução, após quantificados, foram injetados em volumes correspondentes a 3 μ g em uma pré-coluna com dimensões de 50 mm x 100 μ m (respectivamente, comprimento e diâmetro interno), empacotada com resina C18 de esfera de 5 μ m (Phenomenex).

A separação cromatográfica dos peptídeos ocorreu em uma coluna analítica de dimensões 150 mm x 75 μ m (respectivamente, comprimento e diâmetro interno),

preenchida com *beads* de C-18 de 3 μm (Phenomenex). As colunas utilizadas nesse sistema foram preparadas no Laboratório Especial de Toxinologia, utilizando capilar de sílica fundido (quartzo amorfo; Polymicro Technologies) e um sistema de preenchimento de colunas.

A cromatografia líquida foi realizada utilizando como solvente (A) uma solução aquosa de 0,1% ácido fórmico e como solvente (B) acetonitrila em 0,1% ácido fórmico. Assim, os peptídeos após serem carregados na coluna analítica foram eluídos por meio de um gradiente cromatográfico com duração de 90 min, a uma vazão de 200 nL/min. O sistema partiu de uma concentração de 5% de B, levou 45 min para atingir 30% de B, depois foi de 30% a 95% de B em 10 min, permanecendo por mais 5 min nesta condição. Por fim, o sistema retornou para a condição inicial em 5 min, mantendo 5% de B por 25 min.

Para cada amostra obtida das cromatografias de afinidade com as resinas SNA-agarose e PHA-E-agarose foram realizadas três corridas de LC-MS/MS (réplicas técnicas).

Para a análise dos peptídeos oriundos da tripsinização em gel, o volume correspondente a 15 μL foi injetado na coluna e após o carregamento da amostra, a eluição dos peptídeos ocorreu utilizando um gradiente cromatográfico de 30 min. O sistema partiu de uma concentração de 5% de B e levou 20 min para atingir 95% de B, depois permaneceu por mais 5 min nesta condição, retornando para a condição inicial em 5 min.

Para a obtenção dos espectros de MS, a voltagem do spray de ionização foi configurada para 2.0 kV e o espectrômetro de massas foi operado no modo *Data Dependent Acquisition* (DDA) no qual o MS^1 (ou *full MS scan*) foi adquirido utilizando a faixa de m/z 200-2000 para varredura com resolução de 30.000 no modo FTMS. A fragmentação dos dez íons mais intensos de cada MS^1 foi realizada por CID (*collision induced dissociation*) e os fragmentos analisados no *ion trap*. A configuração da janela de isolamento, tempo de ativação e energia normalizada de colisão foram, respectivamente, 2 m/z , 10 ms e 35%. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 70 s, com uma lista contendo 500 íons, para diminuir a aquisição repetida de um mesmo valor de m/z .

3.5.4.2 Análise bioinformática

Os arquivos brutos (*raw files*) gerados pela análise por LC-MS/MS foram submetidos à análise bioinformática utilizando o programa PEAKS X+ (Bioinformatics

Solutions). As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados das sequências anotadas na taxonomia “Serpentes + Venom” do Uniprot (acessado em 15/10/2020; <http://www.uniprot.org/>; 115.910 sequências) além de 79 sequências obtidas pelo sequenciamento dos transcritos da glândula de veneno de *B. jararaca*⁸¹.

Para a análise dos peptídeos provenientes da reação com tripsina, os valores de tolerância escolhidos para as massas monoisotópicas considerados foram de 10 ppm para os eventos de MS e 0,6 Da para os eventos de MS/MS, considerado os íons com carga +2, +3 e +4. Como modificação variável foi escolhida a oxidação da metionina e como modificação fixa a carbamidometilação de resíduos de cisteína. A enzima de escolha foi a tripsina, com a tolerância de no máximo 2 clivagens perdidas. O modo de pesquisa “merged” foi habilitado para a análise.

Os peptídeos identificados pelo banco de dados foram filtrados utilizando uma taxa de FDR (*False Discovery Rate*) < 1% e um valor para $-10 \log P \geq 20$. Para a pontuação dos peptídeos identificados pelo sequenciamento *de novo* foram consideradas apenas identificações com score *de novo only* superior a 70%.

Em relação as proteínas analisadas foram consideradas somente aquelas com valor de $-10 \log P \geq 20$ e identificadas por pelo menos dois peptídeos únicos. Como observado em proteomas complexos, como os de venenos de serpentes, os peptídeos podem ser compartilhados entre proteínas homólogas, levando a necessidade de classificá-las como “grupos de proteínas”. Para cada grupo de proteína identificado no PEAKS, a primeira entrada de proteína foi considerada como representante.

3.5.5 Comparação de sub-proteomas de proteínas de venenos do gênero *Bothrops* reconhecidas por lectinas

Os sub-proteomas identificados pela análise por digestão tripsínica e LC-MS/MS das proteínas obtidas por cromatografia de afinidade com lectinas (SNA e PHAE) e por ensaio de *pull-down* (MAL I) foram analisados segundo sua composição, de forma a classificar os venenos em agrupamentos hierárquicos, de acordo com a presença ou ausência de proteínas identificadas em cada veneno.

Para a geração dos *heat maps* foram geradas listas de códigos de acesso das proteínas agrupadas por veneno. A partir das tabelas que indicaram a presença ou ausência de cada proteína nos venenos avaliados, utilizou-se a função `heatmap.2`¹⁴⁷ do programa R, para produzir os gráficos de clusterização dos venenos a partir das proteínas identificadas.

Ainda, para a comparação das proteínas identificadas, oriundas das cromatografias de afinidade e pelo ensaio de *pull down*, foram criados gráficos de intersecção, gerados pelo pacote UpSetR¹⁴⁸, utilizando a linguagem de programação R.

3.5.6 Detecção de glicoproteínas por *blot* de lectina

Como metodologia complementar às abordagens de enriquecimento de glicoproteínas por afinidade à lectinas (cromatografia de afinidade e *pull down*) foram realizados ensaios de *blot* utilizando lectinas marcadas.

Para a detecção de glicoproteínas contendo resíduos de ácido siálico foi utilizado o kit DIG *Glycan Differentiation* (Roche) que contém as lectinas SNA e *Mackia amurensis* aglutinina MAA (mistura de MAL I e II) marcadas com digoxigenina; e para a detecção de glicoproteínas contendo a estrutura *bisecting* GlcNAc foi utilizada a lectina PHA-E marcada com biotina e a estreptavidina-peroxidase (Vector Laboratories).

Para as análises de *blot*, usando o kit DIG *Glycan Differentiation*, amostras de venenos de *Bothrops* (30 µg) foram submetidas à separação eletroforética em géis de SDS-poliacrilamida (12%) e transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em uma cuba miniVE, preenchida com tampão de transferência (Tris-HCl 25mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,0037%). A transferência ocorreu sob voltagem fixa de 20 V por 16 h. Após este período, as membranas foram imersas em solução de Vermelho de Ponceau 0,5% em ácido acético 1%, para verificar a correta transferência das proteínas. Após, três etapas de lavagem com TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15M, pH 7,5) por 10 min, as membranas foram bloqueadas por 16 h, a 4 °C, em solução bloqueadora para evitar ligações inespecíficas. Após esta etapa, a membrana foi lavada com solução de TBS e incubada com as lectinas MAA ou SNA marcadas com digoxigenina, nas proporções de, respectivamente, 1:200 e 1:1000. A incubação ocorreu em tampão TBS contendo MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM e MnCl₂ 1 mM, por 90 min, à temperatura ambiente. Após a lavagem, as membranas foram incubadas por 60 min com anticorpo anti-DIG (digoxigenina) conjugado com fosfatase alcalina (1:1000 em TBS), seguido por três etapas de lavagem e posterior coloração com substrato NBT/BCIP (1:50 em Tris-HCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M e NaCl 0,1 M, pH 9,5).

Para os ensaios utilizando a lectina PHA-E biotilada, 15 µg dos venenos de *Bothrops* foram submetidos à separação eletroforética e posteriormente transferidas como descrito acima. Após confirmação da transferência, a membrana foi lavada com tampão PBS (Tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M, fosfato de sódio dibásico 0,05M,

NaCl 0,15 M) e bloqueada por 60 min utilizando PBS contendo leite desnatado (1%). Após a etapa de bloqueio e lavagem da membrana, esta foi incubada por 3 h com a lectina PHA-E (2 mg/mL) diluída na proporção (1:10.000) em PBS contendo 0,1 mM CaCl₂. Na sequência, após lavagem da membrana, a mesma foi incubada por 1 h, com a solução de estreptavidina-peroxidase (1 mg/mL) na proporção (1:2.000 em PBS), seguido por três etapas de lavagem e posterior revelação da membrana utilizando o substrato de quimioluminescência para detecção de atividade de peroxidase (Horseradish Peroxidase) do kit Western Sure® Premium (LI-COR).

3.6 Efeito da remoção enzimática de ácido siálico na atividade proteolítica de venenos do gênero *Bothrops*

3.6.1 Reação de dessialilação de glicoproteínas

Para avaliar o papel dos resíduos de ácido siálico nas atividades enzimáticas das proteases de venenos do gênero *Bothrops*, estes foram tratados com a enzima α 2-3,6,8,9 Neuraminidase A (New England BioLabs), em condições não desnaturantes.

A reação de dessialilação ocorreu conforme instruções do fabricante, com algumas modificações, utilizando tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 contendo 5 mM de CaCl₂. A incubação das proteínas dos venenos com a enzima α 2-3,6,8,9 neuraminidase A ocorreu na proporção 1:5 (μ g proteínas:U da enzima) por 16 h, a 37 °C. Como controle negativo, as amostras de veneno foram submetidas às mesmas condições de incubação, porém sem a adição de enzima. Após a reação, amostras de 5 μ g de cada veneno (controle e tratado) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) com o intuito de visualizar o perfil eletroforético das mesmas.

3.6.2 Avaliação da remoção de ácido siálico pela neuraminidase

Para avaliar o resultado da dessialilação das glicoproteínas dos venenos pela enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase, além da eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, realizou-se o ensaio de *blot* de lectina, no qual lectinas que reconhecem ácido siálico nas posições α 2-3 e α 2-6 foram utilizadas para detectar a presença destes monossacarídeos nas glicoproteínas.

3.6.3 Atividade gelatinolítica

3.6.3.1 Análise por incubação em solução

A atividade gelatinolítica em solução foi realizada utilizando o kit EnzCheck Gelatinase/Collagenase Assay (Invitrogen). Amostras de venenos do gênero *Bothrops* (1 µg) não tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase foram incubadas com 5 µg de gelatina conjugada com fluoresceína em tampão M Tris-HCl 0,05, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, pH 7,6, em volume total de reação de 200 µL. Para o controle positivo da atividade gelatinolítica foi utilizada a colagenase de *Clostridium*, na concentração final de 0,1 U/mL. Como controle negativo foi utilizada a neuraminidase na mesma concentração presente na incubação com os venenos. A reação foi realizada em triplicata, com incubação a 37 °C, no escuro. A fluorescência foi mensurada nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min, utilizando um leitor de microplacas (1420 Multilabel Counter/Victor; Perkin Elmer), com excitação em 480 nm e emissão em 530 nm. A análise foi realizada em triplicata.

3.6.3.2 Análise por zimografia

A atividade gelatinolítica por zimografia foi avaliada utilizando-se géis de SDS-poliacrilamida (12%) polimerizado com gelatina (1mg/mL). Amostras de venenos do gênero *Bothrops* não tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase (25 µg) foram submetidas à eletroforese. Neste caso, as proteínas foram apenas submetidas à desnaturação com SDS e não tiveram suas pontes de dissulfeto reduzidas. Após a corrida eletroforética, os géis foram incubados por 30 min em solução Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo Triton X-100 2,5%, para remoção do SDS. Em seguida, estes foram lavados por 10 min com água destilada e imersos na solução de incubação para atividade proteolítica (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, CaCl₂ 10 mM, NaCl 200 mM e Igepal 0,02%), por 18 h, a 37 °C. Os géis foram submetidos ao processo de revelação utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich). A atividade proteolítica foi verificada pelo aparecimento de bandas mais claras no gel, contrastando com o fundo azul, resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina.

3.6.4 Atividade amidolítica

A atividade amidolítica foi determinada utilizando o substrato cromogênico Benzoil-Arginil-p-nitroanilida (L-BAPNA) (Sigma-Aldrich). Amostras de venenos não

tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase, 5 μ g (*B. cotiara*, *B. fonsecai*, *B. insularis* e *B. neuwiedi*), 10 μ g (*B. jararaca*), 20 μ g (*B. jararacussu* e *B. moojeni*) e 30 μ g (*B. atrox* e *B. erythromelas*) foram incubadas com Bz-Arg-pNA 2 mM, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, em volume final de 450 μ L, a 37 ° C, por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido acético 30%, e a liberação de p-nitroanilina monitorada a 405 nm em espectrofotômetro. A atividade amidolítica foi calculada considerando a absorvância molar de 10.200 M⁻¹ cm⁻¹ para a p-nitroanilina. A atividade amidolítica específica foi expressa como nmol Bz-Arg-pNA hidrolisado por minuto por mg de proteína. A análise foi realizada em triplicata.

3.6.5 Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi determinada de forma qualitativa, pela visualização do perfil eletroforético do fibrinogênio após incubação com amostras dos venenos não tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase, e de forma quantitativa, pela mensuração dos produtos de hidrólise.

3.6.5.1 Análise por incubação em solução

A atividade fibrinogenolítica em solução foi determinada conforme descrito por Oliveira e colaboradores¹⁴⁹. Amostras de venenos não tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase, 2 μ g (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. insularis*, *B. atrox* e *B. fonsecai*) e 4 μ g (*B. erythromelas* e *B. cotiara*) foram incubadas com 500 μ g de fibrinogênio humano (Sigma-Aldrich), em tampão Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 0,01 M, pH 8,8, em volume final de 95 μ L. A reação foi realizada por 30 min, a 37 ° C e interrompida com a adição de 5 μ L de ácido tricloroacético 50%. A mistura foi centrifugada a 10.000 g durante 15 min, a 4° C, e a absorvância do sobrenadante foi mensurada em um espectrofotômetro a 280 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 100 μ L. A unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de veneno que gerou um aumento de uma unidade de absorvância por minuto a 280 nm. A atividade proteolítica específica foi expressa em U/min/mg de proteína. A análise foi realizada em sextuplicata.

3.6.5.2. Análise da hidrólise do fibrinogênio por eletroforese

Fibrinogênio humano (Sigma) foi dissolvido em NaCl 0,15 M, obtendo-se a concentração final de 10 mg/mL. Para o ensaio de hidrólise, amostras de venenos não tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase foram adicionadas na

proporção enzima:substrato (1:500) (50 ng veneno:25 μ g fibrinogênio) em tampão Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 0,01 M, pH 8,8.

As amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 min e a reação enzimática foi interrompida pela adição de tampão desnaturante e redutor para eletroforese (Laemmli, 1970). Uma amostra de fibrinogênio, usada como controle, foi incubada sem veneno em condições idênticas de concentração, temperatura e tempo. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) e o gel foi corado com Coomassie Blue Coloidal G-250.

3.6.6 Atividade coagulante

A determinação da atividade coagulante de venenos do gênero *Bothrops* sobre o plasma foi realizada de acordo com Theakston e colaboradores¹⁵⁰, que definiram a Dose Mínima Coagulante (DMC) como a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de plasma citratado em 60 s, a 37 °C.

Para o ensaio de determinação da Dose Mínima Coagulante (DMC) de venenos não tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase, foram utilizados 100 μ L de solução de veneno em diferentes concentrações (obtidas através de diluições seriadas) adicionados a 200 μ L de plasma humano, contendo 0,38% de citrato de sódio. A reação ocorreu a 37 °C, utilizando o aparelho fibrômetro (BBL Fibrosystem, Becton Dickinson), o qual mensura o tempo necessário para a formação do coágulo. Para o cálculo da DMC de cada veneno, valores de tempo de coagulação e concentração de veneno foram usados para construir uma curva, a partir da qual o valor de DMC foi obtido. Cada ensaio foi realizado de forma independente e em triplicata.

Os valores de DMC obtidos foram considerados como referência para a determinação da DMC dos venenos não tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase, nas mesmas condições descritas acima. O plasma também foi incubado com 0,2 U/ μ L neuraminidase, como controle negativo da reação de coagulação.

3.6.7. Análise estatística

Os resultados das determinações de atividades enzimáticas foram expressos como média \pm desvio-padrão. Para verificação de valores discrepantes foi utilizado o teste Z (Sigma Plot 11 versão 23.0), seguido da avaliação da distribuição normal dos dados. Atendido este critério, a análise estatística comparativa entre as atividades enzimáticas das amostras de venenos não tratados e tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase

(atividade gelatinolítica, fibrinogenolítica, amidolítica e coagulante) foi realizada pelo Teste *t* de Student, utilizando o software PRISM 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.6.8 Efeito da remoção de resíduos de ácido siálico na atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca* sobre o plasma humano

3.6.8.1 Reação de dessialilação de glicoproteínas

Para a reação de dessialilação, amostras de 50 μg do veneno de *B. jararaca* foram incubadas com 125 U da enzima α 2-3,6,8,9 neuraminidase A (New England BioLabs), por 16 h, a 37 °C. A reação ocorreu em condições não desnaturantes, em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, contendo CaCl_2 5 mM. Como controle negativo, as amostras de veneno foram incubadas nas mesmas condições, porém sem a adição de enzima.

3.6.8.2 Incubação do plasma com o veneno dessialilado

Após o tratamento do veneno com a neuraminidase, este foi incubado com plasma humano, para avaliação da atividade proteolítica. Para isso, 500 μL de plasma humano, contendo citrato de sódio 0,38%, e diluído com PBS 50 mM, pH 7,5 para a concentração de 10 mg/mL foram incubados com 50 μL de solução de veneno não tratado (C) e tratado com a neuraminidase (T) na concentração de 1 mg/mL, resultando na proporção de 1:100 (m/m) entre as proteínas do veneno e do plasma. A reação de incubação ocorreu por 1 h, a 37 °C, e posteriormente alíquotas de 20 μg das amostras foram utilizadas para comparação de seus perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%). Como controle, o plasma humano foi incubado com PBS (C1) ou com neuraminidase (C2), utilizando a mesma quantidade de enzima presente na amostra de veneno dessialilado. Em seguida, as proteínas plasmáticas foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C até o uso. Esse experimento foi realizado em triplicata, como descrito na Figura 5.

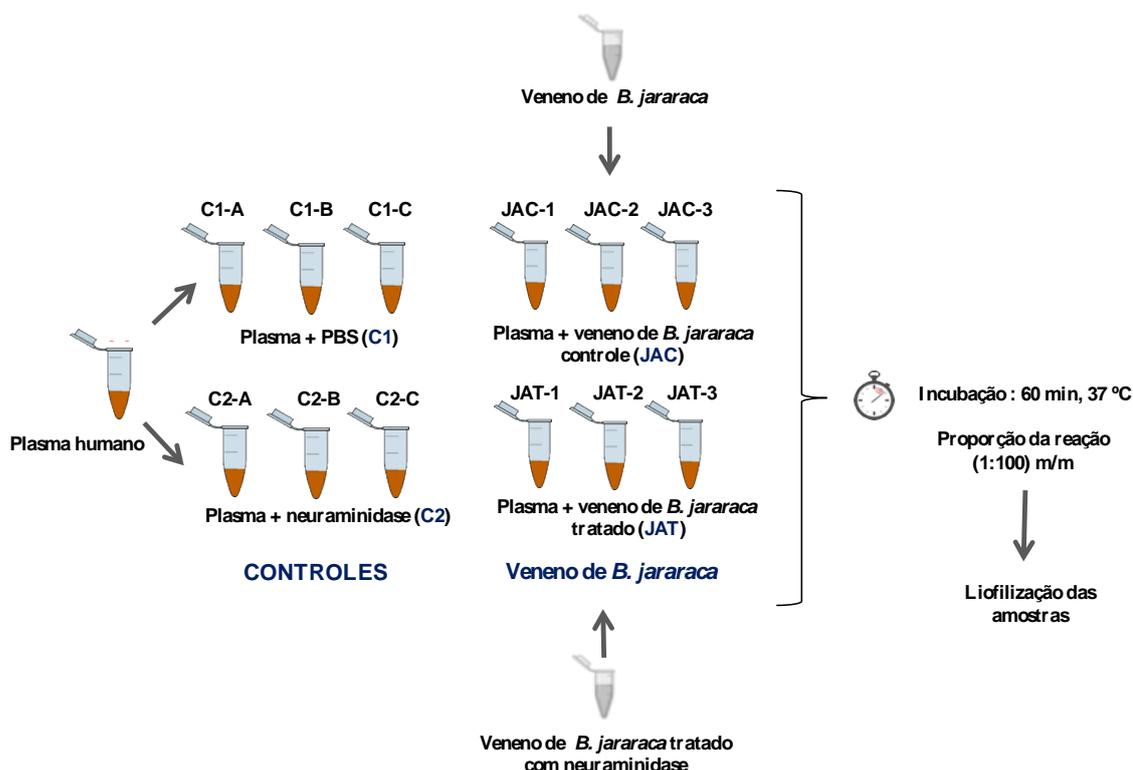


Figura 5. Ilustração do experimento realizado com *pool* de plasma humano e o veneno de *B. jararaca* não tratado e tratado com neuraminidase. A incubação do plasma com o veneno ocorreu a 37 °C, por 60 min. Cada tubo foi considerado como um experimento independente.

3.6.8.3 Análise da fração peptídica do plasma

3.6.8.3.1. Preparação da fração peptídica para identificação

Para a análise da fração peptídica, 3 mg de cada amostra do plasma liofilizado foram ressuspensos em 300 μ L de tampão HEPES 100 mM, ureia 8 M, DTT 20 mM, pH 8,0. Após o processo de solubilização em temperatura ambiente por 15 min e quantificação das proteínas pelo método de Bradford, 150 μ L de cada amostra foram submetidos à precipitação de proteínas pela adição de 150 μ L de TCA 20%, seguida de incubação por 16 h, a 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 g, a 4 °C. O sobrenadante resultante, correspondente à fração peptídica, foi submetido ao processo de dessalinização utilizando o sistema de Stage Tip descrita por Rappsilber e colaboradores (2003), no qual três membranas SDB-XC (Empore) foram utilizadas. Ao final do processo, as amostras foram secas por centrifugação a vácuo, e ressuspensas em 20 μ L de solução ácido fórmico 0,1%.

3.6.8.3.2 LC-MS/MS

Os peptídeos obtidos do plasma, após processo de precipitação e dessalinização, foram analisados no espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado a um sistema de nanoLC Easy II (Proxeon) utilizando uma coluna pré-analítica com dimensões de 50 mm x 100 μ m (respectivamente, comprimento e diâmetro interno), empacotada com resina C18 de esfera de 5 μ m (Phenomenex) e coluna analítica de dimensões 150 mm x 100 μ m (respectivamente, comprimento e diâmetro interno), preenchida com *beads* de C-18 de 3 μ m (Phenomenex).

Uma alíquota de 18 μ L da solução de peptídeos foi aplicada na coluna analítica e os seguintes parâmetros foram utilizados na cromatografia líquida e aquisição de dados pelo espectrômetro de massas: fluxo de 200 nL/min e um gradiente de 5 a 40% de acetonitrila (solvente B) em ácido fórmico 0,1%, (Solvente A) por 45 min, 6 min até atingir 90% de B, com retorno ao sistema inicial em 19 min, totalizando um gradiente cromatográfico de 70 min. A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 1,5 kV e 200 °C, respectivamente, e o espectrômetro foi operado no modo DDA, no qual uma varredura de massas na região de m/z de 300 a 2000 foi realizada, com resolução de 60.000 no modo FTMS, seguida de dissociação induzida por colisão de maior energia (HCD) dos 10 íons mais intensos, com resolução de 30.000.

3.6.8.3.3 Análise bioinformática

As identificações dos peptídeos presentes na fração peptídica do plasma após incubação com os venenos não tratados e tratados com neuraminidase foram realizadas com o programa PEAKS X+ (Bioinformatics Solutions) que realiza o sequenciamento *de novo*, seguido de busca em banco de dados e validação estatística dos peptídeos identificados. Os arquivos brutos (raw files) referentes às análises de MS/MS foram submetidos à análise utilizando o banco de proteínas Uniprot restrito à taxonomia *Homo sapiens* (acessado em 15/07/2021; <http://www.uniprot.org/>; 26.564 sequências, considerando apenas as entradas anotadas e revisadas). Como parâmetros de busca foram utilizados: nenhuma enzima especificada para clivagem; modificações variáveis: resíduos de metionina oxidados (+15,9949 Da), acetilação de qualquer aminoácido N-terminal (+42,0105 Da) e deamidação de asparagina e glutamina (+0.9840 Da); tolerância de íon precursor de 10 ppm, tolerância de íon fragmentado de 0,6 Da. A estimação dos falsos positivos foi feita pela busca de todos os espectros contra um banco de dados *decoy*,

criado pelo próprio programa PEAKS. Os peptídeos incluídos na análise apresentaram uma FDR $\leq 1\%$ e para os peptídeos identificados pelo sequenciamento *de novo* foram consideradas apenas identificações com score *de novo only* superior a 70%. Para a comparação do degradoma de proteínas do plasma gerado pelo veneno de *B. jararaca* não tratado e tratado com a neuraminidase apenas peptídeos únicos e identificados nas três incubações independentes com o plasma foram considerados para a identificação das proteínas clivadas.

4. RESULTADOS

4.1 Análise de glicoproteomas de venenos do gênero *Bothrops*

Os glicoproteomas de nove venenos do gênero *Bothrops* foram caracterizados utilizando-se a abordagem experimental de enriquecimento de proteínas no qual lectinas com diferentes especificidades foram utilizadas para reconhecer glicanos presentes nas proteínas dos venenos. A escolha das lectinas baseou-se em nossos estudos anteriores que revelaram dois achados importantes nas estruturas de *N*-glicanos de venenos do gênero *Bothrops*: a presença de ácido siálico terminal na maioria dos *N*-glicanos, e a presença da estrutura *bisecting* GlcNAc apenas no veneno de *B. cotiara*¹³¹.

No presente estudo, dentre as lectinas utilizadas, duas estavam imobilizadas em agarose (SNA e PHA-E), o que permitiu a realização de cromatografias de afinidade. A outra lectina utilizada (MAL I) estava conjugada com biotina, o que nos levou a utilizar o sistema de interação biotina-estreptavidina para realizar o enriquecimento das glicoproteínas, utilizando a abordagem de *pull down*.

4.1.1 Cromatografia de afinidade: *Sambucus nigra* aglutinina (SNA)

Com o objetivo de explorar o conteúdo de glicoproteínas dos venenos do gênero *Bothrops* que apresentem resíduos de ácido siálico em suas estruturas de *N*-glicanos, foi utilizada a lectina *Sambucus nigra* aglutinina (SNA) imobilizada em agarose, considerando que esta lectina reconhece esses monossacarídeos na configuração NeuAc α -2,6-Gal/GalNAc.

Os perfis cromatográficos de nove venenos do gênero *Bothrops*, mostrados na Figura 6, indicam que apenas uma pequena parte das proteínas interagiram com a resina de SNA-agarose. Porém, é possível destacar algumas diferenças entre os venenos analisados, como é o caso do veneno de *B. jararacussu* que mostrou um perfil de eluição

de proteínas diferente dos demais, com intensidades de absorvência das frações retidas na resina comparativamente mais altas do que o dos outros venenos, sugerindo a presença de uma maior proporção de proteínas reconhecidas pela SNA.

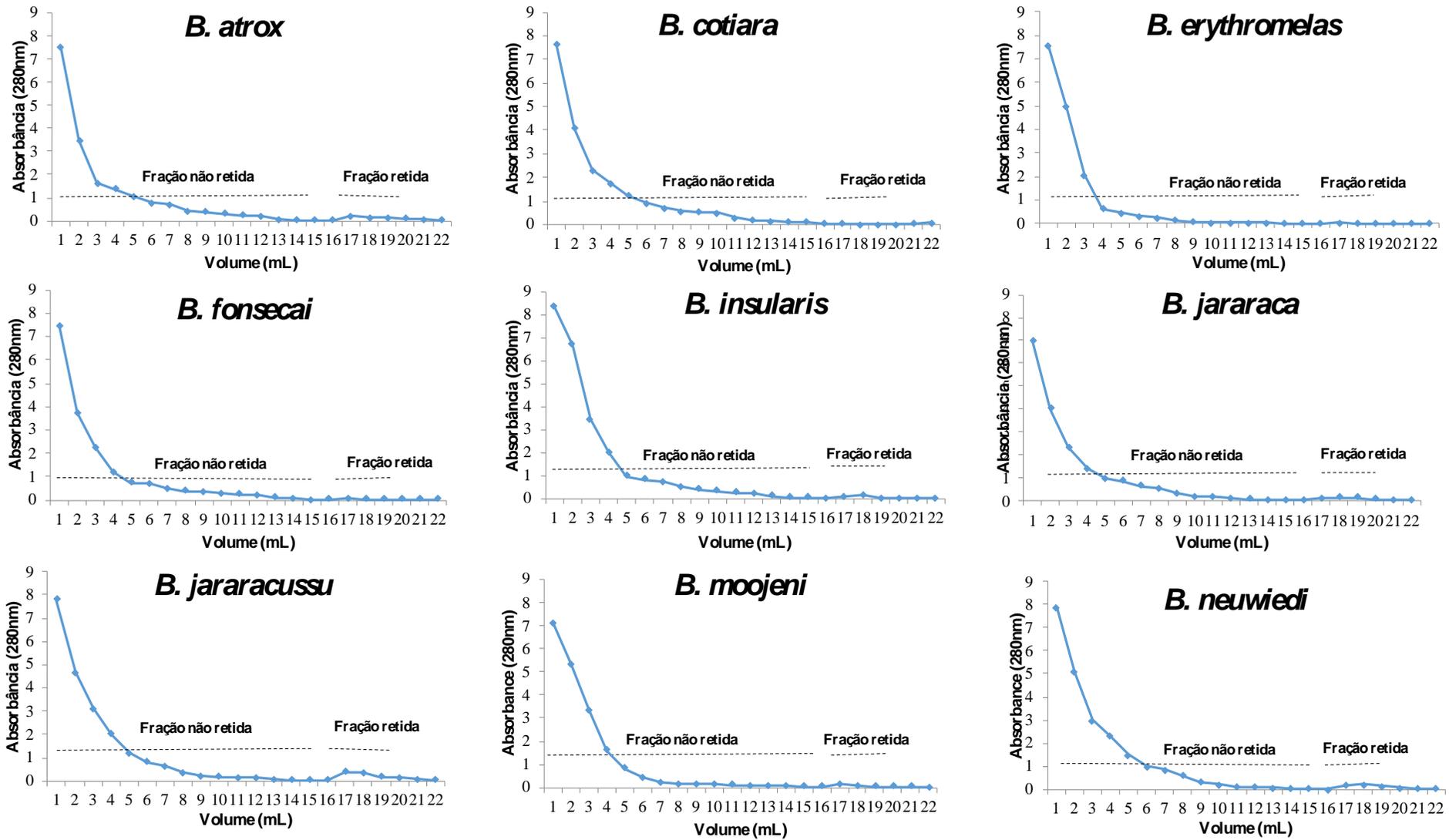


Figura 6. Perfis das cromatografias de afinidade usando a lectina *Sambucus nigra* aglutinina (SNA) imobilizada em agarose e venenos do gênero *Bothrops*.

Os perfis cromatográficos, quando avaliados em relação à porcentagem de recuperação das proteínas (Tabela 1), reforçam as sutis diferenças no enriquecimento de proteínas pela SNA-agarose entre os venenos. A porção de proteínas retidas na resina representa uma pequena parte das proteínas totais dos venenos (menos de 0,3%), destacando-se apenas o veneno de *B. jararacussu* (0,5%). Esses resultados indicaram a baixa abundância de glicoproteínas reconhecidas pela SNA nesses venenos. No caso dos venenos de *B. fonsecai*, *B. erythromelas* e *B. cotiara* a recuperação de proteínas reconhecidas pela lectina foi ainda menor (< 0,08%). Em alguns casos, como o veneno de *B. cotiara*, foi realizado mais de um experimento de cromatografia de afinidade, para obter ao final a quantidade necessária de proteínas (30 µg), utilizadas para a identificação por espectrometria de massas (Tabela 1).

Tabela 1. Cromatografias de afinidade usando a resina SNA-agarose e venenos do gênero *Bothrops*. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

	<u><i>B. atrox</i></u>		<u><i>B. cotiara</i></u>				<u><i>B. erythromelas</i></u>			
	Cromatografia #1		Cromatografia #1		Cromatografia #2		Cromatografia #3		Cromatografia #1	
Veneno	18,61 mg	100%	16,88mg	100%	16,08 mg	100%	16,17 mg	100%	14,89 mg	100%
Fração não retida	16,66 mg	89%	14,30 mg	84%	13,69 mg	85%	13,36 mg	79%	11,98 mg	81%
Fração retida	0,050 mg	0,27%	0,011 mg	0,07%	0,009 mg	0,06%	0,011 mg	0,07%	0,003mg	0,02%

	<u><i>B. fonsecai</i></u>		<u><i>B. insularis</i></u>		<u><i>B. jararaca</i></u>	
	Cromatografia #1		Cromatografia #1		Cromatografia #1	
Veneno	17,02 mg	100%	17,51 mg	100%	18,56 mg	100%
Fração não retida	14,86 mg	87%	16,75 mg	95%	17,11 mg	92%
Fração retida	0,006 mg	0,04%	0,036 mg	0,21%	0,053 mg	0,29%

	<u><i>B. jararacussu</i></u>		<u><i>B. moojeni</i></u>		<u><i>B. neuwiedi</i></u>	
	Cromatografia #1		Cromatografia #1		Cromatografia #1	
Veneno	17,99 mg	100%	17,52 mg	100%	17,77 mg	100%
Fração não retida	15,31 mg	85%	14,32 mg	82%	13,68 mg	77%
Fração retida	0,103 mg	0,57%	0,042 mg	0,24%	0,053 mg	0,30%

Quanto à abundância de proteínas que contêm ácido siálico na configuração α -2,6 em venenos de *Bothrops*, podemos inferir, pelos valores de recuperação de proteínas nas frações retidas pela SNA-agarose, que se trata de uma forma pouco abundante de *N*-glicano. Outro fator a ser considerado para a análise dos valores de recuperação é a perda inerente de proteínas no processo de precipitação e limpeza da amostra.

Com relação ao perfil eletroforético das proteínas que interagiram com a resina de SNA-agarose (Figura 7), pode-se observar que os componentes que mostraram afinidade pela lectina foram diferentes entre os venenos, porém, na maioria dos perfis foi observada uma banda de proteína de ~14 kDa, embora com intensidade variável. Em venenos de

Bothrops, essas bandas correspondem a proteínas que não são glicosiladas, tais como fosfolipase A2 (PLA2) e lectinas do tipo C (CTL).

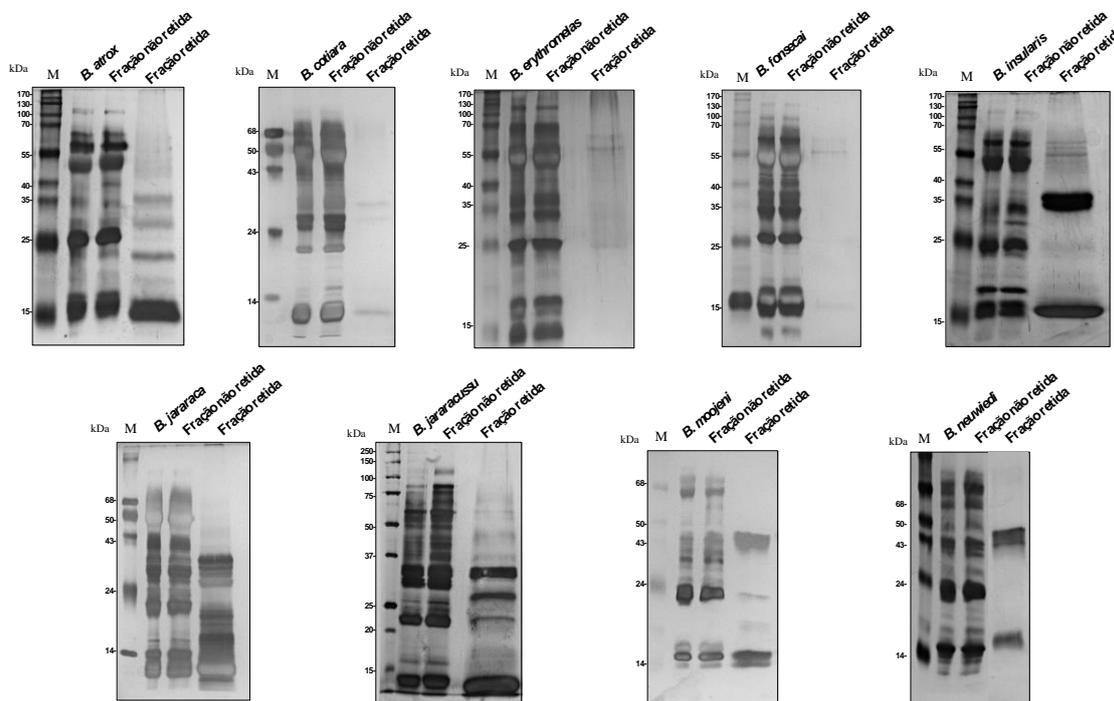


Figura 7. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) de venenos do gênero *Bothrops* (10 µg) submetidos à cromatografia de afinidade em resina de SNA-agarose. M: padrões de massa molecular. Proteínas coradas com nitrato de prata.

Outra observação em relação aos perfis eletroforéticos foi que, na maioria dos casos, proteínas de massa molecular abaixo de 50 kDa se ligaram à resina de SNA-agarose, sendo que para alguns venenos, como *B. cotiara*, *B. erythromelas* e *B. fonsecai* foram observadas poucas bandas e de baixa intensidade de coloração.

Quando os perfis eletroforéticos das proteínas eluídas das cromatografias de SNA-agarose são comparados com aqueles utilizando outras lectinas ⁴¹ verifica-se que o conteúdo de proteínas que se ligaram à Concanavalina A-agarose, por exemplo, foi muito mais complexo e diversificado do que aquele das proteínas que interagiram com a SNA. Isso sugere que o repertório de glicoproteínas dos venenos de *Bothrops* seja mais rico em glicanos que contêm manose do que ácido siálico na posição $\alpha 2,6$.

Para identificação, as proteínas retidas na resina de SNA-agarose foram submetidas à digestão por tripsina e analisadas por LC-MS/MS. Devido ao baixo rendimento das cromatografias de afinidade e a limitação de disponibilidade dos venenos de *B. fonsecai* e *B. erythromelas*, não foi possível realizar a identificação das proteínas retidas na resina, visto que o material obtido não foi suficiente (<30 µg). Dessa forma, a identificação das proteínas retidas se restringiu aos setes venenos restantes, cujas listas de

proteínas identificadas por espectrometria de massas são apresentadas nas Tabelas Suplementares 1 e 2.

4.1.1.1 Identificação de proteínas

A Tabela 2 apresenta um resumo da quantidade de grupos de proteínas identificados nas frações retidas na resina de SNA-agarose, de acordo com as classes de toxinas de venenos do gênero *Bothrops*.

Tabela 2. Distribuição dos grupos de proteínas identificados nas frações de venenos do gênero *Bothrops* retidas nas cromatografias de afinidade na resina de SNA-agarose.

Venenos do gênero <i>Bothrops</i>							
Classe de toxinas	<i>B. atrox</i>	<i>B. cotiara</i>	<i>B. insularis</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>B. jararacussu</i>	<i>B. moojeni</i>	<i>B. neuwiedi</i>
SVMP	9	5	1	17	5	13	8
SVSP	11	5	5	7	1	5	6
LAAO	1	0	0	1	1	1	1
CTL	11	8	0	17	5	11	7
PLA2	2	3	2	4	2	6	5
PLB	1	3	0	1	0	1	0
OT	4	8	0	5	2	4	2
Total	39	32	8	52	16	41	29

A quantidade variável de grupos de proteínas identificados entre os venenos mostra como as classes de toxinas que interagiram com a resina de SNA-agarose foram diferentes, e dessa forma, não foi possível identificar um padrão de enriquecimento de classe de toxina comum a todos os venenos.

Outro fato notável neste experimento foi a ausência de correlação entre a quantidade de proteínas totais recuperadas nas frações com afinidade pela resina de SNA-agarose e o número de grupos de proteínas identificados nas mesmas. No caso de *B. jararacussu*, o veneno que mostrou a maior quantidade de proteínas retidas (Tabela 1), apenas 16 grupos de proteínas foram identificados, em contraste com o veneno de *B. moojeni*, que apesar de ter mostrado perfis cromatográfico e eletroforético discretos (Tabela 1, Figura 7), resultou na segunda maior quantidade de grupos de proteínas identificados (41), ficando atrás apenas do veneno de *B. jararaca*, que resultou na maior quantidade (52).

Quanto à distribuição das classes de toxinas entre os venenos, a Figura 8 mostra que os grupos de proteínas que interagiram com a resina de SNA-agarose foram variáveis entre os venenos analisados e que as metaloproteases (SVMP) e serinoproteases (SVSP) foram os componentes glicosilados dos venenos do gênero *Bothrops* que mais abundantemente se ligaram à SNA-agarose. Curiosamente, L-aminoácido oxidase (LAAO) foi a classe de toxina glicosilada menos abundante nas frações retidas, sendo identificada apenas em cinco dos setes venenos (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. atrox*).

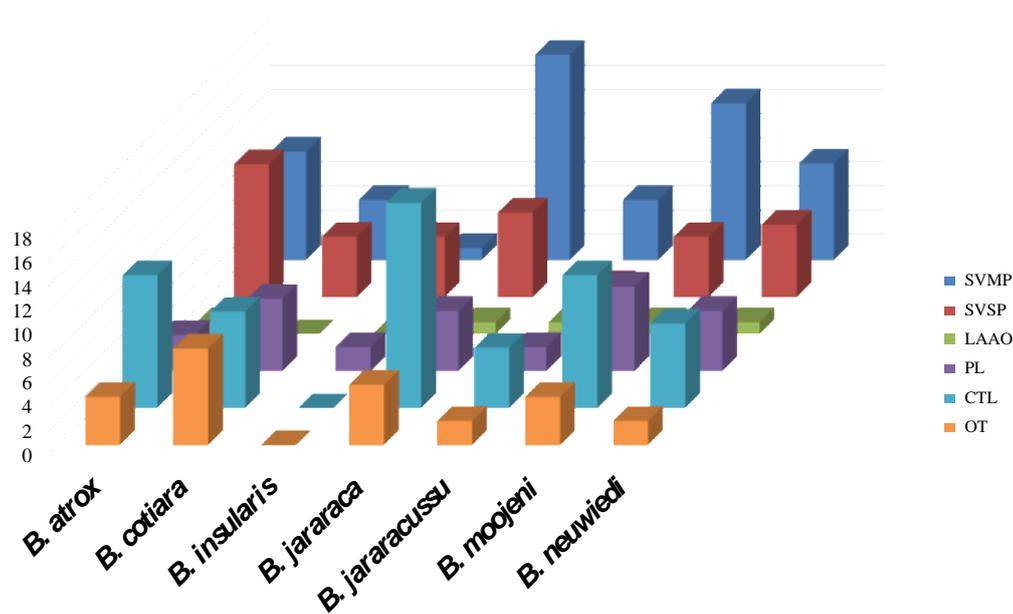


Figura 8. Representação gráfica da distribuição de proteínas identificadas nas frações retidas nas cromatografias de afinidade de SNA-agarose com venenos do gênero *Bothrops*. Os valores no eixo y indicam o número de grupos de proteínas identificados.

Porém, nesses experimentos a identificação em grande número, e variável entre os venenos, de lectinas do tipo C (CTL) entre as proteínas retidas na resina de SNA-agarose, foi bastante evidente (Tabela 2), ficando atrás apenas da classe das metaloproteases (SVMP), na maior parte dos venenos (Figura 8). Ainda, quanto às classes de toxinas identificadas, notou-se a presença de proteínas conhecidas por não serem glicosiladas, como é o caso das fosfolipases do tipo A2 (PLA2) e das CTL nas frações que se ligaram à SNA-agarose (Tabela 2).

A distribuição das proteínas menos abundantes identificadas nas frações retidas em SNA-agarose e classificadas neste trabalho como “Outros” (OT), está descrita na Figura Suplementar 1, onde proteínas secretórias ricas em cisteínas (CRISP), 5’ nucleotidases (5’-Nase) e fatores de crescimento de nervo (svNGF) foram as classes de toxinas mais enriquecidas pela lectina SNA. Outras toxinas menos abundantes também

De fato, nenhuma proteína foi comumente identificada em todas as frações enriquecidas pela SNA e apenas em dois agrupamentos de cinco venenos foram encontradas duas proteínas comuns: uma serinoprotease (A0A1L8D5R9) e uma metaloprotease (BJA454SVMPIII03). A identificação de uma serinoprotease na fração enriquecida pela SNA em vários venenos vai de encontro com o que Sakai e colaboradores ¹⁵¹ descreveram sobre uma serinoprotease do veneno de *Agkistrodon halys brevicaudus*, que contém *N*-glicanos com estrutura predominante de lactosamina ligada a ácido siálico na posição α 2-6. De forma geral, a baixa quantidade de intersecções de proteínas enriquecidas pela SNA nesses venenos sugere que a sialilação de glicanos na configuração α 2-6 é peculiar às diferentes classes de proteínas nos diferentes venenos.

4.1.2 Cromatografia de afinidade: *Phaseolus vulgaris* eritroaglutinina (PHA-E)

Com o objetivo de explorar o conteúdo de glicoproteínas dos venenos do gênero *Bothrops* que contenham em seus *N*-glicanos uma estrutura bifurcada contendo *N*-acetilglicosamina (*bisecting* GlcNAc) ¹³¹, foi utilizada a lectina *Phaseolus vulgaris* eritroaglutinina (PHA-E) imobilizada em agarose, em cromatografias de afinidade.

Os perfis de cromatografias de venenos do gênero *Bothrops* utilizando a lectina PHA-E estão mostrados na Figura 10, e indicam que a quantidade de proteínas presentes nas frações retidas, assim como ocorreu nas cromatografias de SNA-agarose, foi baixa (0,08% a 0,86%) em todos os venenos, como também mostrado na Tabela 3, onde estão descritos os dados de rendimento das cromatografias.

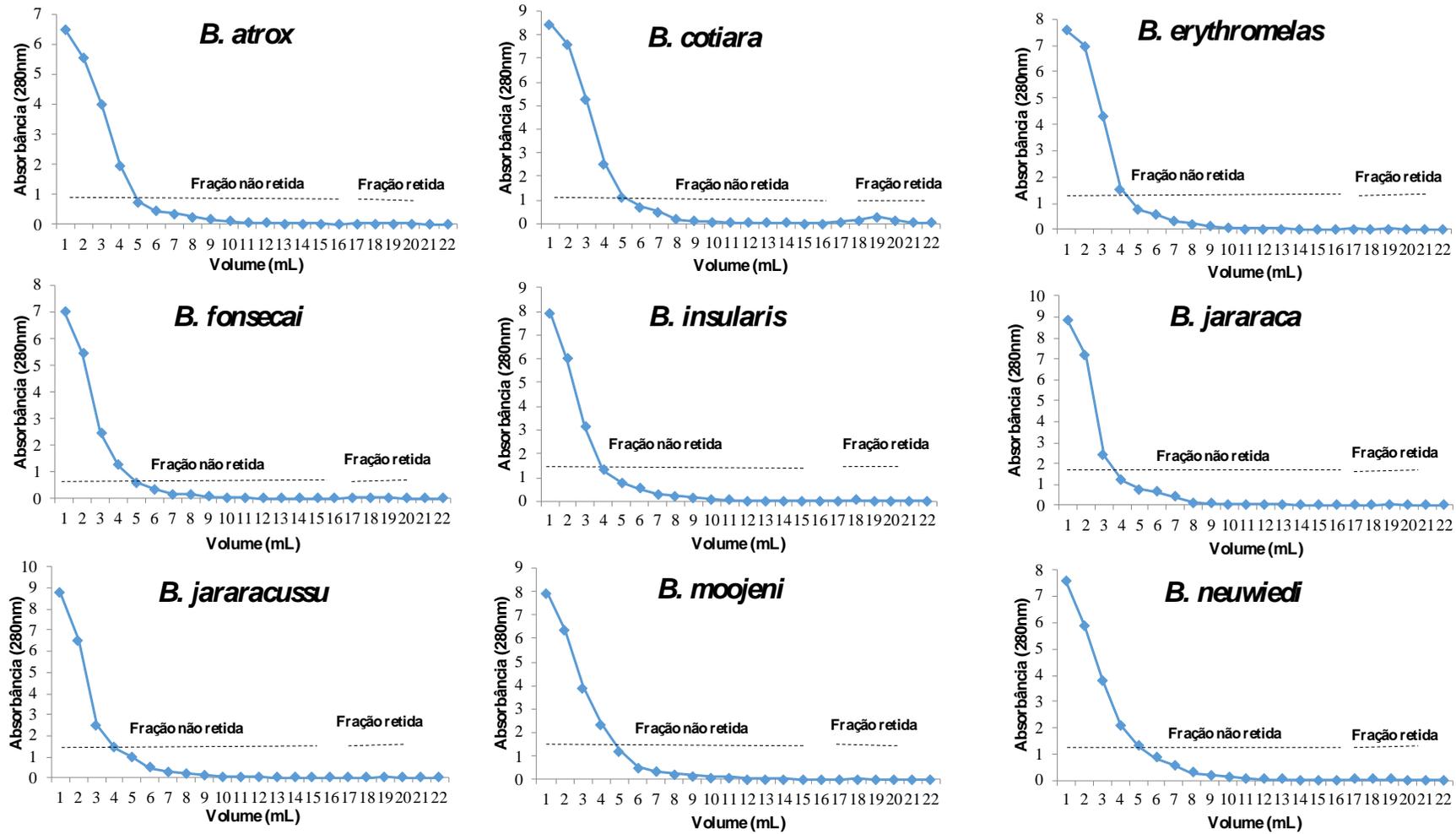


Figura 10. Perfis das cromatografias de afinidade usando a lectina *Phaseolus vulgaris* eritroagglutinina (PHA-E) imobilizada em agarose e venenos do gênero *Bothrops*.

Tabela 3. Cromatografias de afinidade usando a resina PHA-E-agarose e venenos do gênero *Bothrops*. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

	<u><i>B. atrox</i></u>		<u><i>B. cotiara</i></u>		<u><i>B. erythromelas</i></u>			
	Cromatografia #1		Cromatografia #1		Cromatografia #1		Cromatografia #2	
Veneno	18,44 mg	100%	20,57 mg	100%	19,89 mg	100%	16,9 mg	100%
Fração não retida	15,24 mg	82%	19,9 mg	96%	13,40 mg	77%	13,53 mg	80%
Fração retida	0,048 mg	0,26%	0,176 mg	0,86%	0,015mg	0,08%	0,023 mg	0,14%

	<u><i>B. fonsecai</i></u>		<u><i>B. insularis</i></u>		<u><i>B. jararaca</i></u>	
	Cromatografia #1		Cromatografia #1		Cromatografia #1	
Veneno	17,29 mg	100%	24,45 mg	100%	20,43mg	100%
Fração não retida	14,22 mg	82%	21,05 mg	86%	18,6 mg	91%
Fração retida	0,044 mg	0,25%	0,046 mg	0,19%	0,053 mg	0,26%

	<u><i>B. jararacussu</i></u>		<u><i>B. moojeni</i></u>		<u><i>B. neuwiedi</i></u>	
	Cromatografia #1		Cromatografia #1		Cromatografia #1	
Veneno	21,64 mg	100%	22,00 mg	100%	20,54 mg	100%
Fração não retida	18,24 mg	85%	19,46 mg	88%	16,38 mg	80%
Fração retida	0,045 mg	0,21%	0,054 mg	0,25%	0,053 mg	0,26%

Com relação aos perfis eletroforéticos de proteínas presentes nas frações retidas pela PHA-E-agarose (Figura 11), diferentes bandas variando entre 10 kDa e 150 kDa foram detectadas, sendo a maioria delas de ~ 25 – 70 kDa, que correspondem a proteínas glicosiladas, como SVMPs, SVSPs e LAAOs. Ainda, na maioria dos perfis foram observadas bandas com ~ 10 kDa e 14 kDa, embora com intensidade variável entre os venenos. Essas bandas tipicamente correspondem a PLA2 e CTL, que não são putativamente glicosiladas.

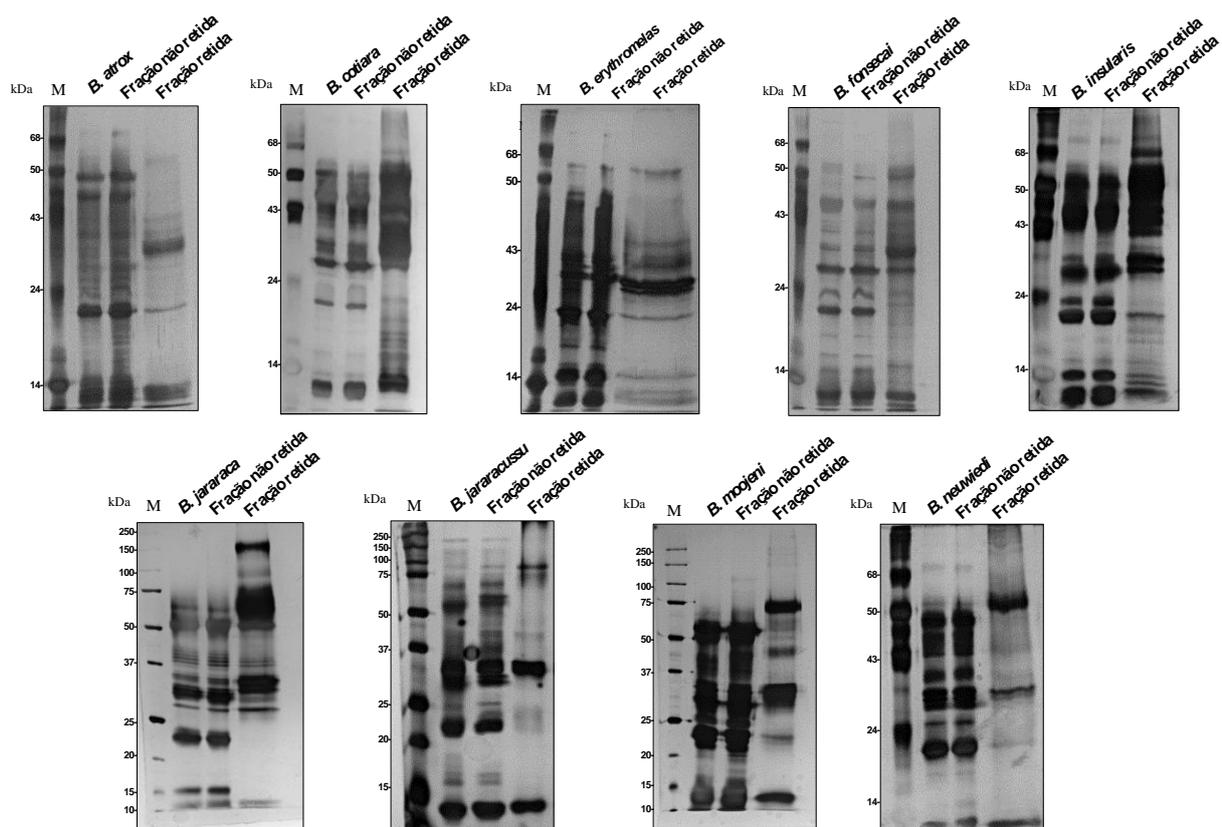


Figura 11. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) de venenos do gênero *Bothrops* (10 µg) submetidos à cromatografia de afinidade em resina de PHA-E-agarose. M: padrões de massa molecular. Proteínas coradas com nitrato de prata.

Esses perfis eletroforéticos bem diversificados das frações retidas pela PHA-E-agarose refletem como a lectina foi capaz de reconhecer toxinas com diferentes massas moleculares, sugerindo que a estrutura *bisecting* GlcNAc não se limita a um grupo específico de toxinas, podendo estar presente em uma ampla variedade de componentes nos venenos de *Bothrops*.

A comparação dos perfis eletroforéticos de proteínas retidas em ambas as cromatografias (SNA-agarose e PHA-E-agarose), indica que o conjunto de proteínas da fração ligada à PHA-E foi mais complexo do que aquele da SNA-agarose. Isso sugere que o repertório de glicoproteínas de venenos de *Bothrops* é mais rico em glicanos contendo a estrutura *bisecting* GlcNAc do que ácido siálico na posição α 2-6.

4.1.2.1 Identificação de proteínas

A Tabela 4 apresenta um resumo da quantidade de grupos de proteínas identificados nas frações retidas na resina de PHA-E-agarose, de acordo com as classes de toxinas de venenos do gênero *Bothrops*.

Tabela 4. Distribuição dos grupos de proteínas identificados nas frações de venenos do gênero *Bothrops* retidas nas cromatografias de afinidade na resina de PHA-E-agarose, de acordo com a classe de toxina.

Classe de toxina	Venenos do gênero <i>Bothrops</i>								
	<i>B. atrox</i>	<i>B. cotiara</i>	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. fonsecai</i>	<i>B. insularis</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>B. jararacussu</i>	<i>B. moojeni</i>	<i>B. neuwiedi</i>
SVMP	10	19	9	14	19	22	13	15	13
SVSP	12	10	13	13	11	14	11	10	9
LAAO	5	8	1	3	3	4	5	1	2
CTL	7	5	6	4	7	10	7	5	7
PLA2	3	2	3	3	3	5	7	5	5
PLB	1	0	1	0	0	1	1	1	1
OT	11	20	12	14	13	12	10	10	14
Total	49	64	45	51	56	68	54	47	51

Diferente dos resultados obtidos com as cromatografias em SNA-agarose, a identificação das proteínas que interagiram com lectina PHA-E mostrou um número maior de grupos de proteínas nas frações retidas, bem como maior homogeneidade na quantidade de proteínas identificadas em cada veneno (Tabela 4; Tabelas Suplementares 3 e 4).

Ainda, quanto ao conteúdo de proteínas retidas na resina de PHA-E-agarose, a distribuição das classes de toxinas foi semelhante entre os venenos. Entre as classes mais abundantes e que são conhecidas por serem glicosiladas, as SVMPs e SVSPs foram as toxinas identificadas em maior número, seguidas em menor proporção pelas LAAOs. No grupo de toxinas não putativamente glicosiladas, as CTLs e PLA2s foram identificadas em maior quantidade.

De forma semelhante ao obtido com as cromatografias de SNA-agarose, embora as PLBs contenham frequentemente sítios de *N*-glicosilação putativos e podem ter sido capturadas pela PHA-E, um número baixo de toxinas dessa classe foi identificado entre as proteínas retidas na PHA-E-agarose, provavelmente devido ao fato de que PLBs são pouco abundantes em venenos de *Bothrops* (Tabelas 2 e 4).

Porém, diferente das outras lectinas utilizadas anteriormente pelo nosso grupo ⁴¹, a lectina PHA-E possibilitou enriquecer, em maior número, componentes pouco abundantes em venenos de *Bothrops*, classificados no presente trabalho como “Outros” (OT) (Figura 12).

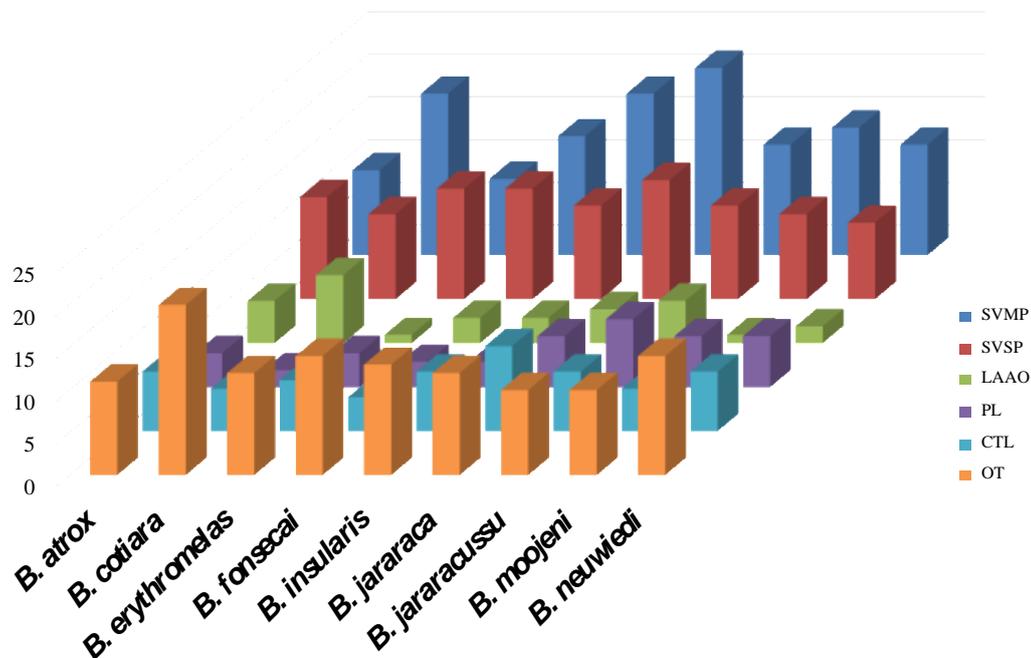


Figura 12. Representação gráfica da distribuição das proteínas identificadas nas frações retidas nas cromatografias de afinidade de PHA-E-agarose com venenos do gênero *Bothrops*. Os valores no eixo y indicam o número de grupos de proteínas identificados.

A Tabela 4 evidencia o número comparativamente alto de proteínas retidas em PHA-E-agarose, aqui classificadas como Outros, indicando que diversas proteínas pouco abundantes nos venenos podem conter a estrutura *bisecting* GlcNAc. A Figura Suplementar 2 mostra a diversidade de proteínas que estavam presentes nas frações que interagiram com a lectina PHA-E, somando 15 grupos de proteínas identificados e distribuídos entre os nove venenos avaliados. Algumas dessas proteínas foram identificadas apenas em um veneno, como por exemplo, *cobra venom factor* (CVF), enquanto outras, não classificadas como toxinas, foram encontradas em algumas frações, como glutaminil-ciclotransferases (GCTs) e carboxipeptidases (CPases). Ainda, entre as proteínas pouco abundantes, é importante ressaltar que as aminopeptidases (APase), as dipeptidases (DPase) e 5' nucleotidases (5'-Nase) foram identificadas nas frações enriquecidas pela PHA-E de todos os venenos. Todas as proteínas citadas são conhecidas por serem putativamente glicosiladas, como é o caso do CVF, presente no veneno de *Naja*

*kaouthia*¹⁵², e de duas aminopeptidases dos venenos de *Gloydus blomhoffi brevicaudus*¹⁵³ e *Bitis gabonica rhinoceros*⁷⁶.

Com relação às proteínas compartilhadas entre os venenos, enriquecidas pela resina PHA-E-agarose, múltiplas interseções estão mostradas na Figura 13, incluindo sete proteínas identificadas em todos os venenos analisados (2 SVMPs, 1 SVSP, 1 DPase, 1 APase, 1 GCT e 1 5'-Nase). Essas toxinas são descritas como putativamente glicosiladas, e no caso das SVMPs, a estrutura *bisecting* GlcNAc já havia sido reportada por Gowda e colaboradores¹⁵⁴ na toxina RVV-X, do veneno de *Vipera russeli* e por Igarashi e colaboradores¹⁵⁵, na VAP2B, do veneno de *Crotalus atrox*.

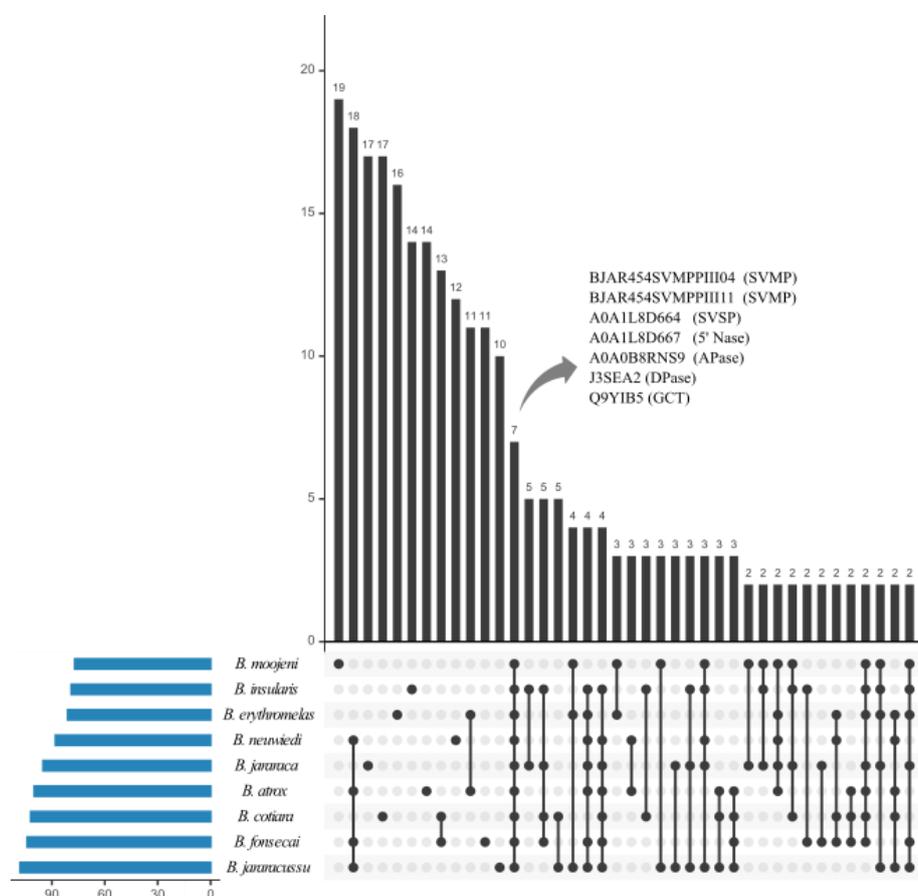


Figura 13. Interseções de proteínas identificadas nas frações de venenos de *Bothrops* retidas na resina de PHA-E-agarose. O eixo Y representa o número de proteínas identificadas (únicas ou compartilhadas). Barras horizontais representam o número total de proteínas identificadas em cada veneno. As conexões entre os círculos representam proteínas compartilhadas pelos venenos. Círculos desconectados representam proteínas não compartilhadas.

Em conjunto, esses resultados mostram que a lectina PHA-E reconheceu diversos componentes glicosilados de venenos de *Bothrops*, incluindo várias toxinas pouco abundantes, e evidenciam a variabilidade de componentes contendo glicanos com a estrutura *bisecting* GlcNAc nos venenos.

4.1.3 Ensaio de *pull down* da lectina *Maackia Amurensis* leukoaglutinina (MAL I) com venenos do gênero *Bothrops*

Dando continuidade ao estudo sobre o conteúdo de resíduos de ácido siálico em glicoproteínas de venenos do gênero *Bothrops*, foram realizados ensaios de *pull down* com a *Maackia amurensis* leukoaglutinina (MAL I). Esta lectina é conhecida por reconhecer glicanos contendo resíduos de ácidos siálico na configuração α 2-3, principalmente em proteínas *N*-glicosiladas e que contenham *O*-glicanos com o *core* 2, se ligando preferencialmente à sequência NeuAc α 2,3-Gal β 1-4Glc (NAc)^{156,157}.

No ensaio de *pull down* as proteínas dos venenos, após interagirem com a lectina MAL I biotinilada foram capturadas de forma indireta, pela ligação biotina-estreptavidina, por meio da incubação da mistura de MAL I/veneno com os *beads* de estreptavidina-Sepharose. Após lavagens sequenciais da resina com tampão de equilíbrio para remover as proteínas que não foram capturadas, a adição de tampão redutor à resina possibilitou a eluição das proteínas ligadas à resina. Ao final do ensaio, obteve-se o perfil eletroforético das proteínas de nove venenos de *Bothrops* que interagiram com a lectina MAL I (Figura Suplementar 3).

A comparação dos perfis eletroforéticos dos venenos e seus respectivos controles, indicou que o ensaio de *pull down* com a MAL I foi efetivo para o enriquecimento de proteínas em todos os venenos analisados. No entanto, em relação ao conteúdo de proteínas que ficaram retidas na resina, apenas os venenos de *B. jararaca*, *B. cotiara*, *B. fonsecai* e *B. insularis* mostraram bandas significativas e diferentes daquela da lectina MAL I (Figura Suplementar 3). Os perfis dos outros venenos analisados mostraram poucas bandas de proteínas, e de fraca intensidade. Ainda assim, todas as bandas observadas nos géis de SDS-poliacrilamida foram recortadas e submetidas à digestão tripsínica e LC-MS/MS (Figuras 14 a 17). As proteínas identificadas por espectrometria de massas estão listadas nas Tabelas Suplementares 5-13.

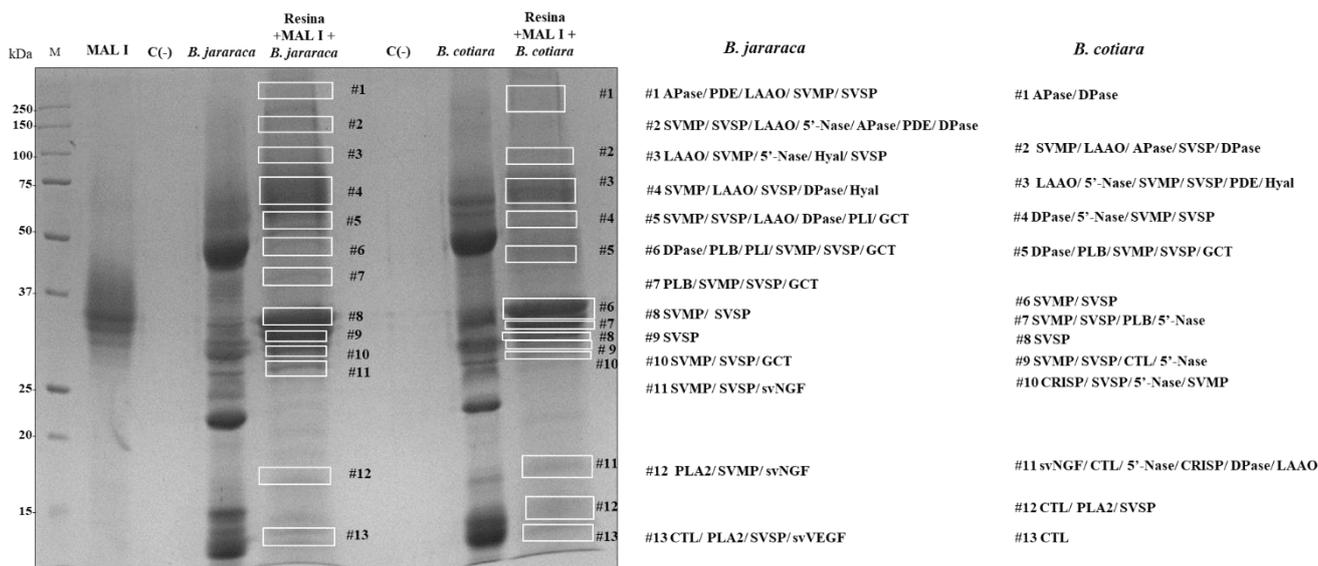


Figura 14. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras dos venenos de *B. jararaca* e *B. cotiara* obtidas em ensaio de *pull down* utilizando a lectina MAL I. Nos géis estão indicadas as bandas recortadas e ao lado, com o número correspondente, as classes de toxinas identificadas após digestão tripsínica em gel e identificação por LC-MS/MS. As proteínas identificadas estão listadas nas Tabelas Suplementares 5 e 6. (C-) Controle negativo: resina de estreptavidina-Sepharose incubada com veneno. M: padrões de massa molecular. Proteínas coradas com Coomassie Blue G.

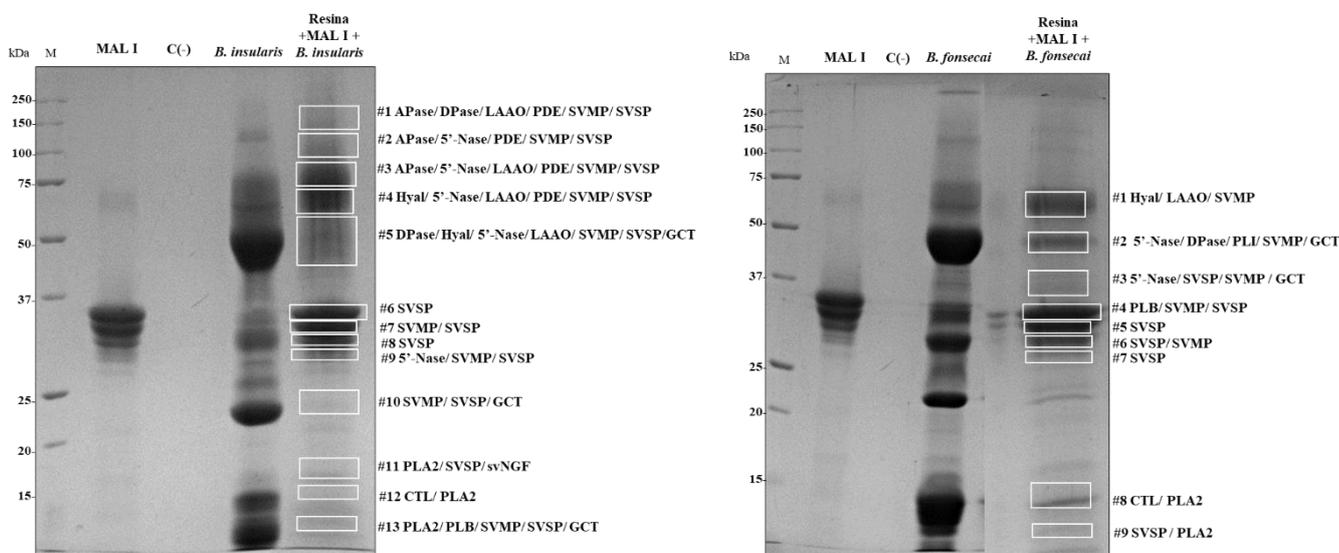


Figura 15. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras dos venenos de *B. insularis* e *B. fonsecai* obtidas em ensaio de *pull down* utilizando a lectina MAL I. Nos géis estão indicadas as bandas recortadas e ao lado, com o número correspondente, as classes de toxinas identificadas após digestão tripsínica em gel e identificação por LC-MS/MS. As proteínas identificadas estão listadas nas Tabelas Suplementares 7 e 8. (C-) Controle negativo: resina de estreptavidina-Sepharose incubada com veneno. M: padrões de massa molecular. Proteínas coradas com Coomassie Blue G.

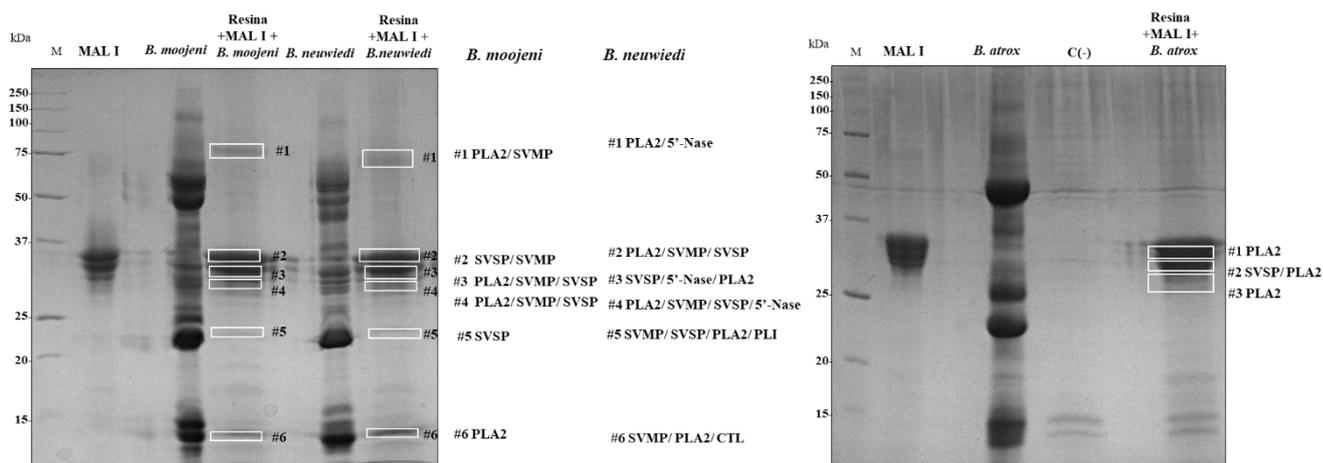


Figura 16. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras dos venenos de *B. mojejani*, *B. neuwiedi* e *B. atrox* obtidas em ensaio de *pull down* utilizando a lectina MAL I. Nos géis estão indicadas as bandas recortadas e ao lado, com o número correspondente, as classes de toxinas identificadas após digestão tripsínica em gel e identificação por LC-MS/MS. As proteínas identificadas estão listadas nas Tabelas Suplementares 9 a 11. (C-) Controle negativo: resina de estreptavidina-Sepharose incubada com veneno. M: padrões de massa molecular. Proteínas coradas com Coomassie Blue G.

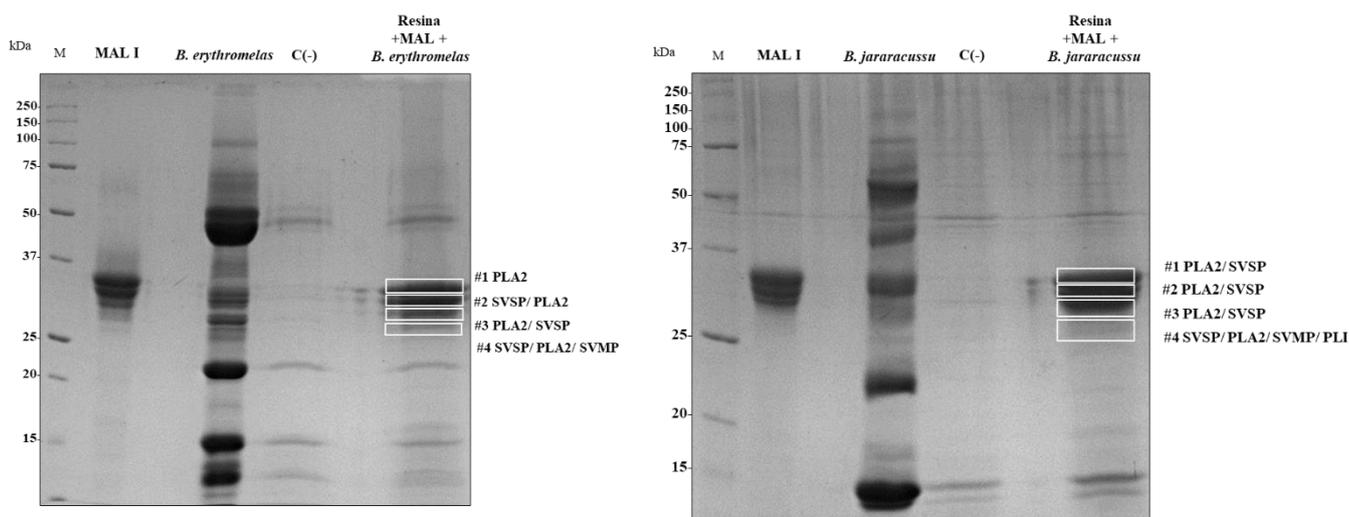


Figura 17. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras dos venenos de *B. erythromelas* e *B. jararacussu* obtidas em ensaio de *pull down* utilizando a lectina MAL I. Nos géis estão indicadas as bandas recortadas e ao lado, com o número correspondente, as classes de toxinas identificadas após digestão tripsínica em gel e identificação por LC-MS/MS. As proteínas identificadas estão listadas nas Tabelas Suplementares 12 e 13. (C-) Controle negativo: resina de estreptavidina-Sepharose incubada com veneno. M: padrões de massa molecular. Proteínas coradas com Coomassie Blue G.

Considerando as classes de toxinas identificadas nas bandas de proteínas (Figuras 14 a 17), verifica-se que a lectina MAL I possibilitou o enriquecimento de diferentes classes de toxinas entre os venenos, com massas moleculares de 30 a 250 kDa. Esses resultados também indicam que a sialilação em glicanos na posição α 2-3 está amplamente distribuída entre as proteínas, e principalmente em alguns venenos, como foi o caso de *B.*

cotiara, *B. fonsecai*, *B. insularis* e *B. jararaca* que mostraram um número maior de grupos de proteínas identificadas na fração reconhecida pela MAL I, do que os outros venenos.

Ainda, a identificação de proteínas em gel, revelou a presença de diferentes proteínas nas bandas individuais, reforçando a vantagem da identificação por LC-MS/MS, que pode mostrar a diversidade de proteínas, que não seria prevista apenas pelo perfil eletroforético unidimensional.

As proteínas identificadas em gel foram reunidas na Tabela Suplementar 14, onde foram eliminadas as redundâncias de identificações, e a Tabela 5 resume os números de grupos de proteínas identificados, de acordo com as classes de toxinas.

Tabela 5. Número de grupos de proteínas identificados a partir do ensaio de *pull down* entre MAL I e venenos do gênero *Bothrops*.

Classe de toxina	Venenos do gênero <i>Bothrops</i>								
	<i>B. atrox</i>	<i>B. cotiara</i>	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. fonsecai</i>	<i>B. insularis</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>B. jararacussu</i>	<i>B. moojeni</i>	<i>B. neuwiedi</i>
SVMP	0	10	1	11	13	24	1	3	5
SVSP	1	11	6	10	11	21	2	6	4
LAAO	0	4	0	1	2	3	0	0	0
PLA2	2	1	1	4	5	4	2	5	3
PLB	0	2	0	1	1	1	0	0	0
CTL	0	4	0	2	6	3	0	0	2
OT	0	16	0	7	14	15	1	0	3
Total	3	48	8	36	52	71	6	14	17

De acordo com a quantidade de toxinas identificadas, os venenos de *B. cotiara*, *B. fonsecai*, *B. insularis* e *B. jararaca* mostraram números mais altos, em concordância com os perfis eletroforéticos mostrados na Figura Suplementar 3.

Quanto às classes de toxinas, SVMPs e SVSPs foram identificadas na fração retida pela MAL I de quase todos os venenos analisados. Outra classe de toxina presente em todas as frações enriquecidas pela MAL I foi a das PLA2s, que não são putativamente glicosiladas.

Ainda, quanto à distribuição de proteínas identificadas entre as espécies de venenos é possível observar a grande variação encontrada, como mostrado na Figura 18. Considerando a distribuição das proteínas identificadas, verificou-se que os venenos de *B. atrox*, *B. erythromelas* e *B. jararacussu* foram os que resultaram nas menores quantidades de proteínas capturadas pelo sistema de *pull down* com a lectina MAL I (Tabela 5, Figura 18).

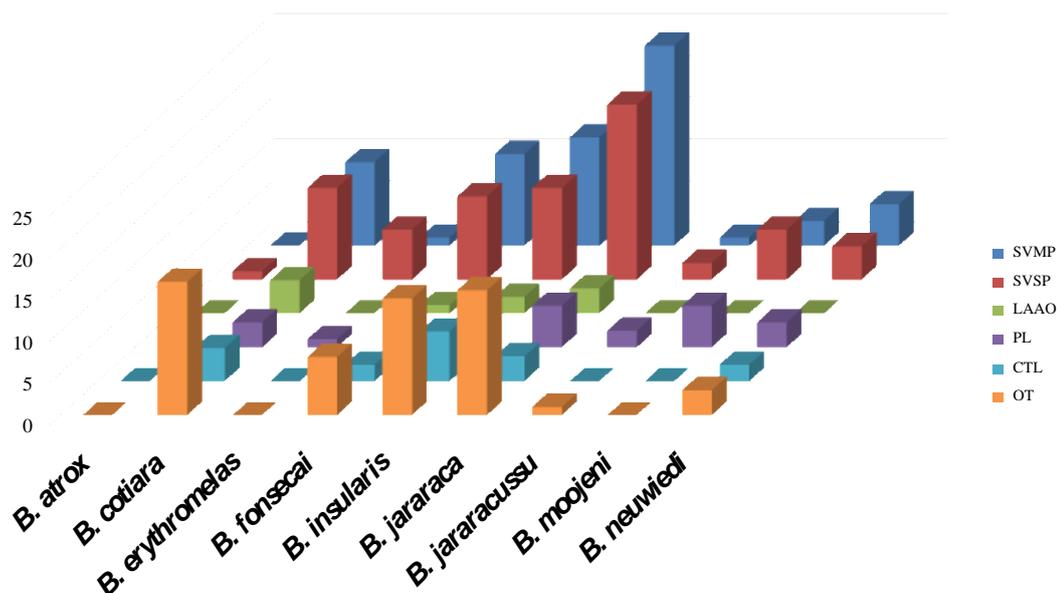


Figura 18. Representação gráfica da distribuição de proteínas identificadas nas frações enriquecidas em ensaio de *pull down* entre a lectina MAL I e venenos do gênero *Bothrops*. Os valores no eixo y indicam o número de grupos de proteínas identificados.

Esses achados reforçam como a presença de ácido siálico na posição $\alpha 2,3$ parece ser peculiar em toxinas de serpentes, como é o caso da metaloprotease RVV-X do veneno de *Daboia siamensis*¹³³ e das serinoproteases batroxobin, isolada do veneno de *B. moojeni*¹⁵⁸, acutobin de *Deinagkistrodon acutus*¹³², e da enzima tipo-trombina de *Agkistrodon rhodostoma*¹⁵⁹, em cujas estruturas de N-glicanos foi descrita a presença do dímero NeuAc $\alpha 2-3$ GalNAc. Por fim, a identificação de componentes de alta massa molecular, enriquecidos pela MAL I, como algumas PDEs, 5'-Nases, APases e Hyals, descritos na Figura Suplementar 4, confirma a complexidade das toxinas menos abundantes (OT) que foram enriquecidas de forma diferenciada entre os venenos.

Quanto às proteínas comuns entre os venenos, que foram enriquecidos pela lectina MAL I (Figura 19), é possível identificar que, diferente da PHA-E, as diferentes intersecções de proteínas mostraram quantidades variáveis de proteínas entre os venenos analisados. E de forma semelhante ao que foi observado no caso da lectina SNA, não foram encontradas proteínas comuns a todos os venenos avaliados.

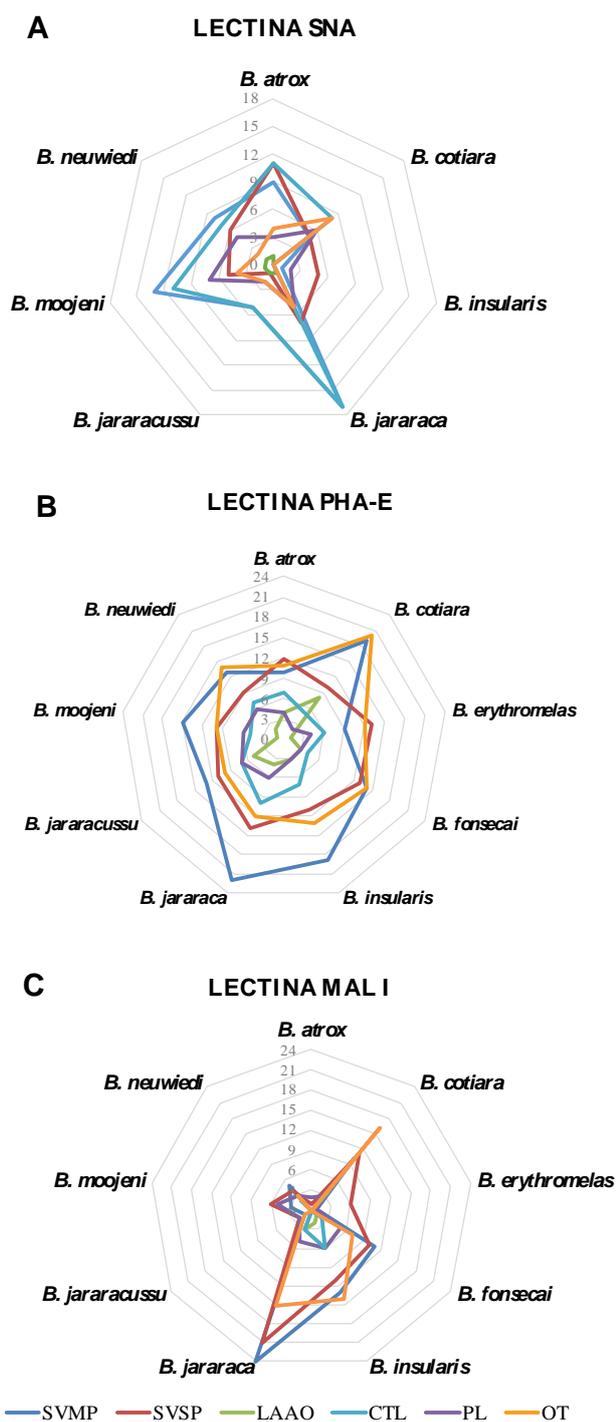


Figura 20. Representação gráfica de radar da distribuição das proteínas de venenos do gênero *Bothrops* enriquecidas pelas lectinas SNA (A), PHA-E (B) e MAL I (C), de acordo com os venenos nos quais estas foram identificadas. Os números nos gráficos representam as quantidades de grupos de proteínas identificados nas frações retidas em cada experimento de afinidade com lectina.

A apresentação dos dados em forma bidimensional, pelo gráfico de radar, possibilita avaliar a distribuição dos grupos de proteínas enriquecidas pelas lectinas

considerando todos os venenos analisados. Assim, a Figura 20, mostra que no caso da lectina PHA-E, as proteínas identificadas, de acordo com a quantidade e classe de toxina, distribuíram-se de forma relativamente homogênea entre os venenos do gênero *Bothrops*. Ainda, pode-se observar que as lectinas MAL I e SNA, apesar de ambas reconhecerem resíduos de ácido siálico em glicanos, mostraram perfis de distribuição distintos, indicando que essas lectinas reconheceram populações de proteínas com distribuição diferente entre as espécies. Da mesma forma, os gráficos de radar evidenciaram que as toxinas foram enriquecidas de forma diferenciada entre as espécies pelas lectinas SNA e MAL I.

Quando considerado o universo de proteínas totais identificadas nas frações retidas pelas lectinas SNA, PHA-E e MAL I, 507 são proteínas únicas dos nove venenos (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) (Tabela Suplementar 15). A distribuição das proteínas únicas identificadas está mostrada em diagrama de *Venn* (Figura 21), onde observa-se que 102 proteínas foram comumente enriquecidas pelas três lectinas (Tabela 6), sendo a maioria delas SVMPs (28).

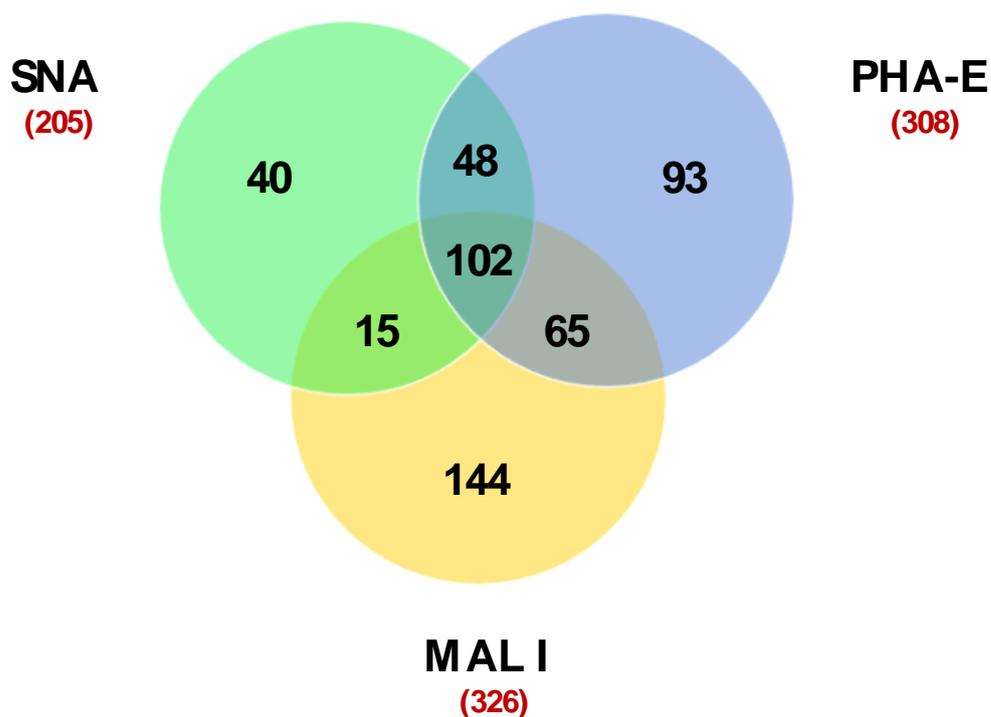


Figura 21. Diagrama de *Venn* ilustrando os grupos de proteínas compartilhadas e exclusivamente identificadas nas frações enriquecidas pelas lectinas SNA, PHA-E e MAL I considerando todos os venenos do gênero *Bothrops* analisados. Os números em parênteses indicam as quantidades de grupos de proteínas exclusivamente identificadas nas frações enriquecidas pelas lectinas.

Tabela 6. Lista de 102 proteínas únicas identificadas nas frações de nove venenos do gênero *Bothrops* enriquecidas pelas lectinas SNA, PHA-E e MAL I.

Classe de toxina	Acesso #	Descrição	Sítio putativo de N-glicosilação*	Sítio putativo de O-glicosilação*
5'-Nase	A0A1L8D667	Ecto-5'-nucleotidase OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
5'-Nase	T2HRS9	Ecto-5'-nucleotidase (Fragment) OS= <i>Protobothrops flavoviridis</i> OX=88087 PE=2 SV=1	S	S
5'-Nase	A0A077L7M9	Ecto-5'-nucleotidase OS= <i>Protobothrops flavoviridis</i> OX=88087 PE=2 SV=1	S	S
APase	A0A0B8RNS9	Xaa-Pro aminopeptidase 2 OS= <i>Boiga irregularis</i> OX=92519 PE=3 SV=1	S	S
CRISP	F2Q6G1	Cysteine-rich secretory protein Da-CRPs (Fragment) OS= <i>Deinagkistrodon acutus</i> OX=36307 PE=2 SV=1	S	S
CRISP	F2Q6E5	Cysteine-rich secretory protein Ch-CRPs (Fragment) OS= <i>Crotalus horridus</i> OX=35024 PE=2 SV=1	S	S
CRISP	F2Q6E9	Cysteine-rich secretory protein Ch-CRPIb (Fragment) OS= <i>Crotalus horridus</i> OX=35024 PE=2 SV=1	S	S
CRISP	F2Q6E8	Cysteine-rich secretory protein Ch-CRPIa (Fragment) OS= <i>Crotalus horridus</i> OX=35024 PE=2 SV=1	S	S
CRISP	F2Q6E6	Cysteine-rich secretory protein Ch-CRPs (Fragment) OS= <i>Crotalus horridus</i> OX=35024 PE=2 SV=1	S	S
CRISP	F2Q6E7	Cysteine-rich secretory protein Ch-CRPs (Fragment) OS= <i>Crotalus horridus</i> OX=35024 PE=2 SV=1	S	S
CRISP	BJAR454CRISP1	sp BJAR454CRISP1 BJAR454CRISP1	S	S
CTL	P86970	C-type lectin BpLec OS= <i>Bothrops pauloensis</i> OX=1042543 PE=1 SV=2	N	N
CTL	P83519	C-type lectin BJcuL OS= <i>Bothrops jararacussu</i> OX=8726 PE=1 SV=2	N	N
CTL	A0A1L8D654	BATXCTL20 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	N
CTL	A0A1L8D661	BATXCTL12 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	N
CTL	A0A1W7RK04	C-type lectin 8 OS= <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> OX=8713 PE=4 SV=1	N	N
CTL	A0A1L8D653	BATXCTL6 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	N
CTL	P22030	Snaclec botrocetin subunit beta OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=2	N	N
CTL	BJAR454CTL02	sp BJAR454CTL02 BJAR454CTL02	N	N

CTL	Q6QX33	C-type lectin BiL OS= <i>Bothrops insularis</i> OX=8723 PE=1 SV=1	N	N
CTL	BJAR454CTL10	sp BJAR454CTL10 BJAR454CTL10	N	N
CTL	BJAR454CTL15	sp BJAR454CTL15 BJAR454CTL15	N	N
CTL	M1V359	Botrocetin-2 alpha OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 GN=bot-2A PE=2 SV=1	N	N
CTL	M1VNP5	Botrocetin-2 beta OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 GN=bot-2B PE=2 SV=1	N	N
CTL	BJAR454CTL01	sp BJAR454CTL01 BJAR454CTL01	N	N
CTL	Q9PSM5	Snaclec GPIB-binding protein subunit beta OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=1	N	N
CTL	BJAR454CTL06	sp BJAR454CTL06 BJAR454CTL06	N	N
DPase	J3SEA2	Dipeptidase OS= <i>Crotalus adamanteus</i> OX=8729 PE=2 SV=1	S	S
Hyal	A0A1L8D603	Hyaluronidase OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	N
Hyal	A0A2H4N3E2	Hyaluronidase (Fragment) OS= <i>Bothrops moojeni</i> OX=98334 PE=2 SV=1	S	N
Hyal	BJAR454HYALU1	sp BJAR454HYALU1 BJAR454HYALU1	S	N
LAAO	BJAR454LAO2	sp BJAR454LAO2 BJAR454LAO2	S	S
PDE	A0A1L8D6B7	BATXPDE1 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	Y
PLA2	BJAR454PLA24	sp BJAR454PLA24 BJAR454PLA24	N	N
PLA2	A0A1S5XW05	Basic phospholipase A2 homolog BomoTx OS= <i>Bothrops moojeni</i> OX=98334 PE=1 SV=1	N	N
PLA2	A0A2H4N391	Basic phospholipase A2 myotoxin (Fragment) OS= <i>Bothrops moojeni</i> OX=98334 PE=2 SV=1	N	N
PLA2	Q8QG87	Acidic phospholipase A2 BITP01A OS= <i>Bothrops insularis</i> OX=8723 PE=1 SV=1	N	N
PLA2	P81243	Acidic phospholipase A2 OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=1	N	N
PLA2	A0A1L8D5Z4	BATXPLA1 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	N
PLA2	A0A1L8D611	BATXPLA3 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	N
PLB	A0A2H4N395	Phospholipase B-like (Fragment) OS= <i>Bothrops moojeni</i> OX=98334 PE=2 SV=1	S	S
PLB	A0A1W7RB94	Phospholipase B-like OS= <i>Crotalus adamanteus</i> OX=8729 PE=3 SV=1	S	S
PLB	A0A1W7RER1	Phospholipase B-like OS= <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> OX=8713 PE=3 SV=1	S	N

PLB	BJAR454PLB1	sp BJAR454PLB1 BJAR454PLB1	S	S
SVMP	A0A1L8D5Y9	BATXSVMPI5 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	S
SVMP	A0A1L8D6A8	BATXSVMPI4 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	S
SVMP	A0A0K2JNB8	Snake venom metalloproteinase OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
SVMP	BJAR454SVMPPII I03	sp BJAR454SVMPPIII03 BJAR454SVMPPIII03	S	S
SVMP	A0A1L8D6A9	BATXSVMPII2 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	S
SVMP	P86976	Zinc metalloproteinase barnettlysin-1 OS= <i>Bothrops barnetti</i> OX=1051630 PE=1 SV=1	N	N
SVMP	A0A1L8D649	BATXSVMPII7 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
SVMP	BJAR454SVMPPII I11	sp BJAR454SVMPPIII11 BJAR454SVMPPIII11	S	S
SVMP	BJAR454SVMPPII I05	sp BJAR454SVMPPIII05 BJAR454SVMPPIII05	S	S
SVMP	Q5W959	Snake venom serine protease HS114 OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=1	S	N
SVMP	P30431	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like jararhagin (Fragment) OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=1	S	S
SVMP	BJAR454SVMPPII I02	sp BJAR454SVMPPIII02 BJAR454SVMPPIII02	S	S
SVMP	Q8QG88	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BITM06A OS= <i>Bothrops insularis</i> OX=8723 PE=2 SV=1	S	S
SVMP	BJAR454SVMPPII I08	sp BJAR454SVMPPIII08 BJAR454SVMPPIII08	S	S
SVMP	A0A1L8D6A0	Snake venom metalloproteinase OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
SVMP	A0A1L8D5Z1	Snake venom metalloproteinase OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
SVMP	A0A1L8D641	Snake venom metalloproteinase OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
SVMP	BJAR454SVMPPII I10	sp BJAR454SVMPPIII10 BJAR454SVMPPIII10	S	S
SVMP	A0A1L8D646	Snake venom metalloproteinase OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
SVMP	E3UJL4	MP_I2 SVMP (Fragment) OS= <i>Bothrops neuwiedi</i> OX=95648 PE=2 SV=1	N	S

SVMP	BJAR454SVMPPII07	sp BJAR454SVMPPIII07 BJAR454SVMPPIII07	S	S
SVMP	Q8UVG0	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like berythracivase OS= <i>Bothrops erythromelas</i> OX=44710 PE=1 SV=1	S	S
SVMP	BJAR454SVMPPII09	sp BJAR454SVMPPIII09 BJAR454SVMPPIII09	S	S
SVMP	Q98SP2	Zinc metalloproteinase/disintegrin OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=1	N	S
SVMP	BJAR454SVMPPII05	sp BJAR454SVMPPIII05 BJAR454SVMPPIII05	N	S
SVMP	Q98UF9	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like HF3 OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=3	S	S
SVMP	BJAR454SVMPPII04	sp BJAR454SVMPPIII04 BJAR454SVMPPIII04	S	S
SVMP	E3UJL2	MP_III3 SVMP (Fragment) OS= <i>Bothrops neuwiedi</i> OX=95648 PE=2 SV=1	S	S
svNGF	A0A6B2F1G5	NGF domain-containing protein OS= <i>Bothriechis nigroviridis</i> OX=88079 PE=3 SV=1	N	S
svNGF	BJAR454NGF1	sp BJAR454NGF1 BJAR454NGF1	N	S
svNGF	A0A194ARN2	Venom nerve growth factor OS= <i>Sistrurus tergeminus</i> OX=8757 PE=3 SV=1	N	S
svNGF	B1Q3K2	Nerve growth factor OS= <i>Protobothrops flavoviridis</i> OX=88087 PE=2 SV=1	N	S
svNGF	A0A1W7RFB5	Venom nerve growth factor OS= <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> OX=8713 PE=3 SV=1	N	S
svNGF	Q90W38	Venom nerve growth factor OS= <i>Bothrops jararacussu</i> OX=8726 GN=NGF PE=2 SV=1	N	S
svNGF	A0A6B2FCN7	NGF domain-containing protein OS= <i>Bothriechis nubestris</i> OX=1766655 PE=3 SV=1	N	S
svNGF	A0A194ARS6	Venom nerve growth factor OS= <i>Agkistrodon piscivorus</i> OX=8715 PE=3 SV=1	N	S
svNGF	A0A1L8D608	BATXNGF1 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	S
svNGF	A0A077L854	Nerve growth factor (Fragment) OS= <i>Protobothrops flavoviridis</i> OX=88087 PE=2 SV=1	N	S
svNGF	T2HPR2	Nerve growth factor OS= <i>Ovophis okinavensis</i> OX=8769 PE=2 SV=1	N	S
SVSP	A0A1L8D5R9	BATXSVSP17 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
SVSP	A0A1L8D664	BATXSVSP16 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	S
SVSP	BJAR454SVSP08	sp BJAR454SVSP08 BJAR454SVSP08	S	S

SVSP	BJAR454SVSP04	sp BJAR454SVSP04 BJAR454SVSP04	S	N
SVSP	A0A1L8D5T9	BATXSVSP20 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	N
SVSP	BJAR454SVSP03	sp BJAR454SVSP03 BJAR454SVSP03	N	N
SVSP	BJAR454SVSP10	sp BJAR454SVSP10 BJAR454SVSP10	S	N
SVSP	A0A1L8D5V4	BATXSVSP13 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	N
SVSP	A0A1L8D5W4	BATXSVSP3 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	N
SVSP	A0A1L8D620	BATXSVSP1 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	N
SVSP	A0A1L8D5U9	BATXSVSP10 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	N
SVSP	P0CG03	Thrombin-like enzyme bhalternin OS= <i>Bothrops alternatus</i> OX=64174 PE=1 SV=1	S	S
SVSP	Q072L6	Thrombin-like enzyme asperase OS= <i>Bothrops asper</i> OX=8722 PE=1 SV=1	S	N
SVSP	BJAR454SVSP01	sp BJAR454SVSP01 BJAR454SVSP01	S	N
SVSP	Q7T229	Snake venom serine protease homolog OS= <i>Bothrops jararacussu</i> OX=8726 PE=1 SV=1	S	N
SVSP	A0A2H4N390	Snake venom metalloproteinase BmooMPalpha-I-like isoform (Fragment) OS= <i>Bothrops moojeni</i> OX=98334 PE=2 SV=1	N	N
SVSP	A0A1L8D5V0	BATXSVSP8 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	N	N
SVSP	A0A1L8D5U8	BATXSVSP7 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	S	N
SVSP	Q5W958	Venom serine proteinase-like HS120 OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=2 SV=1	S	N

*Sítios putativos de N- e O-glicosilação preditos utilizando as ferramentas NetNGlyc e NetOGlyc.

S= presente

N= ausente

Finalmente, considerando todas as proteínas únicas identificadas neste estudo nas frações enriquecidas por SNA, PHA-E e MAL I (Tabela Suplementar 15), as Figuras, respectivamente, 22, 23 e 24, mostram a visualização gráfica dos dois agrupamentos hierárquicos da caracterização dos subproteomas, considerando para cada par (veneno, proteína) a presença ou ausência de uma dada proteína única em cada um dos subproteomas.



Figura 22. Representação gráfica dos agrupamentos hierárquicos de venenos do gênero *Bothrops* de acordo com a composição dos subproteomas pelo enriquecimento por cromatografia de afinidade com a lectina SNA, considerando todas as proteínas identificadas. Para cada par (veneno, proteína) o gráfico indica se a proteína está presente (vermelho) ou ausente (preto).

A Figura 22 indica que o veneno de *B. neuwiedi* apresentou a composição de proteínas com afinidade pela lectina SNA mais distinta, enquanto os venenos de *B. insularis* e *B. jararaca*, que são espécies do complexo Jararaca, não se agruparam. De forma geral, este agrupamento hierárquico não refletiu a classificação das espécies de acordo com a filogenia ²⁵, sugerindo que a lectina SNA possivelmente enriqueceu proteínas que não foram amplamente distribuídas entre os venenos analisados, como observado na Figura 20A, que mostra as diferentes distribuições das toxinas entre os venenos. Por outro lado, a visualização gráfica do agrupamento hierárquico do subproteoma enriquecido pela lectina PHA-E (Figura 23) evidenciou quatro principais agrupamentos: *B. jararaca* e *B. insularis*, *B. fonsecai* e *B. cotiara*, *B. moojeni* e *B. erythromelas*, e *B. atrox*, *B. neuwiedi* e *B. jararacussu*.

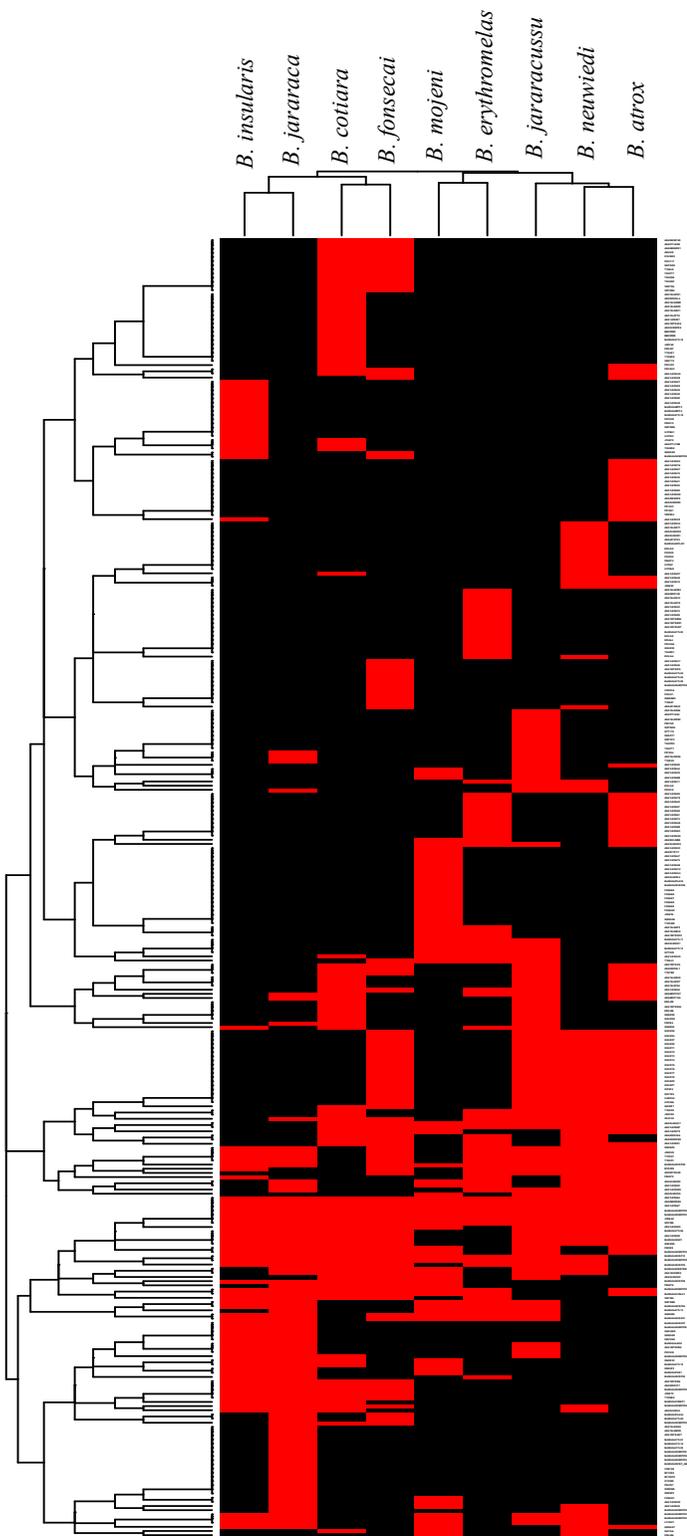


Figura 23. Representação gráfica dos agrupamentos hierárquicos de venenos do gênero *Bothrops* de acordo com a composição dos subproteomas pelo enriquecimento por cromatografia de afinidade com a lectina PHA-E, considerando todas as proteínas identificadas. Para cada par (veneno, proteína) o gráfico indica se a proteína está presente (vermelho) ou ausente (preto).

Por outro lado, no agrupamento hierárquico obtido com o subproteoma de proteínas enriquecidas pela MAL I (Figura 24) verifica-se que esta lectina separou os venenos em dois principais agrupamentos: um contendo *B. jararaca* e *B. insularis*, e outro contendo os demais venenos, ainda que com diferentes graus de agrupamento.

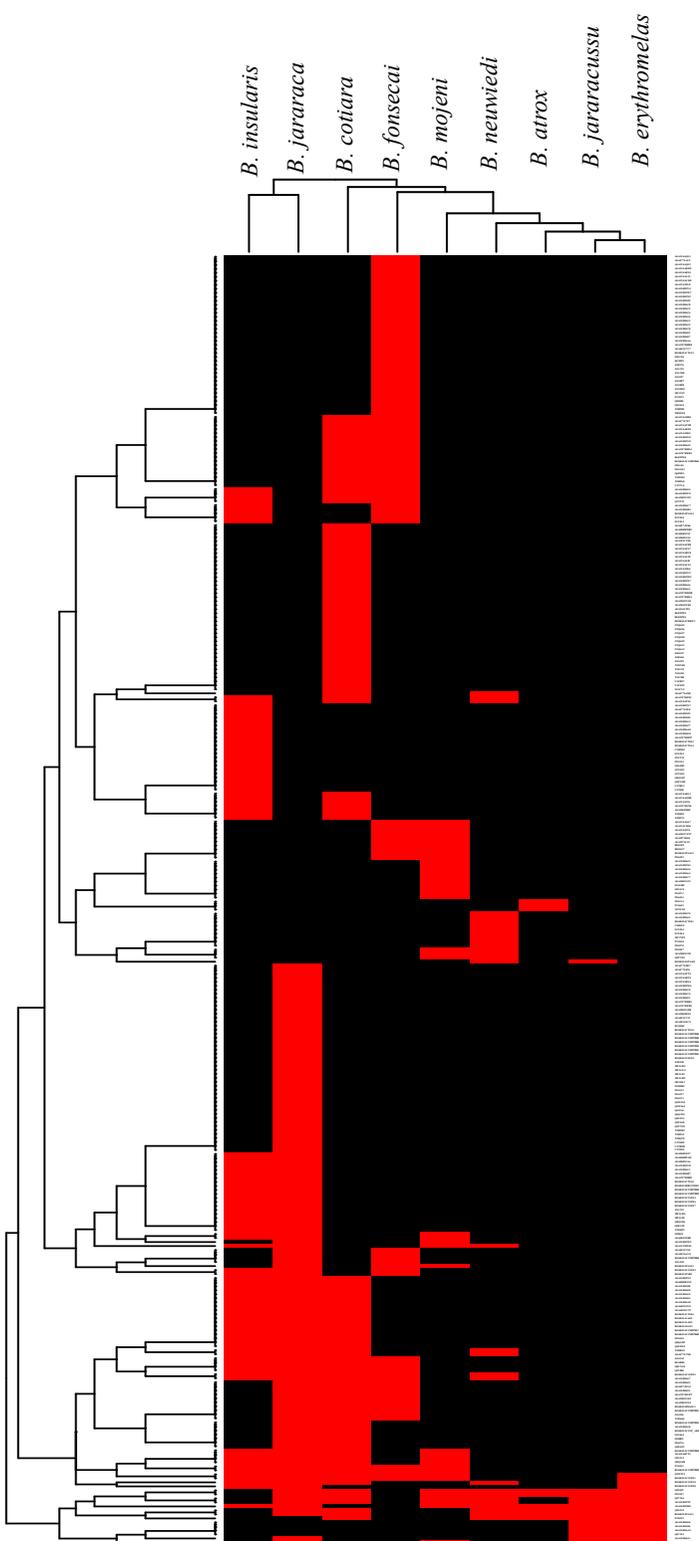


Figura 24. Representação gráfica dos agrupamentos hierárquicos de venenos do gênero *Bothrops* de acordo com a composição dos subproteomas pelo enriquecimento por ensaio de *pull down* com a lectina MAL I, considerando todas as proteínas identificadas. Para cada par (veneno, proteína) o gráfico indica se a proteína está presente (vermelho) ou ausente (preto).

Por fim, considerando todos os subproteomas obtidos com as três lectinas foi possível obter o agrupamento hierárquico da Figura 25.

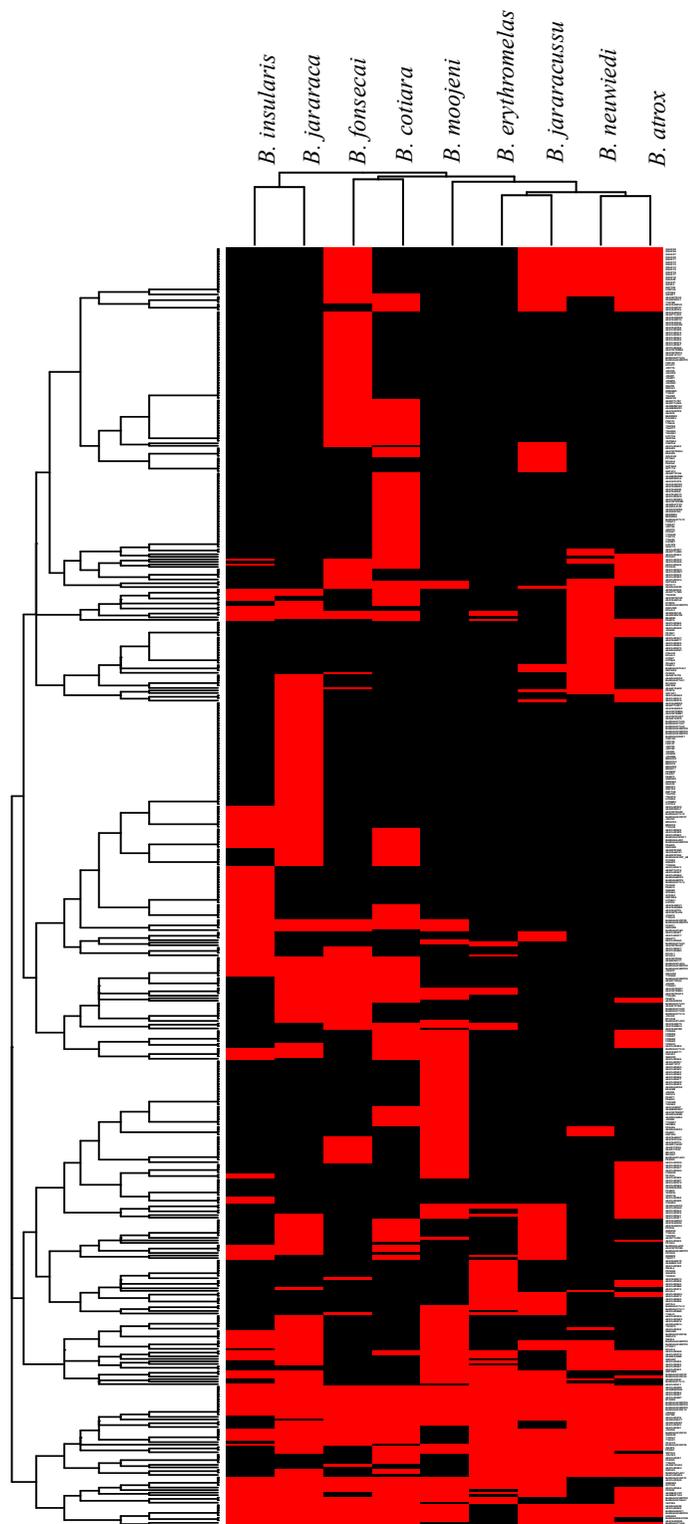


Figura 25. Representação gráfica dos agrupamentos hierárquicos de venenos do gênero *Bothrops* de acordo com a composição dos subproteomas pelo enriquecimento por cromatografia de afinidade com a lectinas SNA, PHA-E, MAL I, considerando todas as proteínas identificadas. Para cada par (veneno, proteína) o gráfico indica se a proteína está presente (vermelho) ou ausente (preto).

Nesta análise, os venenos formaram três principais grupos, mostrando um perfil semelhante ao que foi obtido por Andrade-Silva e colaboradores ¹³¹ ao analisar 52 composições de *N*-glicanos identificadas em oito venenos do gênero *Bothrops*. Os autores classificaram os venenos em três grupos, de acordo com as composições de *N*-glicanos compartilhadas. Dessa forma, os venenos do Complexo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca*) formaram um grupo distinto (grupo 1) daquele composto por *B. erythromelas*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (grupo 2), enquanto o veneno de *B. cotiara* (grupo 3) apresentou a composição N-glicômica mais distinta. Os venenos do grupo 1 continham principalmente glicanos com lactosamina dissialilada, nos venenos do grupo 2 antenas contendo a composição NeuAc-GalNAc eram as mais abundantes. Já no veneno de *B. cotiara* apresentou estruturas com dímeros de ácido siálico e unidades de lactosamina similarmente ao grupo 1, além da estrutura GlcNAc bissecante. Embora a glicosilação de proteínas não seja definida por um *template*, como é o caso da biossíntese de DNA, RNA e proteínas, os *N*-glicomas desses venenos espelharam a classificação filogenética das serpentes botropóides sul-americanas, definida por dados morfológicos e moleculares. E de fato, no caso dos venenos do presente estudo (*B. atrox* e *B. fonsecai*), e que não fizeram parte do estudo anterior ¹³¹, verifica-se que o primeiro está distante filogeneticamente dos outros venenos, enquanto o segundo é filogeneticamente próximo a *B. cotiara*, como descrito por Fenwick e colaboradores ²⁵.

Assim, o agrupamento de venenos de *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *B. atrox* neste estudo apresenta semelhanças com o grupo 2 descrito acima, *B. jararaca* e *B. insularis* agruparam como observado no grupo 1, enquanto *B. cotiara* e *B. fonsecai* formaram mais um agrupamento (Figura 25).

4.1.5 Detecção de glicoproteínas por *blot* de lectina

Com o objetivo de detectar a presença de glicoproteínas contendo ácido siálico e a estrutura *bisecting* GlcNAc nos venenos, por outras abordagens, utilizou-se a técnica de *blot*, na qual a detecção das estruturas de glicanos ocorreu utilizando lectinas marcadas com digoxigenina.

Apesar da diferença de sensibilidade entre o método de *blot* de lectina e aquele que envolve o enriquecimento de proteínas por cromatografia de afinidade ou *pull down* usando lectina e posterior identificação por espectrometria de massas, o *blot* pode servir

como ferramenta complementar à detecção de estruturas específicas de glicanos em glicoproteínas.

Assim, para a avaliação da presença de ácido siálico nas configurações $\alpha 2-3$ e $\alpha 2-6$ em estruturas de *N*-glicanos em venenos de *Bothrops*, foi empregado o kit de diferenciação DIG Glycan (Roche) contendo as lectinas SNA e MAA (sigla que aqui representa a mistura de MAL I e MAL II).

A Figura 26 mostra que no caso do *blot* com a SNA, mesmo com a aplicação de 50 μ g de proteínas na eletroforese, a presença de ácido siálico na configuração $\alpha 2-6$ não foi detectada em nenhum dos venenos analisados. Este resultado, quando comparado ao obtido pela cromatografia de afinidade usando esta lectina, o qual permitiu a identificação de glicoproteínas em sete venenos, pode ser explicado pelas diferenças no modo de acesso da lectina às proteínas do veneno, visto que na cromatografia de afinidade a lectina estava imobilizada em agarose, podendo interagir com as proteínas do veneno em solução e em condição não desnaturante/não redutora, fato que deve ter facilitado a interação entre glicanos contendo ácido siálico na configuração $\alpha 2-6$ e a lectina. Possivelmente, no caso do *blot*, glicanos contendo ácido siálico não estavam espacialmente disponíveis nas proteínas após a eletroforese e transferência para a membrana de nitrocelulose, para interação com a SNA.

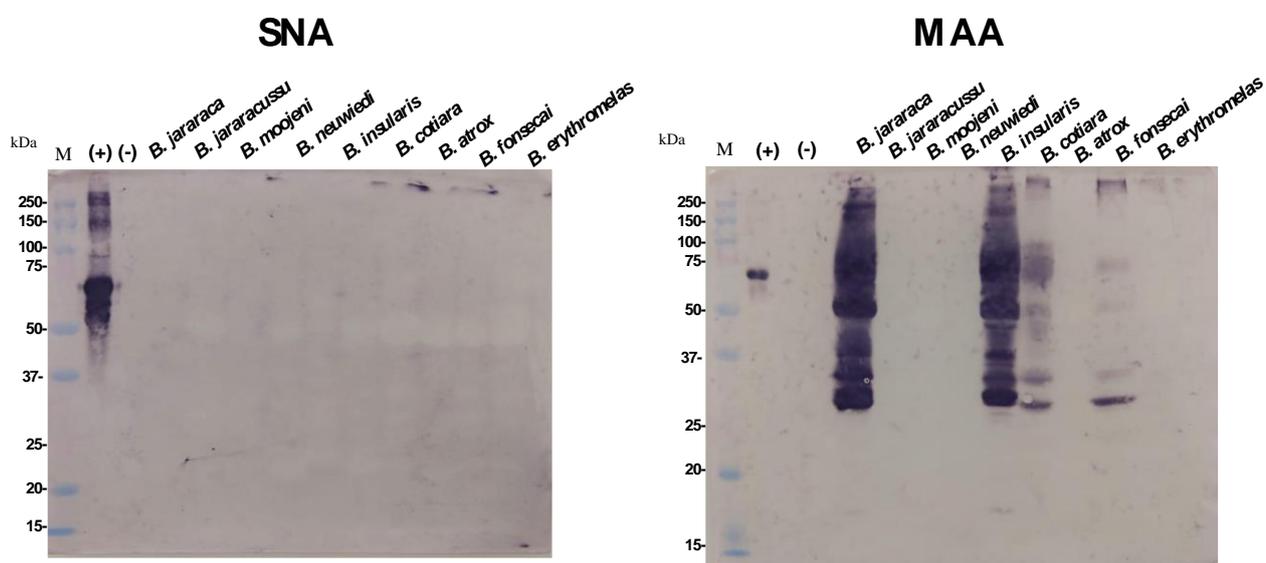


Figura 26. Ensaio de *blot* de lectina para detectar a presença de ácido siálico em proteínas de venenos do gênero *Bothrops* utilizando as lectinas SNA e MAA marcadas com digoxigenina. As proteínas dos venenos (SNA; 50 μ g; MAA; 20 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Revelação com substrato NBT/BCIP (-) Controle negativo: Asialofetuína; (+) Controle positivo: Fetuina. M: padrões de massa molecular.

Por outro lado, a lectina MAA reconheceu e se ligou a proteínas dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis*, *B. cotiara* e *B. fonsecai*, revelando bandas de 30 a 250 kDa, cujas proteínas contêm ácido siálico na posição α 2-3, possivelmente em maior abundância nos venenos de *B. jararaca* e *B. insularis*. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos no ensaio de *pull down*, onde esses venenos apresentaram o perfil eletroforético mais complexo (Figura Suplementar 3), enquanto os venenos de *B. cotiara* e *B. fonsecai* resultaram em números de grupos de proteínas mais baixos identificados por espectrometria de massas (Tabela 5).

Para avaliar a presença de proteínas contendo a estrutura *bisecting* GlcNAc em suas porções de *N*-glicanos, foi realizado o *blot* utilizando a lectina PHA-E biotilada (Figura 27) que revelou o reconhecimento de proteínas em todas os venenos, ainda que com diferentes intensidades. Esse resultado concordou com os achados de abundância das proteínas enriquecidas por essa lectina nas cromatografias de afinidade (Tabela 4), onde os venenos de *B. cotiara*, *B. fonsecai*, *B. insularis* e *B. jararaca* mostraram mais proteínas reconhecidas por essa lectina.

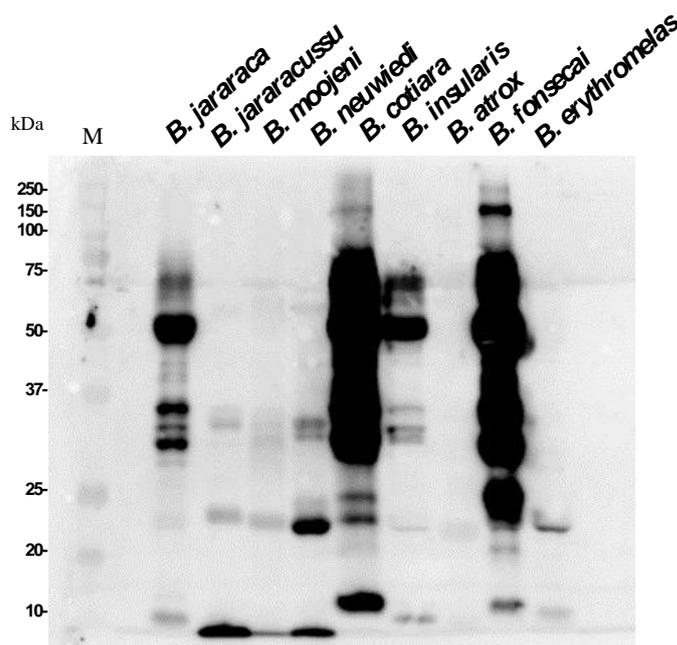


Figura 27. Ensaio de *blot* de lectina para detectar a presença da estrutura *bisecting* GlcNAc em proteínas de venenos do gênero *Bothrops* utilizando a lectina PHA-E biotilada. As proteínas (15 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose antes da revelação por quimioluminescência, utilizando um substrato para detecção de da atividade de peroxidase (HRP). M: padrões de massa molecular.

4.2. Efeito da remoção enzimática de ácido siálico na atividade proteolítica de venenos do gênero *Bothrops*

4.2.1. Reação de dessialilação de glicoproteínas

Com o objetivo de avaliar o papel de resíduos de ácido siálico nas atividades enzimáticas das proteases de venenos do gênero *Bothrops*, estes foram tratados com a enzima α 2-3,6,8,9-neuraminidase A em condições não desnaturantes. Os perfis eletroforéticos dos venenos analisados, não tratados e tratados com a neuraminidase, estão apresentados na Figura 28.

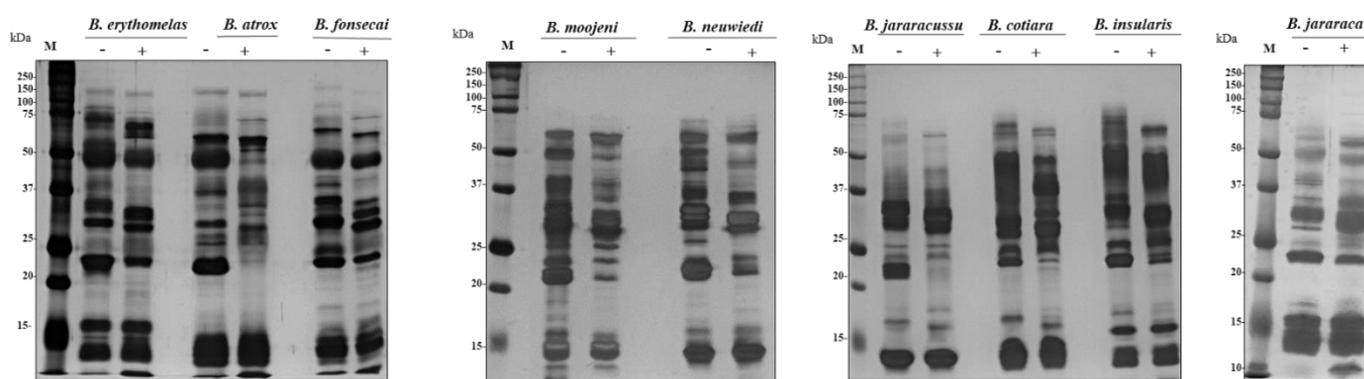


Figura 28. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) de venenos do gênero *Bothrops* (10 μ g) tratados ou não com a enzima neuraminidase. (-) Veneno não tratado; (+) Veneno tratado com neuraminidase. M: padrões de massa molecular. Proteínas coradas com nitrato de prata.

Essa análise mostrou que a incubação com a enzima neuraminidase alterou a mobilidade eletroforética de algumas proteínas, principalmente aquelas com massa molecular entre 25 e 50 kDa, provavelmente em razão da remoção de resíduos de ácido siálico terminais das cadeias de glicanos.

Alternativamente, a eficiência da remoção de resíduos de ácido siálico foi avaliada por *blot* com lectina, para detectar a presença desse monossacarídeo, após o tratamento dos venenos com a neuraminidase. Entretanto, só foi possível aplicar esta abordagem à avaliação dos venenos de *B. cotiara*, *B. insularis*, *B. jararaca* e *B. fonsecai* e somente com a lectina MAA, já que apenas no caso destes venenos ocorreu o reconhecimento de bandas de proteínas (Figura 29).

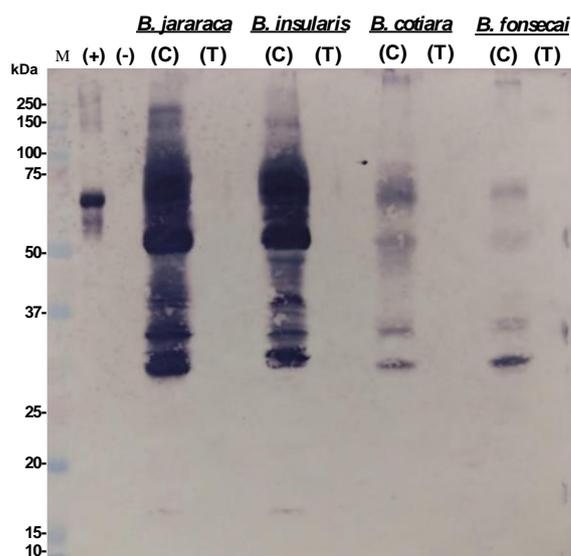


Figura 29. Ensaio de *blot* de lectina para avaliar a eficiência da remoção de resíduos de ácido siálico de proteínas de venenos do gênero *Bothrops*, utilizando a lectina MAA marcada com digoxigenina. As proteínas (30 µg) dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis*, *B. cotiara* e *B. fonsecai* (não tratados e tratados com neuraminidase) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. (-) Controle negativo: Asialofetuína; (+) Controle positivo: Fetuína. M: padrões de massa molecular. Revelação com substrato NBT/BCIP.

A Figura 29 mostra que as bandas de proteínas reconhecidas pela lectina MAA nos venenos íntegros desapareceram nas amostras de venenos tratados com a neuraminidase, sugerindo que ocorreu a remoção de resíduos de ácido siálico presentes em *N*-glicanos na configuração α 2-3.

Considerando os resultados da avaliação da remoção de ácido siálico, pelas análises de *blot* de lectina e perfil eletroforético dos venenos não tratados e tratados com a enzima neuraminidase, o estudo teve continuidade com a análise das atividades gelatinolítica, amidolítica, fibrinogenolítica e coagulante dos venenos.

4.2.2 Atividade gelatinolítica

4.2.2.1 Análise por zimografia de gelatina

A atividade proteolítica de venenos do gênero *Bothrops* sobre o substrato gelatina foi avaliada pela técnica de zimografia, em amostras não tratadas e tratadas com neuraminidase. Dessa forma, após a incubação das amostras de veneno com este substrato imobilizado no gel de poliácridamida, foram obtidos os perfis de degradação mostrados na Figura 30.

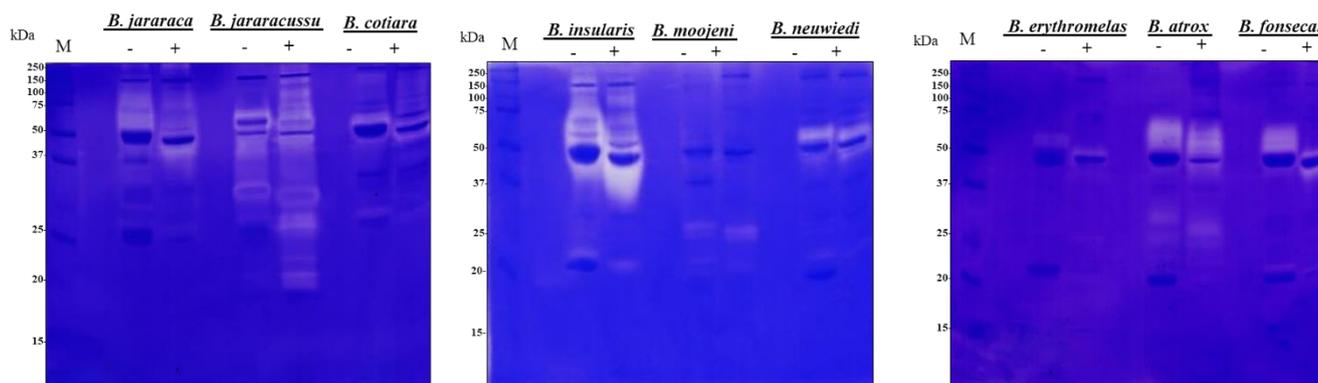


Figura 30. Atividade gelatinolítica de venenos do gênero *Bothrops* não tratados e tratados com neuraminidase, avaliada por zimografia. As amostras de veneno (25 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida polimerizado com gelatina, em condições não redutoras. (-) Veneno não tratado com neuraminidase; (+) Veneno tratado com neuraminidase. M: padrões de massa molecular. Coloração com Comassie Blue R.

Com exceção de *B. neuwiedi*, o processo de dessialilação dos venenos com a neuraminidase resultou na alteração da mobilidade eletroforética das bandas de proteínas com atividade sobre a gelatina, que, na maioria dos casos, se mostraram com massas moleculares mais baixas do que aquelas vistas nas amostras de venenos não submetidas à dessialização (Figura 30). Mudanças no perfil gelatinolítico de venenos de *Bothrops* também foram observadas por Andrade-Silva e colaboradores⁴¹, analisando amostras tratadas com a *N*-glicosidase F, uma enzima que remove oligossacarídeos dos tipos híbrido, complexo e rico em manose de *N*-glycoproteínas. No presente estudo, foi notável o perfil do veneno de *B. jararacussu*, cuja amostra tratada com a neuraminidase mostrou também bandas com atividade gelatinolítica com massas moleculares de 80 – 250 kDa, não presentes nas amostras de veneno íntegro.

Em continuidade, a atividade gelatinolítica dos venenos foi avaliada quantitativamente, utilizando o kit EnzCheck Gelatinase/Collagenase (Invitrogen), em que se emprega a gelatina conjugada com fluoresceína como substrato, em solução.

4.2.2.2 Análise por incubação em solução

Inicialmente, a reação de hidrólise da gelatina foi padronizada utilizando os venenos do gênero *Bothrops* sem tratamento com a neuraminidase. As curvas de atividades gelatinolítica obtidas (Figura Suplementar 5) mostraram que os venenos apresentam diferentes perfis de atividade gelatinolítica, sendo *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *B. cotiara* os menos ativos.

O tratamento com a enzima neuraminidase resultou na redução, ainda que em diferentes graus, da atividade gelatinolítica de todos os venenos (Figura 31).

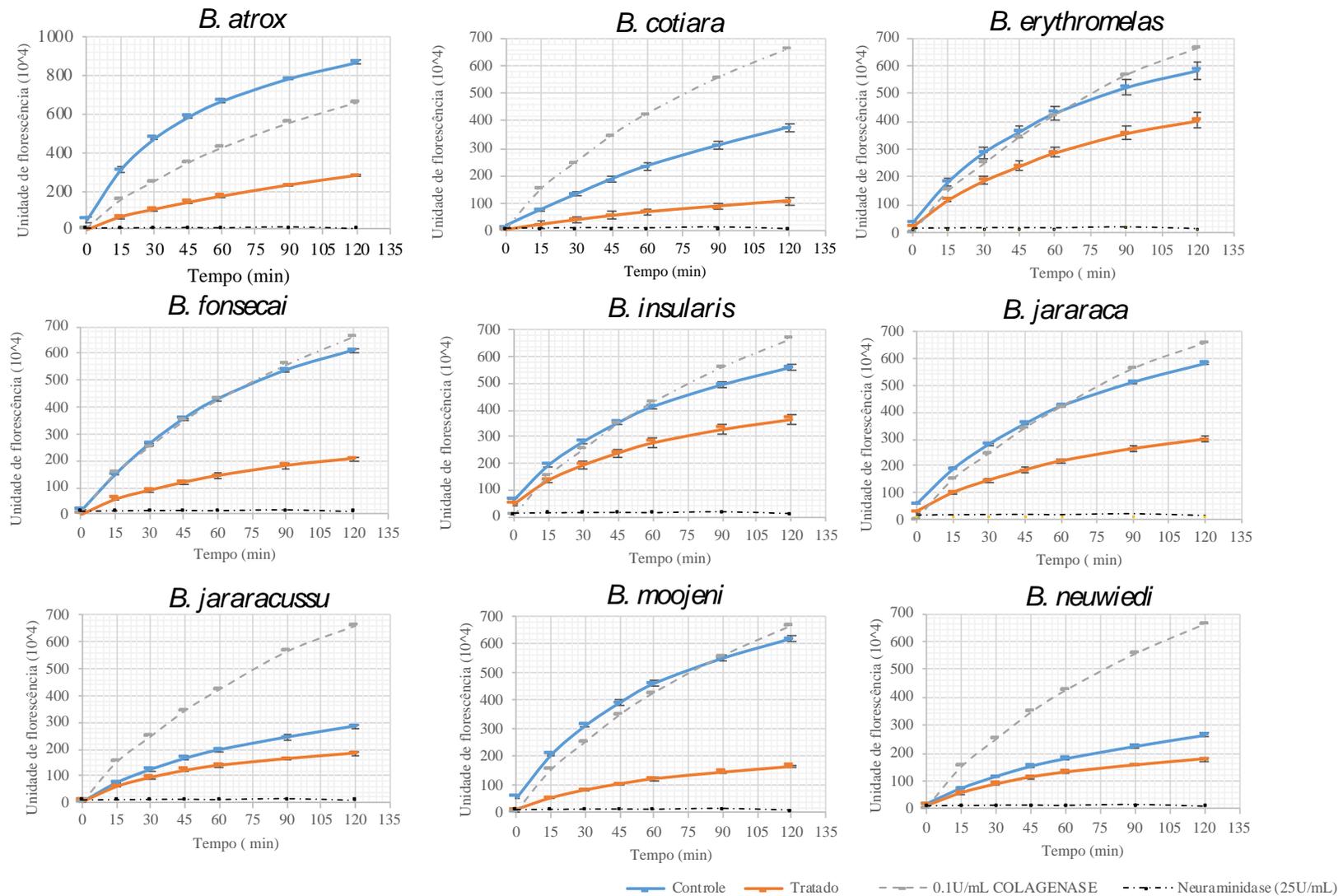


Figura 31. Atividade gelatinolítica de venenos do gênero *Bothrops*. Amostras de venenos (1 µg) não tratados e tratados com neuraminidase foram incubadas com gelatina conjugada com fluoresceína (5 µg) a 37 °C por 120 min. Fluorescência monitorada em Ex=480 nm e Em=530 nm. Os resultados estão apresentados como média ±DP, n=3.

A Tabela 7 mostra os cálculos de velocidade média e de atividade gelatinolítica residual dos venenos de *Bothrops* não tratados e tratados com a neuraminidase. A diminuição da atividade gelatinolítica variou entre 21% (*B. neuwiedi*) e 76% (*B. moojeni*) nas amostras tratadas com a enzima. Em conjunto, esses resultados corroboram estudos anteriores que mostraram perfis proteolíticos distintos em venenos do gênero *Bothrops*^{16,138} e diferentes graus de susceptibilidade das proteases desses venenos à remoção de seus *N*-glicanos⁴¹.

Tabela 7. Atividade gelatinolítica de venenos do gênero *Bothrops* não tratados e tratados com neuraminidase.

	<i>B. atrox</i>		<i>B. cotiara</i>		<i>B. erythromelas</i>	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Velocidade média* (UF x 10 ⁴ / min)	6,5	2,2	2,9	0,9	3,9	2,8
Atividade residual**		34%		31%		71%

	<i>B. fonsecai</i>		<i>B. insularis</i>		<i>B. jararaca</i>	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Velocidade média* (UF x 10 ⁴ / min)	5,6	1,8	3,6	3,1	4,5	2,1
Atividade residual**		31%		84%		46%

	<i>B. jararacussu</i>		<i>B. moojeni</i>		<i>B. neuwiedi</i>	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Velocidade média* (UF x 10 ⁴ / min)	1,8	1,0	5,0	1,2	4,0	3,1
Atividade residual**		53%		24%		79%

* A velocidade média foi calculada considerando a integração das curvas mostradas na Figura 31.

**A atividade residual representa a porcentagem da atividade gelatinolítica remanescente após incubação das amostras de venenos com a enzima neuraminidase.

4.2.3 Atividade amidolítica

O efeito da remoção de resíduos de ácido siálico das glicoproteínas dos venenos também foi avaliado pela determinação da atividade amidolítica, com o substrato Bz-Arg-pNA. Nesse ensaio os venenos mostraram diferentes atividades específicas que variaram cerca de 5 a 230 nmol min⁻¹mg⁻¹, indicando a presença de diferentes subproteomas de serinoproteases nos mesmos. E em contraste com o verificado para a atividade gelatinolítica, o perfil amidolítico dos venenos não se alterou significativamente após o tratamento com a neuraminidase (Figura 32), indicando que resíduos de ácido siálico não são essenciais para a

interação de serinoproteases com pequenos substratos, como Bz-Arg-pNA. A única exceção foi o veneno de *B. fonsecai*, cuja atividade amidolítica mostrou ligeira diminuição.

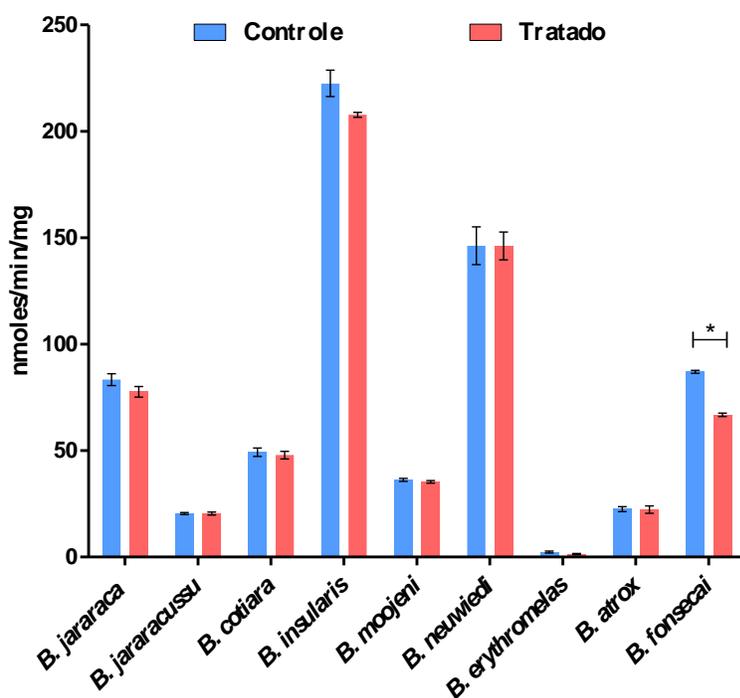


Figura 32. Atividade amidolítica de venenos do gênero *Bothrops*, não tratados e tratados com neuraminidase, sobre o substrato Bz-Arg-pNA. A atividade é expressa em nmol Bz-Arg-pNA hidrolisado por minuto e por mg de proteína. As barras representam médias \pm DP; n=3. *p*-valor calculado com base no teste *t*-Student (* = 0.01-0.05/ ** = 0.001-0.01/ *** < 0.001).

Efeito semelhante de dessialização foi reportado para a acutobina, uma serinoprotease do veneno de *Deinagkistrodon acutus* que, após tratamento com neuraminidase, apresentou atividade catalítica sob o substrato peptídico Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida semelhante à acutobina nativa ¹⁶⁰.

4.2.4 Atividade fibrinogenolítica

4.2.4.1 Análise por incubação em solução

Inicialmente, a atividade fibrinogenolítica de venenos de *Bothrops* foi avaliada por incubação com fibrinogênio em solução, que resultou em diferentes valores de atividade específica (Figura 33), indicando diferentes conteúdos de proteases capazes de hidrolisar esta proteína, nestes venenos. A incubação de fibrinogênio com os venenos tratados com a

neuraminidase resultou em perfis proteolíticos variáveis entre os venenos, e cinco deles (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*) mostraram suas atividades significativamente alteradas após a remoção de ácido siálico (Figura 33).

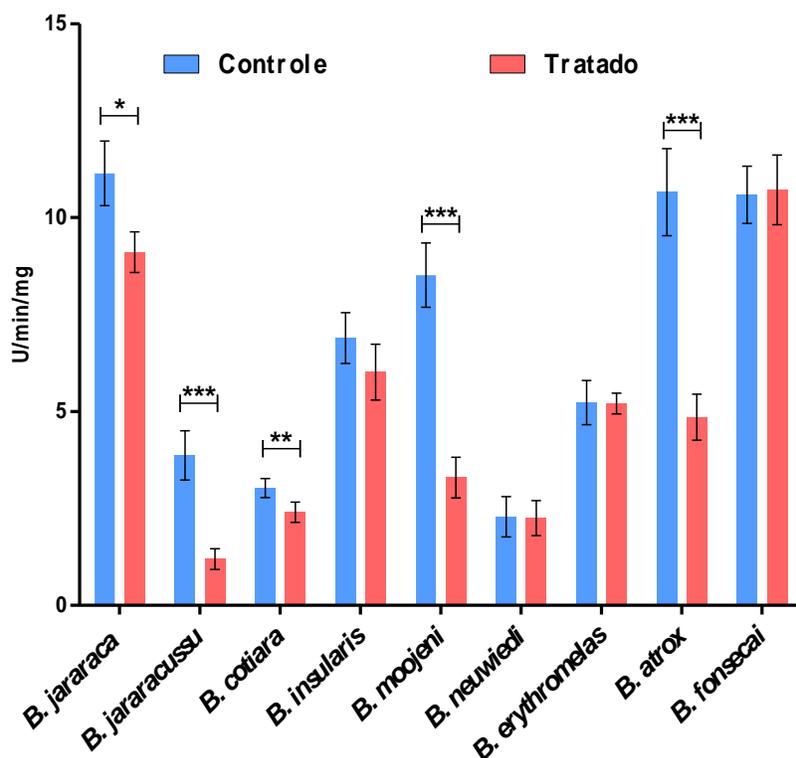


Figura 33. Atividade fibrinogenolítica de venenos do gênero *Bothrops* não tratados e tratados com neuraminidase. A atividade fibrinogenolítica específica é expressa em U/min/mg. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que gerou um aumento de uma unidade na absorbância a 280 nm. As barras representam médias \pm DP; n= 6. p-valor calculado com base no teste *t*-Student (* = 0.01- 0.05/ ** =0.001- 0.01/*** < 0.001).

4.2.4.2 Análise da hidrólise do fibrinogênio por eletroforese

A degradação de fibrinogênio em solução também foi avaliada pela visualização do perfil eletroforético dos produtos gerados pelas proteases dos venenos do gênero *Bothrops* não tratados e tratados com a neuraminidase. Estes resultados estão representados na Figura 34.

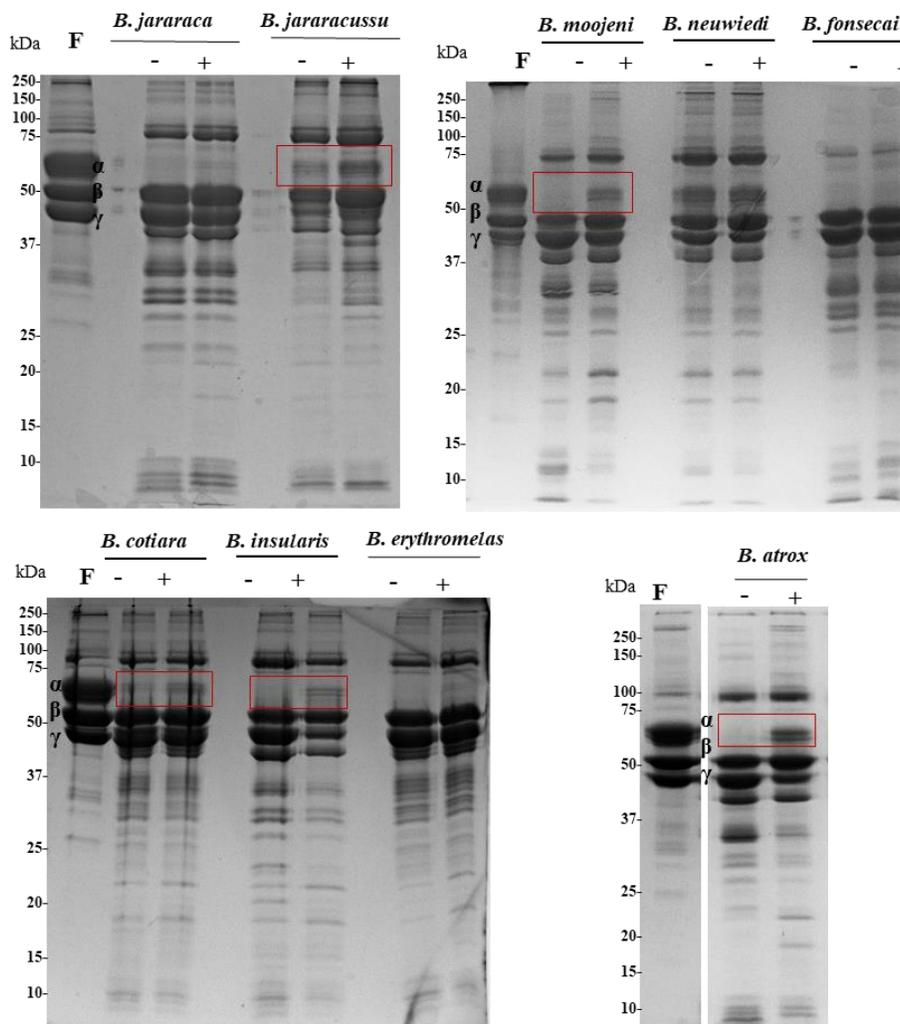


Figura 34. Atividade fibrinogenolítica de venenos do gênero *Bothrops* não tratados e tratados com neuraminidase. Fibrinogênio humano foi incubado com os venenos na proporção enzima: substrato 1:500, por 30 min a 37°C. Os retângulos vermelhos indicam bandas de fibrinogênio com diferentes graus de hidrólise entre os venenos controle e dessialilado. (F): Fibrinogênio, (-) Veneno não tratado com neuraminidase; (+) Veneno tratado com neuraminidase. Proteínas coradas com Coomassie Blue G.

A atividade dos venenos não tratados com a neuraminidase resultou na degradação da cadeia alfa do fibrinogênio, e na geração do dímero gama-gama, devido à presença de serinoproteases capazes de converter o fibrinogênio em fibrina em venenos de viperídeos⁴⁶. Neste ensaio, a remoção de resíduos de ácido siálico afetou a atividade fibrinogenolítica dos venenos de *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. insularis*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, em cujos perfis a cadeia alfa pareceu degradada em menor grau (Figura 34).

Esses resultados são semelhantes aos obtidos na avaliação da degradação pela determinação da absorbância dos produtos de degradação em 280 nm (Figura 33), indicando

que os resíduos de ácido siálico são importantes para algumas proteases de venenos, na interação com fibrinogênio e catálise.

4.2.5 Atividade coagulante sobre o plasma humano

A atividade coagulante de venenos do gênero *Bothrops* foi avaliada considerando a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de plasma citratado em 60 s, a 37 °C, ou seja, a Dose Mínima Coagulante (DMC) ¹⁵⁰. Assim, para avaliar o efeito da dessialilação de enzimas proteolíticas na atividade coagulante de venenos do gênero *Bothrops*, primeiramente foi determinada a DMC dos mesmos. Para isso, curvas (concentração de veneno x tempo de coagulação) foram obtidas de forma independente e em triplicata. A Figura Suplementar 6 mostra as curvas de cada veneno e a DMC calculada para cada replicata individual.

Na Tabela 8 estão listados os diferentes valores médios de DMC apresentados pelos venenos sem tratamento com a neuraminidase, mais uma vez indicando os diferentes conteúdos de proteases com atividade pró-coagulante nos mesmos.

Tabela 8. Dose mínima coagulante (DMC) de venenos do gênero *Bothrops* sobre o plasma humano.

Venenos	DMC (µg)	DP*
<i>B. atrox</i>	3,9	± 0,64
<i>B. cotiara</i>	2,8	± 0,81
<i>B. erythromelas</i>	1,4	± 0,85
<i>B. fonsecai</i>	1,4	± 0,20
<i>B. insularis</i>	1,5	± 0,04
<i>B. jararaca</i>	3,9	± 0,39
<i>B. jararacussu</i>	10,6	±1,43
<i>B. moojeni</i>	3,9	± 2,09
<i>B. neuwiedi</i>	4,1	± 0,8

DP*- Desvio Padrão calculado a partir de 3 determinações.

A Figura 35 mostra curvas comparativas de atividade coagulante dos venenos não tratados e tratados com a neuraminidase. Nesse ensaio, como controle negativo, a enzima neuraminidase (0,2 U/µL) foi incubada com o plasma humano por 120 min, não resultando na coagulação do mesmo. Ainda que em diferentes graus, a remoção do ácido siálico provocou uma diminuição da atividade coagulante sobre o plasma humano de todos os venenos.

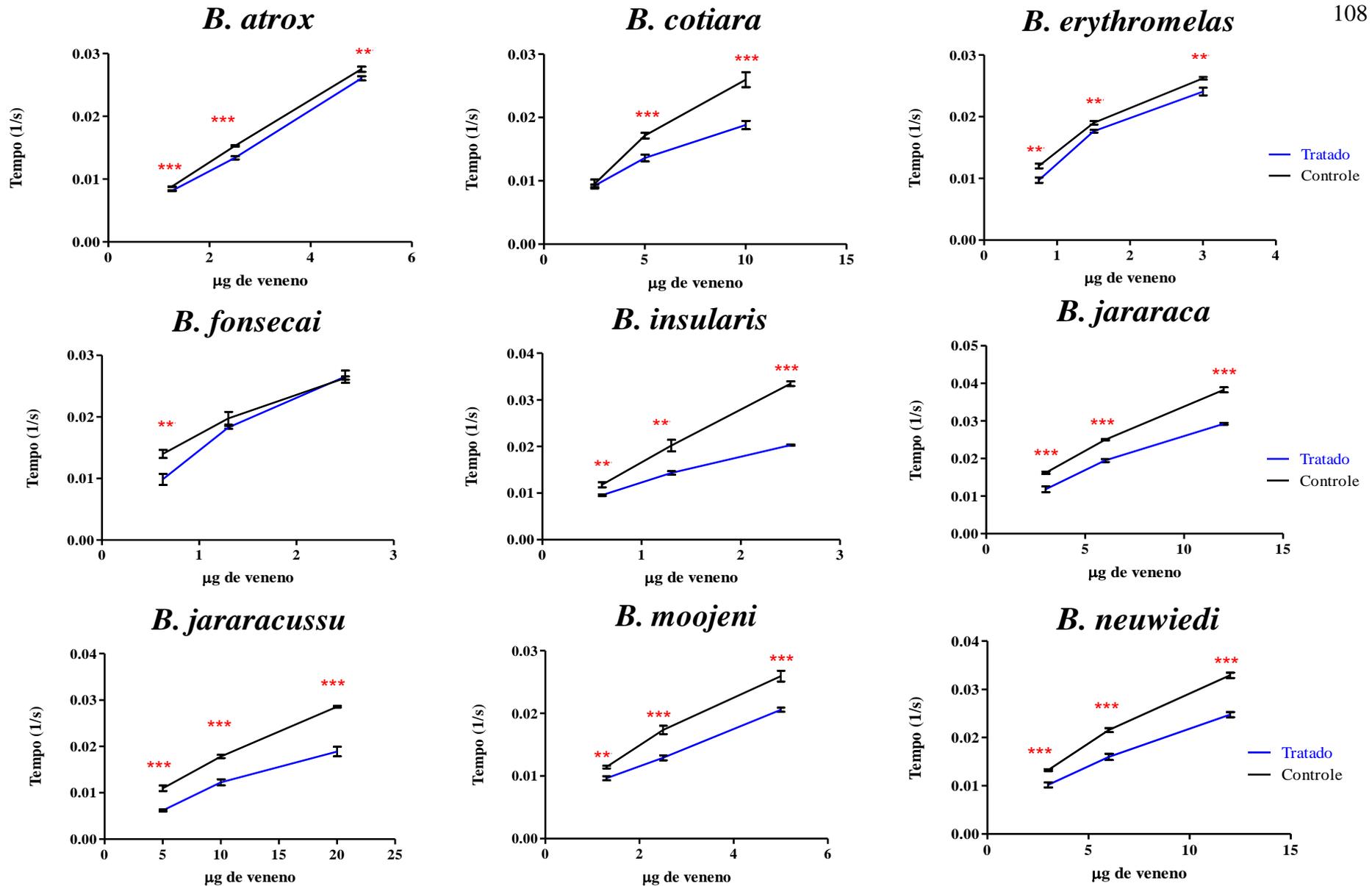


Figura 35. Atividade coagulante dos venenos do gênero *Bothrops* não tratados e tratados com neuraminidase. Os gráficos representam a curva de diluição seriada de cada veneno (μg) e tempo de coagulação (1/s). As barras representam médias \pm DP $n=3$. O p -value de cada ponto da curva foi calculado com base no teste t -Student (* = 0.01- 0.05/ ** =0.001-0.01/*** < 0.001).

As curvas mostradas na Figura 35 resultam de três mensurações com diferentes quantidades de veneno, e os dados obtidos foram utilizados para calcular a variação da atividade coagulante dos venenos não tratados e tratados com neuraminidase. Os valores de *p-value* calculados para cada ponto da curva de coagulação indicaram que a remoção de ácido siálico promoveu uma diminuição significativa na atividade coagulante para a maioria dos venenos analisados, principalmente *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, e *B. insularis*.

Dessa forma, após confirmar a diferença significativa entre os pontos das curvas de coagulação a DMC dos venenos foi calculada em ambas as condições (com e sem tratamento com a neuraminidase) (Tabela 9). Os valores de atividade coagulante residual mostram um diminuição de cerca de 50% (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. insularis* e *B. fonsecai*), ou 30% (*B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. cotiara*), ou 15% (*B. erythromelas* e *B. atrox*), em concordância com os outros resultados deste estudo, que indicaram que as atividades de hidrólise de proteínas pelos venenos analisados foram afetadas pela dessialilação enzimática.

Tabela 9. Dose mínima coagulante (DMC) de venenos do gênero *Bothrops* submetidos ou não à dessialilação enzimática com neuraminidase.

	<i>B. jararaca</i>		<i>B. jararacussu</i>		<i>B. cotiara</i>	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Atividade coagulante (μg)*	2,99	5,14	9,22	17,21	5,51	8,39
Atividade residual**		58,2%		53,6%		65,7%

	<i>B. moojeni</i>		<i>B. neuwiedi</i>		<i>B. insularis</i>	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Atividade coagulante (μg)*	2,52	3,75	4,32	6,79	0,90	1,95
Atividade residual**		67,2%		63,6%		46%

	<i>B. erythromelas</i>		<i>B. fonsecai</i>		<i>B. atrox</i>	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Atividade coagulante (μg)*	1,36	1,67	0,93	1,79	2,79	3,10
Atividade residual**		81,3%		52%		90,2%

*Dose Mínima Coagulante utilizada para medir a atividade coagulante das amostras de veneno.

**A atividade residual é representada em porcentagem da atividade coagulante remanescente após incubação das amostras de veneno com a enzima neuraminidase.

4.2.6 Avaliação do papel do ácido siálico na atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca* sobre o plasma humano

4.2.6.1 Perfil eletroforético do plasma humano incubado com o veneno

Para a avaliação do papel de ácido siálico na atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca* sobre as proteínas do plasma humano, amostras não tratadas e tratadas com a neuraminidase foram incubadas com o plasma, conforme a descrição da Figura 5, e o perfil proteico foi avaliado por eletroforese. Apesar de a degradação de componentes do plasma não ter sido claramente perceptível pelo perfil eletroforético de proteínas, principalmente devido à alta abundância de albumina plasmática, a Figura 36 mostra sutis alterações entre as amostras incubadas com o veneno íntegro ou dessialilado.

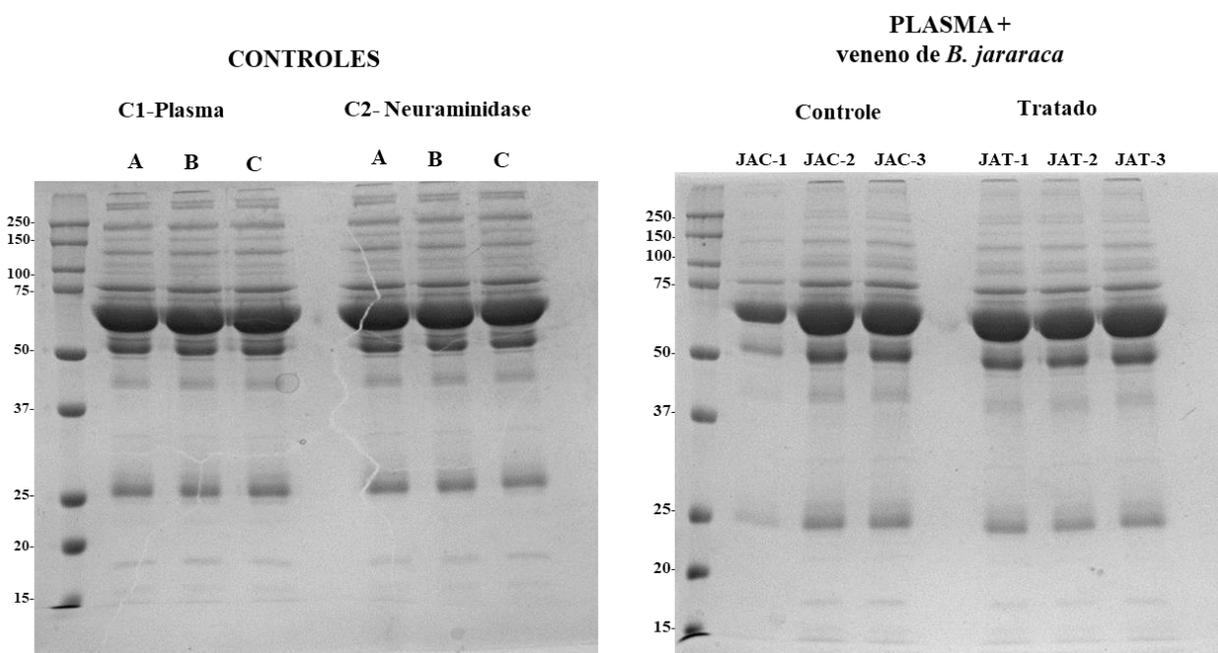


Figura 36. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) do plasma humano após incubação com o veneno não tratado (*B. jararaca* Controle- JAC-1,2,3) e tratado (*B. jararaca* Tratado-JAT-1,2,3) com neuraminidase; do plasma incubado com PBS (Controle 1 - A-B-C) e do plasma incubado com neuraminidase (Controle 2- A-B-C). Proteínas coradas com Coomassie Blue G.

4.2.6.2 Análise das frações peptídicas do plasma humano incubado com o veneno

A análise da fração peptídica do plasma humano incubado com o veneno de *B. jararaca* não tratado e tratado com a neuraminidase resultou na identificação de peptídeos oriundos da hidrólise de proteínas (Tabela Suplementar 16). A Figura 37 A,B mostra gráficos

de *Venn* ilustrando os números de peptídeos identificados nos três experimentos independentes de incubação do plasma, indicando que as proteases do veneno hidrolisaram proteínas plasmáticas gerando 412 peptídeos comuns, porém no caso da amostra de veneno tratada com neuraminidase a proteólise foi parcialmente afetada pela remoção de ácido siálico, e resultou em um número mais baixo de peptídeos (322). A comparação dos peptídeos comuns identificados nas amostras de plasma incubadas com veneno não tratado e tratado com a neuraminidase (Figura 37C) indicou que apenas uma parte desses peptídeos (207) foi gerada por ambos os venenos, enquanto 205 e 115 peptídeos eram específicos, respectivamente, da incubação do plasma com o veneno não tratado e tratado com a neuraminidase. Apesar desta diferença no perfil de peptídeos gerados pelos venenos, 26 de um total de 33 proteínas foram degradadas por ambos.

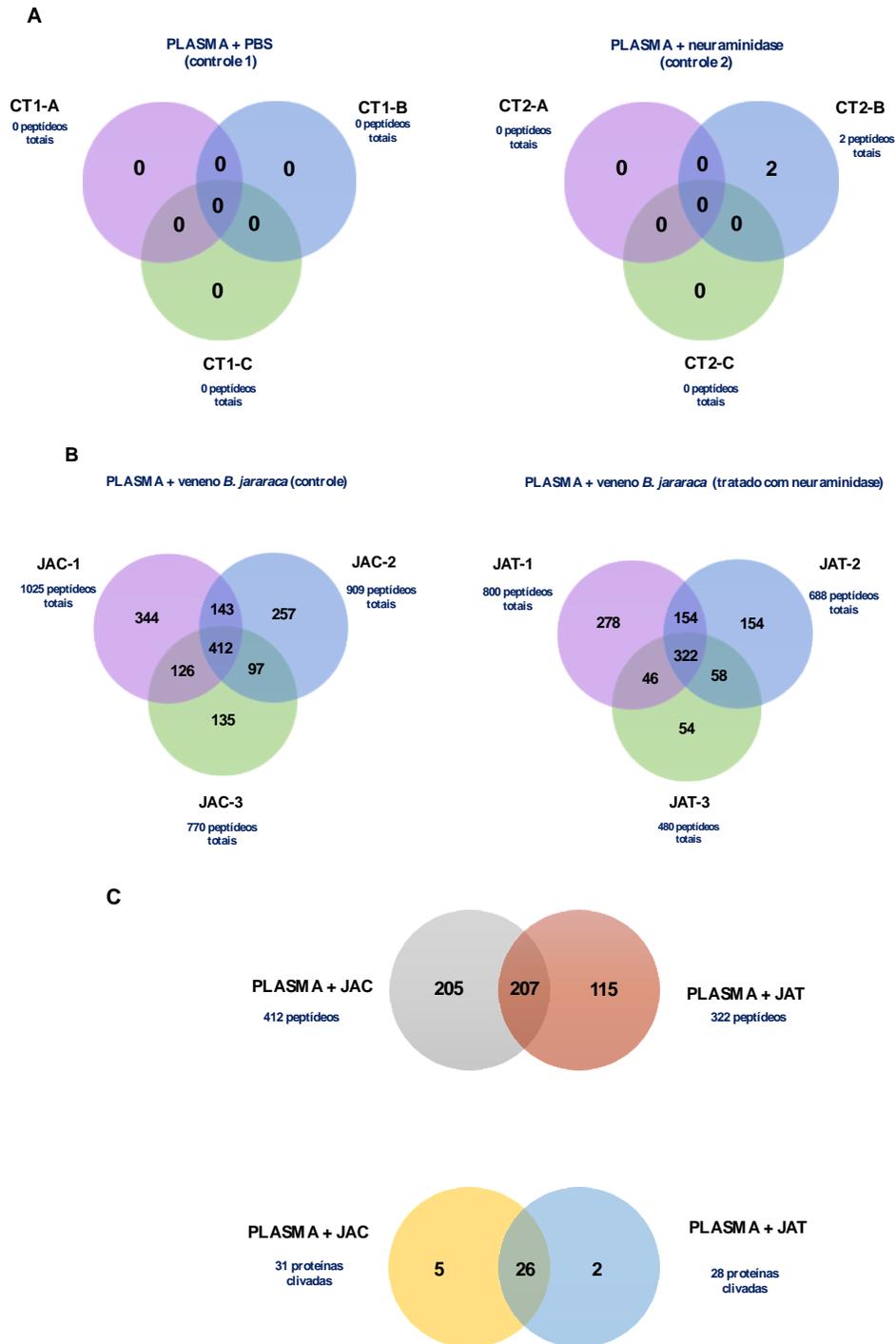


Figura 37. Diagramas de *Venn* ilustrando os números de peptídeos e proteínas identificados por LC-MS/MS nas frações de plasma humano incubado com veneno de *B. jararaca* não tratado e tratado com neuraminidase. (A) Peptídeos identificados em três amostras de plasma controle ou plasma incubado com neuraminidase. (B) Peptídeos identificados em três amostras de plasma incubado veneno de *B. jararaca* não tratado (JAC1-3) e tratado com neuraminidase (JAT1-3). (C) Comparação dos números de peptídeos identificados em comum nas três amostras analisadas de plasma não tratado (JAC1-3) e tratado com neuraminidase (JAT1-3) e das proteínas identificadas como clivadas nas amostras de plasma incubado com o veneno de *B. jararaca* não tratado (JAC1-3) e tratado com neuraminidase (JAT1-3).

A Tabela 10 lista as proteínas degradadas pelo veneno de *B. jararaca* não tratado e tratado com a neuraminidase, incluindo várias apolipoproteínas, inibidores de enzimas proteolíticas, fibrinogênio, cininogênio, entre outras. Segundo essa análise, as cinco proteínas mais degradadas foram apolipoproteínas A-I e A-IV, alfa-2-HS-glicoproteína, protrombina e fibrinogênio. O efeito da remoção de resíduos de ácido siálico das proteínas do veneno foi visto pelo número mais baixo de peptídeos gerados a partir das 28 proteínas clivadas pelo veneno tratado com neuraminidase, e pela clivagem exclusiva de algumas proteínas pelo veneno não tratado (5) e tratado com a glicosidase (2). Ainda, em algumas proteínas, o mapeamento das regiões clivadas pelas proteases mostrou algumas diferenças entre os experimentos com o veneno íntegro e com o tratado com a neuraminidase, como por exemplo no caso do fibrinogênio (Figura 38) e da protrombina (Figura 39). Os mapas de clivagem dessas proteínas mostram as diferentes sequências de peptídeos gerados pelas amostras de ambos os venenos, e ainda regiões da cadeia polipeptídica que deixaram de ser clivadas no caso do veneno dessialilado. Em conjunto, esses resultados indicaram que a remoção de ácido siálico alterou o perfil de proteólise do veneno de *B. jararaca* sobre proteínas plasmáticas.

Tabela 10. Proteínas do plasma humano identificadas como clivadas a partir da análise por LC-MS/MS da fração de peptídeos após a incubação com o veneno de *B. jararaca* não tratado (JAC) e tratado (JAT) com neuraminidase. Apenas as proteínas identificadas a partir dos peptídeos comuns às incubações independentes (JAC1-3 e JAT1-3) foram consideradas. Em negrito estão destacadas as cinco proteínas que resultaram nas maiores quantidades de peptídeos identificados.

Identificação da proteína	Descrição	PLASMA + JAC # peptídeos exclusivos	# peptídeos compartilhados	PLASMA + JAT # peptídeos exclusivos
ALBU_HUMAN	<i>Albumin</i>	2		
A1AT_HUMAN	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	1	1	
A2AP_HUMAN	<i>Alpha-2-antiplasmin</i>	3		
FETUA_HUMAN	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	11	15	8
A2MG_HUMAN	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	5	6	3
APOA1_HUMAN	<i>Apolipoprotein A-I</i>	29	36	10
APOA2_HUMAN	<i>Apolipoprotein A-II</i>	1		
APOA4_HUMAN	<i>Apolipoprotein A-IV</i>	25	29	17
APOB_HUMAN	<i>Apolipoprotein B-100</i>	3	2	1
APOC1_HUMAN	<i>Apolipoprotein C-I</i>	2	6	4
APOC2_HUMAN	<i>Apolipoprotein C-II</i>	3	2	
APOC3_HUMAN	<i>Apolipoprotein C-III</i>	5	5	7
APOE_HUMAN	<i>Apolipoprotein E</i>	2	5	4
APOL1_HUMAN	<i>Apolipoprotein L1</i>	2		4
CLUS_HUMAN	<i>Clusterin</i>	9	8	1
FA12_HUMAN	<i>Coagulation factor XII</i>	1		1
CO3_HUMAN	<i>Complement C3</i>	2	4	3
CO4_A/B_HUMAN	<i>Complement C4-A C4-B</i>	2		
FIBA_HUMAN	<i>Fibrinogen alpha chain</i>	51	41	20
FIBB_HUMAN	<i>Fibrinogen beta chain</i>	5	12	4
GELS_HUMAN	<i>Gelsolin</i>	7	7	4
HEP2_HUMAN	<i>Heparin cofactor 2</i>		1	
HRG_HUMAN	<i>Histidine-rich glycoprotein</i>	1		
ITIH2_HUMAN	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2</i>	4	3	4

ITIH4_HUMAN	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4</i>	8	8	8
KNG1_HUMAN	<i>Kininogen-1</i>	2	2	1
THRB_HUMAN	<i>Prothrombin</i>	11	7	2
SAA4_HUMAN	<i>Serum amyloid A-4 protein</i>			3
TTHY_HUMAN	<i>Transthyretin</i>	6	3	2
PROS_HUMAN	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>			1
VTNC_HUMAN	<i>Vitronectin</i>	2	4	2
A1BG_HUMAN	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	2		

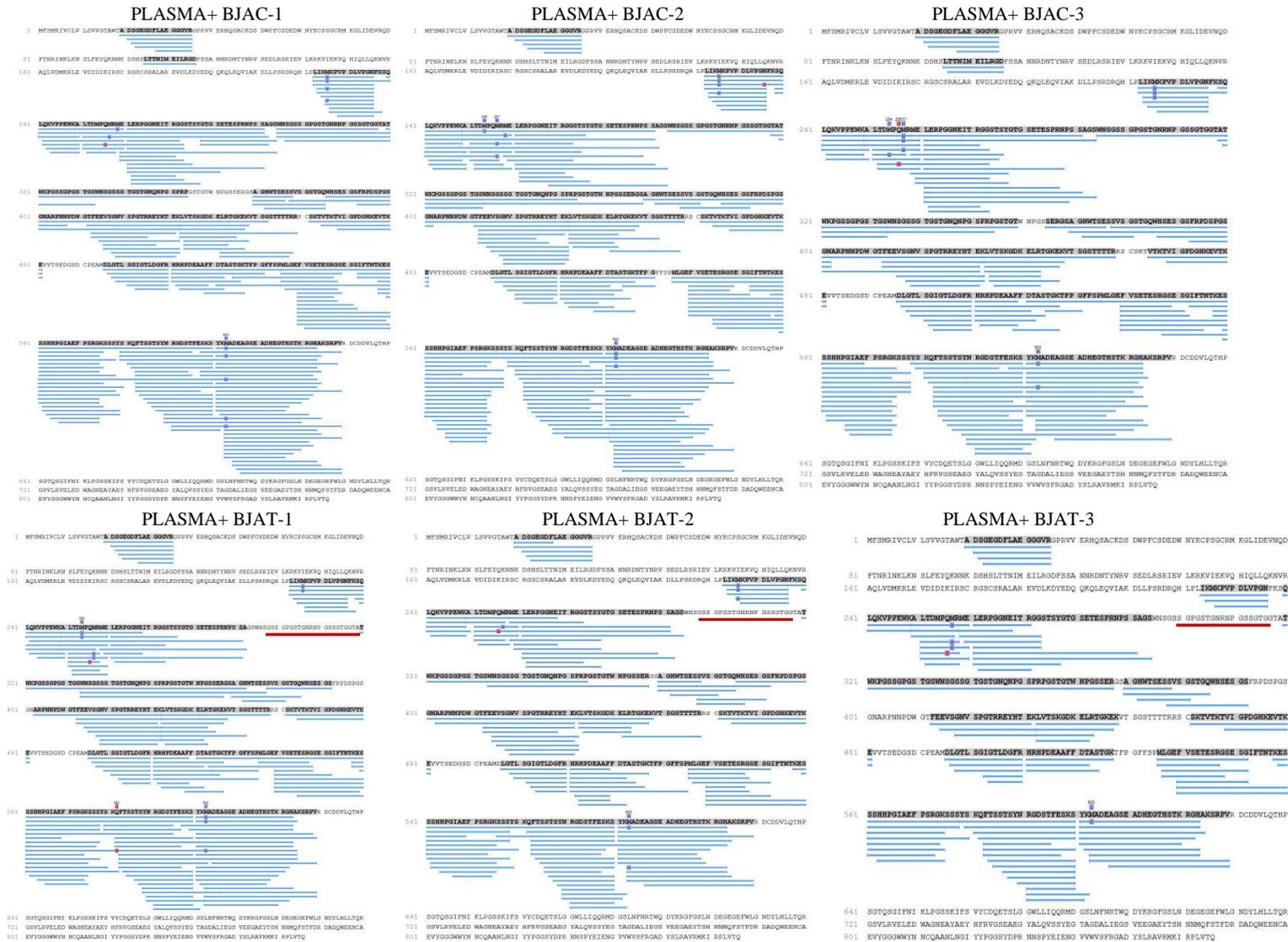


Figura 38. Comparação da sequência de aminoácidos da cadeia α do fibrinogênio humano indicando os produtos de clivagem (peptídeos) gerados após a incubação do plasma com o veneno de *B. jararaca* não tratado (JAC 1,2,3) e tratado (JAT 1,2,3) com neuraminidase. Linhas azuis indicam os peptídeos identificados. Linhas vermelhas indicam a região não clivada pelas proteases do veneno tratado com neuraminidase. Visualização gráfica gerada com o PEAKS Studio 7.

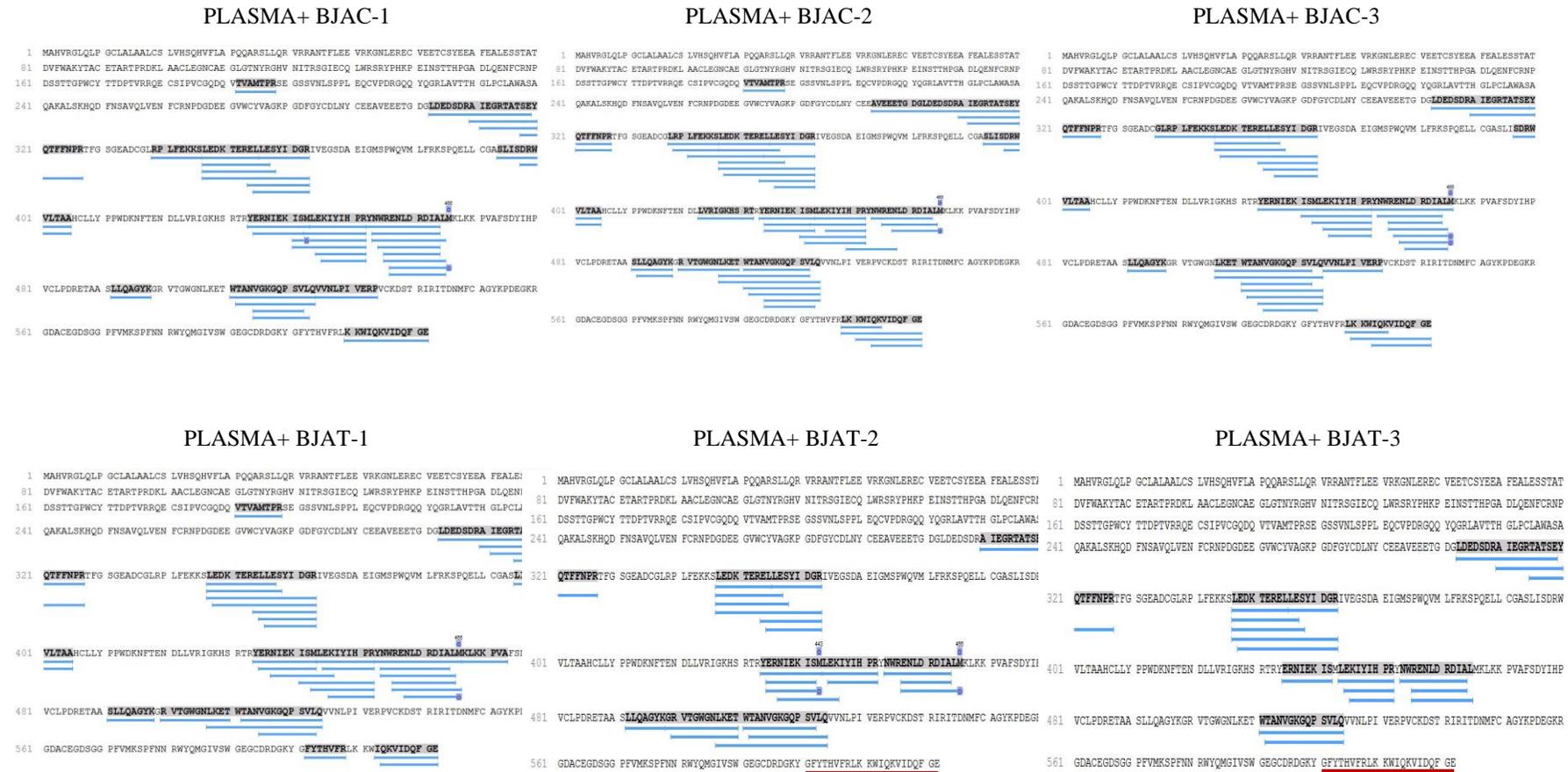


Figura 39. Comparação da sequência de aminoácidos da protrombina humana indicando os produtos de clivagem (peptídeos) gerados após a incubação do plasma com o veneno de *B. jararaca* não tratado (JAC 1,2,3) e tratado (JAT 1,2,3) com neuraminidase. Linhas azuis indicam os peptídeos identificados. Linhas vermelhas indicam a região não clivada pelas proteases do veneno tratado com neuraminidase. Visualização gráfica gerada com o PEAKS Studio 7.

5. DISCUSSÃO

5.1 Subproteomas de proteínas de venenos de *Bothrops* com afinidade por lectinas que reconhecem ácido siálico (SNA e MAL)

Resíduos de ácido siálico (Neu5Ac) são de particular importância para proteínas glicosiladas. Neu5Ac é frequentemente o resíduo terminal de cadeias de glicanos das glicoproteínas, tipicamente conectado à galactose por ligações glicosídicas α 2-3 ou α 2-6. As diferenças nas posições de ligação entre esses dois isômeros têm sido relacionadas ao desenvolvimento de diferentes fenótipos de câncer, onde alterações da superfície celular relacionadas ao tumor, geralmente envolvem um aumento na sialilação α 2-6^{161,162}. Por outro lado, Neu5Ac α 2-3 faz parte dos motivos de Lewis (sLeX/A) sialilados, que são característicos de células cancerígenas em metástase¹⁶³. Esse epítipo foi também descrito em algumas toxinas de venenos^{152,154}. Além disso, interações diferenciais entre a proteína hemaglutinina (HA) do vírus influenza A e receptores de glicano contendo Neu5Ac α 2-3 (aviário) ou Neu5Ac α 2-6 (humano) desempenham um papel importante na regulação da especificidade do hospedeiro e na adaptação do vírus.¹⁶⁴

A presença de resíduos de ácido siálico tem sido descrita em diferentes trabalhos sobre componentes de venenos de serpentes^{114,152,154,158,165}, e neste contexto, a avaliação da presença de glicoproteínas sialiladas em venenos do gênero *Bothrops* teve início em nosso grupo com o uso da lectina WGA⁴¹, que reconhece glicanos contendo resíduos de ácido siálico terminais ou *N*-acetilglicosamina (GlcNAc)¹⁶⁶. Apesar de os subproteomas identificados em sete venenos do gênero *Bothrops* utilizando a WGA em cromatografia de afinidade terem mostrado que SVMPs e SVSPs são as classes de toxinas mais abundantes reconhecidas por esta lectina, não foi possível distinguir quais carboidratos estavam presentes nas porções terminais dessas glicoproteínas. E embora WGA seja comumente usada para se ligar à estruturas de *N*-glicanos complexos sialilados, devido à sua afinidade secundária para NeuAc α 2-3¹⁶⁷, pouca afinidade tem sido descrita para os glicanos com NeuAc na posição α 2-6 e α 2-8¹⁶⁸. Somado a esse fato, seu reconhecimento de carboidratos é sabidamente mais amplo em comparação com outras lectinas¹⁶⁹, e dessa forma, para acessar as diferentes camadas de diversidade estrutural nas quais os resíduos de ácido siálico se apresentam, faz-se necessário utilizar lectinas mais específicas.

Os ácidos siálicos são dotados de uma rica diversidade de modalidades químicas em um único monossacarídeo e por possuírem diversos papéis funcionais que medeiam processos biológicos importantes, tornaram-se o foco em nossos estudos, desde que a análise da composição de diferentes *N*-glicanos presentes em proteínas de venenos de *Bothrops*¹³¹ mostrou a abundância deste monossacarídeo na posição terminal de quase todas as estruturas de *N*-glicanos dos tipos complexo e híbrido identificadas.

Dessa forma, para explorar o conteúdo de glicoproteínas de venenos do gênero *Bothrops* contendo *N*-glicanos com ácido siálico, no presente estudo, o uso de cromatografia de afinidade à lectina SNA e ensaios de *pull down* com MAL I tiveram como objetivo avaliar as classes de toxinas do ponto de vista de sua glicosilação, em especial para explorar as diferentes configurações nas quais resíduos de ácido siálico estão presentes em *N*-glicanos, uma vez que não foi possível avaliar todos os tipos de ligações existentes entre os resíduos de ácido siálico e as hexoses (Hex/HexNAc) presentes nas estruturas de *N*-glicanos caracterizados por Andrade-Silva e colaboradores¹³¹. Assim, ao utilizar as lectinas SNA e MAL I foi possível detectar proteínas contendo resíduos de ácido siálico nas configurações, respectivamente, NeuAc α 2-6Gal/GalNAc e NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc.

Sambucus nigra aglutinina I (SNA-I), é uma lectina da casca do sabugueiro, tradicionalmente utilizada para identificar estruturas de glicanos contendo Neu5Ac α 2-6Gal/GalNAc^{170,171}. Classificada no grupo das RIP-II (*ribosome-inactivating protein-II*), a SNA é uma proteína tetramétrica, que se apresenta como um heterotetrâmero (~140 kDa) composto por dois heterodímeros, cada um contendo uma cadeia A (que se assemelha à cadeia A da ricina) e uma cadeia B (lectina do tipo R que se liga ao glicano), ligadas por pontes de dissulfeto¹⁷². A SNA é uma das poucas lectinas que contêm o domínio tipo R que não reconhece Gal/GalNAc, e sim resíduos de ácido siálico ligados na posição α 2-6¹⁷³. Para o reconhecimento de ácido siálico nessa configuração, tanto o grupo carboxil livre do C-1 quanto a cadeia lateral de gliceril (C7-C9) mostraram-se necessários para completa interação da lectina com o monossacarídeo¹⁷⁰.

As cromatografias de afinidade utilizando a resina SNA-agarose possibilitaram enriquecer apenas uma pequena fração de componentes dos venenos do gênero *Bothrops* aqui analisados (Tabela 1). Porém, apesar da baixa quantidade de proteínas recuperadas, com os resultados obtidos foi possível mostrar as sutis diferenças na composição de toxinas de venenos de *Bothrops* em comparação com a lectina MAL I, que também reconhece

ácido siálico na posição terminal, mas em diferente configuração (Figura 20 A,C). A análise das frações de proteínas que se ligaram à resina de SNA-agarose mostrou distribuição variável das classes de toxinas entre os venenos, porém algumas destacaram-se por estarem em maior abundância nas frações enriquecidas pela lectina, como as SVMPs, SVSPs e CTLs (Figura 8).

Entre os venenos analisados, alguns resultaram em maior quantidade de proteínas enriquecidas pela lectina SNA e identificadas, como foi o caso de *B. jararaca*, cuja fração retida também mostrou um perfil eletroforético mais diversificado, em comparação com os demais (Figuras 7 e 8; Tabela 2). Porém essa correlação entre os resultados não ocorreu em todos os venenos, como foi o caso de *B. insularis*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* que mostraram perfis eletroforéticos semelhantes entre si (Figura 7), mas resultaram em diferentes quantidades de grupos de proteínas identificados nas suas frações retidas pela SNA (Tabela 2). Apesar de o enriquecimento usando a lectina SNA ter sido variável entre os venenos, esta lectina possibilitou enriquecer em maior quantidade as proteínas de alguns venenos (*B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. atrox*) (Figuras 8 e 20), indicando que *N*-glicanos contendo ácido siálico na configuração α 2-6 estão diferencialmente presentes nos venenos das espécies de *Bothrops* aqui estudadas.

Outro ponto importante destes resultados foi a presença significativa de CTLs na fração de proteínas enriquecidas pela SNA-agarose, principalmente nos venenos de *B. atrox*, *B. jararaca* e *B. moojeni* (Figuras 8 e 20A, Tabela 2). A contribuição em termos quantitativos dessa classe de toxina entre os achados de proteínas enriquecidas pela SNA causou um viés nos valores totais de grupos de proteínas identificados, principalmente quando se compara a presença desta classe de toxina entre as frações enriquecidas pelas três lectinas usadas neste estudo (Figura 20). Ainda que em quantidade mais baixa, PLA2s, outra classe de toxinas não glicosilada, também foram identificadas na fração enriquecida pela SNA (Tabela 2).

Dentre as toxinas enriquecidas pela SNA, as LAAOs foram identificadas em menor número nas frações retidas, e apesar dessa classe de proteínas ser frequentemente descrita como glicosilada^{56,174-177}, esse resultado indicou que em venenos de *Bothrops*, as LAAOs possivelmente contêm poucos *N*-glicanos contendo ácido siálico ligado à galactose terminal na posição α 2-6 (Tabela 2; Figura 8).

Apesar de a sialilação ter sido relatada em algumas LAAOs ^{114,178}, possivelmente contribuindo para a microheterogeneidade de formas dessas toxinas ^{119,179}, Geyer e colaboradores ¹¹⁴ relataram a presença de ácido siálico na posição α 2-3 (NeuAc α (2-3)Gal β (1-3)Glc) em uma LAAO do veneno de *Calloselasma rhodosoma*, além da descrição de estruturas de *N*-glicanos bissialilados. Neste trabalho, os autores destacaram a homogeneidade da glicosilação observada na toxina analisada, sugerindo uma forte contribuição dessas estruturas sialiladas na interação com *siglecs* (*sialic acid-binding lectins*) resultando em danos oxidativos localizados pela produção de H₂O₂. Mais tarde Ande e colaboradores ¹⁸⁰ descreveram que a ligação e internalização desta LAAO parecia ser mediada por sua porção de glicano, já que a dessialilação reduziu a citotoxicidade da mesma em células de Jukart. Dessa forma, levando em consideração essas informações, a identificação deficiente de LAAOs em frações de venenos de *Bothrops* ligadas à SNA poderia ser explicada pela possível presença dessas diferentes estruturas anteriormente descritas, que não são reconhecidas pela lectina SNA.

A lectina MAL I, diferentemente do observado com a SNA, enriqueceu as classes de toxinas de forma mais homogênea, porém sendo mais específica para alguns venenos, como foi o caso de *B. cotiara*, *B. fonsecai*, *B. insularis* e *B. jararaca* (Figura 18). Não obstante, a MAL I, da mesma forma que a SNA, enriqueceu preferencialmente as classes de toxinas tipicamente mais abundantes em venenos do gênero *Bothrops*, como as SVMPS e as SVSPs, além de também enriquecer diversas outras enzimas de baixa abundância nos venenos (Tabelas 2 e 5). Além da identificação por espectrometria de massas, essas proteínas pouco abundantes, classificadas como “Outros” neste trabalho, também foram detectadas pela presença de bandas de proteínas de massa molecular alta na eletroforese, que correspondem tipicamente a 5’Nases, DPases e PDEs (Figuras 14 a 17), e no *blot* de lectinas (Figura 26).

Com relação às SVSPs, essas toxinas foram identificadas na maioria das frações enriquecidas pelas lectinas SNA (Figura 8) e MAL I (Figura 18), evidenciando a já reportada microheterogeneidade na glicosilação dessas proteínas ⁹⁸ e indicando que em relação à sialilação, as SVSPs de venenos do gênero *Bothrops* devem apresentar ambas as configurações (α 2-3 e α 2-6) de resíduos de ácido siálico em seus *N*-glicanos. E de fato, diversas serinoproteases isoladas de venenos de *Bothrops* foram reportadas como glicosiladas ^{46,181–184}, e em especial algumas foram descritas contendo ácido siálico em sua

composição, como as serinoproteases do tipo-trombina BpSP-I de *B. pauloensis*¹⁶⁵, BJ-48¹⁸³ e BjussuSP-1¹⁸⁵ de *B. jararacussu*, e uma enzima isolada do veneno de *B. pictus*¹⁸⁶.

Outro fator que pode estar relacionado à limitação no reconhecimento de proteínas dos venenos aqui analisados pela lectina SNA, em cromatografias de afinidade, fato que também ocorreu nos ensaios de *blot* de lectina, (Figura 26), reside exatamente na sua especificidade, baseada na presença de *N*-glicanos contendo ácido siálico na configuração α 2-6. Sabe-se que a SNA-I se liga a estruturas terminais de Neu5Ac α 2-6Gal e que os resíduos de galactose ou N-acetilgalactosamina podem ser importantes na ligação^{170,171,187,188}. Porém, com base em análises simultâneas de *microarray* da interação de SNA com uma variedade de glicanos, Smith e colaboradores¹⁸⁹ identificaram a necessidade de um determinante mínimo de três carboidratos (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc) para que a SNA se ligasse com alta afinidade, indicando um forte requisito para a presença de Gal β 1-4GlcNAc, ou seja, lactosamina (LacNAc) subsequente ao resíduo de ácido siálico apenas na configuração α 2-6.

Considerando essas informações, e os resultados obtidos por Andrade-Silva e colaboradores¹³¹, que classificaram os venenos de acordo com as principais estruturas identificadas de *N*-glicanos, esperaríamos que, se houvessem resíduos de ácido siálico na posição α -2,6, estes não seriam detectados nos venenos classificados naquele estudo como grupo 2 (*B. erythromelas*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*), já que nesses venenos apenas foram observadas estruturas no qual os resíduos de ácido siálico (Neu5A ou Neu5Gc) estavam ligados a uma GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc). E como o reconhecimento pela SNA tem como requisito a presença de uma galactose após o ácido siálico, este critério seria atendido apenas pelos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. cotiara*, onde foram detectados resíduos de ácido siálico na sequência Neu5A-Gal β 1-4GlcNA em seus *N*-glicanos. Porém, com relação às estruturas mais complexas de carboidratos, como em *N*-glicanos do tipo complexo biantenado, Smith e colaboradores¹⁸⁹ identificaram que a SNA tem preferência por reconhecer esse trissacarídeo na ramificação que parte do núcleo trimanosil a partir da ligação α 1-3, e não da ramificação α 6, como mostrado na Figura 40.

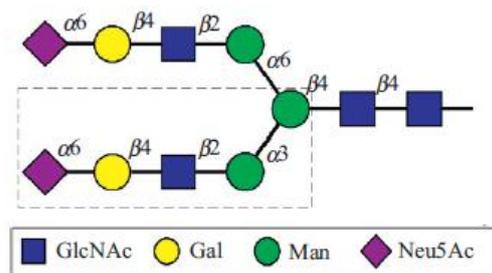


Figura 40. Motiv de ligação da lectina SNA (retângulo tracejado) em um *N*-glicano do tipo complexo biantenado terminando com o determinante mínimo definido por Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc, conforme reportado por Smith e colaboradores¹⁸⁹.

Estudos posteriores em *microarrays*, utilizando *N*-glicanos assimétricos¹⁹⁰, ou glicanos sialilados contendo várias modificações naturais deste monossacarídeo¹⁹¹, reforçaram essa preferência pela lectina SNA¹⁹². Dessa forma o reconhecimento da SNA não se restringe apenas à identificação do trissacarídeo NeuAc (α 2-6) Gal (β 1-4)GlcNAc e suas sutis modificações, mas inclui o reconhecimento de estruturas mais complexas de glicanos onde se encontra esse trissacarídeo.

Por fim, vale considerar alguns pontos: i) muito tem sido feito para determinar a afinidade das lectinas usando glicoproteínas com glicosilação conhecida, e apesar dos desafios da presença de microheterogeneidade entre as glicofornas, estudos com estruturas de *N*-glicanos isolados têm sido realizados para elucidar a especificidade de lectinas. No entanto, considerando a complexidade das interações entre as lectinas e os glicanos e que a afinidade/avidez é baseada em múltiplas interações entre o glicano, a lectina e a parte aglicana de glicoproteínas, torna-se difícil afirmar como as lectinas se comportam em relação à sua seletividade e especificidade, quando expostas a misturas complexas de proteínas, como os venenos de serpentes; ii) em glicobiologia, os termos “determinante mínimo” ou “parcial” são frequentemente usados para descrever a estrutura mínima de um glicano, necessária para interagir com uma lectina, não sendo necessariamente suficiente para uma completa interação de alta afinidade¹⁹³; iii) embora as lectinas tenham a capacidade de enriquecer algumas glicoproteínas de forma seletiva e reprodutível, outras proteínas carregando o mesmo repertório de glicanos podem não ser reconhecidas, já que o mesmo glicano pode não ser reconhecido por apresentar pequenas modificações químicas em suas estruturas, como por exemplo metilação e sulfatação, a depender da flexibilidade de cada lectina em acomodar essas modificações. Este desafio também foi observado por Lee e colaboradores¹⁹⁴ que ao analisarem os glicanos identificados em glicoproteínas enriquecidas por lectinas (ConA, jacalina e WGA) em cromatografias de afinidade com proteínas de membranas celulares de fígado e proteínas do plasma, verificaram que as

lectinas foram úteis para fracionar as glicoproteínas destas misturas complexas em diferentes *subsets* de glicoproteínas, mas a caracterização dos glicoproteomas totais não foi possível por esta abordagem.

A presença de resíduos de ácido siálico na configuração α 2-3 em *N*-glicanos de venenos do gênero *Bothrops* foi avaliada utilizando a lectina MAL I em ensaios de *pull down* (Figuras 14-17), e uma mistura das lectinas MAL I e MAL II (MAA) nos ensaios de *blot* (Figura 26). Apesar de ambas as formas de MAL serem isoladas da árvore leguminosa *M. amurensis*, as isolectinas apresentam perfis de interação e afinidade distintos. Quanto à especificidade celular, se distinguem por induzir atividade leucoaglutinante (MAL I) ou hemaglutinante (MAL II ou MAH) e em relação ao perfil de interação com os glicanos, ambas reconhecem ácido siálico na posição α 2,3 ligado à galactose, porém se diferenciando a partir do carboidrato e ligação subjacente¹⁵⁷. Assim, MAL I é conhecida por detectar *N*-glicanos ou *core* 2 de *O*-glicanos que contêm o trissacarídeo NeuA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc (ou NeuA α 2-3-LacNAc)^{156,195}, enquanto que MAL II é utilizada para detectar *O*-glicanos que contêm o trissacarídeo NeuA α 2-3Gal β 1-3GalNAc^{196,197}. Ainda, com relação a especificidade de ambas, foi descrito que MAL I/II reconhecem glicanos que não são sialilados, mas sulfatados na sequência SO4-3-Gal β 1-4GlcNAc¹⁵⁷.

A MAL I, ao contrário da SNA, mostrou similaridade entre os resultados obtidos nos ensaios de *pull down* e o *blot* de lectina (Figuras 14-17 e Figura 26). Por ser uma lectina que basicamente se liga a *N*-glicanos contendo NeuA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, ou em outras palavras, um ácido siálico ligado à lactosamina, reconheceu principalmente proteínas dos venenos onde foi reportada a estrutura acima descrita (*B. jararaca*, *B. insularis* e *B. cotiara*)¹³¹. Além disso, MAL I também reconhece a estrutura dissialilada NeuA α 2-8NeuA α 2-3Gal β 1-4Glc¹⁵⁷, indicando que esta lectina tolera a substituição em C8 de NeuA α 2-3Gal β , diferentemente de SNA que perde seu reconhecimento com uma simples substituição neste carbono por um grupo metila¹⁹¹.

Esses resultados confirmaram os achados obtidos por Andrade-Silva e colaboradores¹³¹ que demonstraram a presença de lactosamina dissialilada tanto em 23 estruturas de *N*-glicanos em venenos do Complexo Jararaca (*B. jararaca* e *B. insularis*), quanto em 13 *N*-glicanos no veneno de *B. cotiara*, estruturas essas que não alteram o reconhecimento pela MAL I, mas que poderiam dificultar a ligação por SNA. Em contrapartida, a presença de Neu5Gc descrita nestes venenos, não teria nenhum efeito negativo para o reconhecimento de ambas as lectinas¹⁹⁷.

Por outro lado, apesar de ter sido mostrada nos venenos de *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *B. erythromelas* a presença de resíduos de ácido siálico terminais em *N*-glicanos¹³¹, estes estavam ligados à GalNAc e não a uma galactose. Essa simples troca de monossarídeo parece ter sido o suficiente para que a MAL I diminuísse a taxa de enriquecimento das proteínas desses venenos, no presente estudo (Figuras 14-17 e Figura 26).

Finalmente, apesar de o kit DIG Glycan permitir a detecção de apenas glicoproteínas altamente abundantes, a abordagem de *blot* de lectina mostrou a baixa presença de glicoproteínas com ácido siálico na ligação α 2-6 nos venenos de *Bothrops* aqui analisados, indicando que a posição α 2-3 pode ter sido favorecida na evolução, para a ligação entre NeuAc e Gal(NAc). Este conceito está em consonância com estudos que mostraram que *in vivo*, neoglicoproteínas contendo ácido siálico na configuração α 2-6 mostraram meia-vida sérica reduzida em camundongos em relação ao isômero α 2-3-sialilado^{198,199}. Dessa forma, toxinas contendo ácido siálico na ligação α 2-3 seriam mais estáveis na circulação facilitando sua atuação na presa.

5.2 Subproteomas de proteínas de venenos de *Bothrops* com afinidade por lectina que reconhece *bisecting* GlcNAc (PHA-E)

O estudo de Andrade-Silva e colaboradores¹³¹ também revelou um perfil distinto de *N*-glicanos do veneno de *B. cotiara*, que em comparação com os outros venenos analisados foi o único a apresentar em 13 das 22 estruturas identificadas, resíduos de GlcNAc conectados a uma β -manose central do núcleo de *N*-glicano, por uma ligação β 1,4. A transferência de GlcNAc a uma β -manose ocorre durante a etapa de montagem e remodelação dos *N*-glicanos no complexo de Golgi e é catalisada pela *N*-acetilglicosaminiltransferase-III (GnT-III/MGAT-III). Como sua presença resulta na supressão de processamento adicional e alongamento dos *N*-glicanos catalisados por outras glicosiltransferases, a GlcNAc adicionada nesta posição permanece como uma estrutura bissetora, não sendo considerada uma antena^{200,201}. Assim, *N*-glicanos híbridos e complexos que contêm a estrutura GlcNAc bissetora formam um subtipo de glicanos denominado *bisecting* GlcNAc^{202,203}.

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para avaliar e identificar a presença de *N*-glicanos contendo a estrutura de GlcNAc bissecante em glicoproteínas, com o objetivo de

revelar seus papéis biológicos. Além de analisar a expressão da enzima que transfere o resíduo GlcNAc para a manose (GnT-III)²⁰⁴ em sistemas biológicos, a abordagem mais utilizada para detectar *bisecting* GlcNAc tem sido o uso da lectina PHA-E em experimentos de *blot* ou cromatografia de afinidade. Dessa forma, para avaliar o conteúdo *N*-glicanos contendo *bisecting* GlcNAc em venenos do gênero *Bothrops*, a lectina eritroaglutinina (PHA-E) de *Phaseolus vulgaris* foi utilizada neste estudo com base em sua especificidade em detectar glicanos contendo Gal terminal e *bisecting* GlcNAc presente nas glicoproteínas.

Os perfis eletroforéticos (Figura 11) e a quantificação de proteínas (Tabela 3) das frações dos proteomas reconhecidas pela PHA-E nos venenos de *Bothrops* aqui analisados mostraram variabilidade, no entanto, em concordância com o estudo de Andrade-Silva e colaboradores¹³¹, o veneno de *B. cotiara* foi o que resultou na maior quantidade de proteínas retidas na resina. Este veneno, da mesma forma que o de *B. fonsecai*, mostrou o reconhecimento de diversas bandas de proteínas no ensaio de *blot* com esta lectina na forma biotinizada (Figura 27). O veneno de *B. fonsecai* não fez parte do estudo anterior, porém a *B. cotiara* é morfologicamente e filogeneticamente muito próxima a *B. fonsecai*²⁵, e dessa forma, pelo menos com relação à presença de *N*-glicanos contendo *bisecting* GlcNAc, parece que esses dois venenos apresentam similaridade.

Em relação aos perfis eletroforéticos de proteínas presentes nas frações que interagiram com a PHA-E (Figura 11), bandas de diferentes intensidades e que variaram entre 10 kDa e 150 kDa foram observadas, refletindo a presença da estrutura *bisecting* GlcNAc em uma ampla variedade de componentes nos venenos de *Bothrops*. Ainda, a comparação dos perfis eletroforéticos das proteínas enriquecidas pela PHA-E em relação à SNA (Figura 7) e à MAL I (Figuras 14-17) indicou claramente que o perfil de proteínas retidas na resina PHA-E-agarose foi muito mais complexo, sugerindo que o repertório de glicoproteínas dos venenos de *Bothrops* seja mais rico em glicanos contendo a estrutura *bisecting* GlcNAc do que o ácido siálico nas configurações α 2-6 e α 2-3.

Com relação à quantidade de grupos de proteínas identificados, PHA-E mostrou valores altos e semelhantes entre os venenos avaliados (Figura 13) e proteínas glicosiladas como as SVMPs e SVSPs foram as toxinas enzimáticas identificadas em maior número. Comparativamente à SNA e à MAL, PHA-E também enriqueceu em maior quantidade componentes menos abundantes dos venenos, classificados neste estudo como “Outros” (Figura 13, Tabela 4). Além disso, as classes de toxinas identificadas distribuíram-se

homogeneamente entre os venenos (Figura 20B), sugerindo que a estrutura *bisecting* GlcNAc está presente nas principais glicoproteínas, diferentemente do que foi visto com a SNA e a MAL.

A PHA-E é uma lectina de leguminosa tetramérica, que pertence a uma família de cinco isolectinas isoladas da espécie *Phaseolus vulgaris*, formadas pela combinação de duas subunidades (E e L) ²⁰⁵. PHA-E possui quatro subunidades E (E4), sendo classificada dentro do grupo de lectinas do “tipo complexo”, uma vez que mostra uma preferência por *N*-glicanos do tipo complexo, e não por monossacarídeos. Inicialmente, observou-se que essa lectina se ligava especificamente a *N*-glicanos di-galactosilados e bissectados ²⁰⁶. Mais tarde, Cummings e Kornfeld ²⁰⁵ confirmaram que o resíduo de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) bissectado é essencial para a ligação. Yamashita e colaboradores ¹⁴³, determinaram que apenas a presença da galactose em uma das ramificações (α 1-6) do *N*-glicano era necessário para ser reconhecida pela lectina.

Posteriormente, Nagae e colaboradores ²⁰⁷ mostraram através da estrutura cristalográfica da PHA-E que a unidade de trissacarídeo (Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man) presente no *core* do *N*-glicano é claramente crítica para se ligar à lectina, podendo estar localizada tanto na ramificação α 1-3 ou α 1-6 do glicano biantenado. Porém foi atribuído ao resíduo *bisecting* GlcNAc, (que não interage diretamente com a lectina) o efeito de restringir as conformações do glicano, reduzindo o número de conformações do ligante e aumentando as chances de ser reconhecido pela PHA-E. Dessa forma, este reconhecimento do trissacarídeo em ambos os braços de *N*-glicanos do tipo complexo poderia explicar a razão pela qual muitas toxinas foram enriquecidas por esta lectina em todos os venenos, e preferencialmente nos venenos de *B. cotiara* e *B. fonsecai*, onde a presença da estrutura *bisecting* GlcNAc possibilitou o aumento da afinidade dessas glicoproteínas pela lectina PHA-E.

Em relação às proteínas enriquecidas pela lectina PHA-E, apenas sete foram encontradas comumente em todos os venenos, todas de caráter enzimático (Figura 13). Assim, a presença de SVMPS e SVSPs entre as sete proteínas comuns a todos os venenos analisados é condizente com estudos que mostraram a presença de *bisecting* GlcNAc em glicanos de metaloproteases ^{154,155}. Porém, um fato notável foi que PHA-E possibilitou enriquecer uma grande quantidade de proteínas que são pouco abundantes e que também são conhecidas por serem putativamente glicosiladas. Entre elas, foi detectada a enzima glutaminil-ciclase (GCT), uma proteína não considerada como toxina, mas que

desempenha papel importante no processo de maturação de algumas toxinas ao catalisar a ciclização de glutamina N-terminal, gerando um resíduo de ácido piroglutâmico ²⁰⁸. Essa reação é considerada uma modificação pós-traducional importante, como por exemplo em peptídeos potenciadores de bradicinina e em algumas SVMPs ²⁰⁹⁻²¹². A presença de GCT também foi relatada por Melani e colaboradores ²¹³, no proteoma do veneno *Crotalus durissus terrificus*, e também em venenos do gênero *Bothrops* ^{41,214}.

Quanto à função da estrutura *bisecting* GlcNAc em glicoproteínas, sua importância tem sido demonstrada em diferentes contextos biológicos, como por exemplo, na alteração da função de proteínas envolvidas em adesão, migração, crescimento e diferenciação celular ^{215,216}, assim como na estabilização de proteínas sob condições de estresse oxidativo, como foi mostrado com BACE1, enzima que cliva a forma precursora da proteína β -amiloide 1 ²¹⁷, e na regulação da atividade da enzima adenilil ciclase III ²¹⁸. No último caso, o aumento da atividade enzimática ocorreria porque a enzima se tornaria menos responsiva a sinais de inibição, devido à diminuição da estrutura de *N*-glicanos, já que a adição de *bisecting* GlcNAc pela GnT-III inibe a ação subsequente de glicosiltransferases ²¹⁸. Assim, esses e outros estudos revelaram que uma simples modificação da estrutura de *N*-glicanos, com a adição de GlcNAc, pode resultar em diferentes respostas biológicas.

Ainda, em nível molecular, a adição do resíduo GlcNAc, bissecando a estrutura do glicano, confere propriedades únicas ao reconhecimento de *N*-glicanos por lectinas, como descrito por Nagae e colaboradores ²¹⁹ que identificaram a importância do resíduo GlcNAc em diminuir o número de conformações possíveis do glicano, favorecendo assim a interação da estrutura com a lectina PHA-E pela diminuição da perda entrópica ²⁰⁷. Porém, foi mostrado que no caso do receptor DCIR2, uma lectina do tipo C expressa em células dendríticas clássicas, a presença do resíduo GlcNAc na posição bissecada viabiliza o aumento da especificidade de interação do ligante pelo contato direto desse resíduo com a lectina. Nesse contexto, Nagae e colaboradores ²¹⁹ descreveram que a interação direta entre o resíduo GlcNAc e a lectina, ocorre pela formação de pontes de hidrogênio.

Por fim, também foi relatado que glicanos contendo a estrutura *bisecting* GlcNAc apresentam funções em vias de supressão imunológica. Por exemplo, as células K562 são facilmente reconhecidas e mortas por células do tipo *natural killer* (NK); no entanto, após serem transfectadas com o gene que codifica a enzima GlcNAc-T III, as células K562, apresentando mais estruturas *bisecting* GlcNAc, mostraram maior resistência às células

NK²²⁰. O possível mecanismo subjacente a esta supressão poderia residir na ativação de vias de transdução de sinal particulares que modulam as funções das células imunológicas²⁰³.

Assim, diversos estudos têm mostrado a importância da estrutura *bisecting* GlcNAc em sistemas neurológicos, tolerância imunológica, na imunoglobulina G (IgG), e em metástase tumoral e desenvolvimento. Em glicoproteínas de venenos de serpentes, a estrutura *bisecting* GlcNAc também estaria associada a um efeito inibitório sobre as glicosiltransferases na via de síntese proteica, resultando na diminuição do conteúdo de estruturas ramificadas de *N*-glicanos. Uma hipótese é que esta estrutura em componentes glicosilados de venenos estaria envolvida na modulação da resposta das células do sistema imunológico da presa, como foi observado com células K562, que após aumentar a quantidade de estruturas *bisecting* GlcNAc tornaram-se resistentes à células NK. De toda forma, a presença da estrutura *bisecting* GlcNAc em diversas classes de toxinas de *Bothrops* indica sua potencial importância na interação entre toxina e alvo, seja este um receptor ou substrato de enzima.

5.3. Comparação dos subproteomas de proteínas de venenos de *Bothrops* enriquecidas pelas lectinas SNA, MAL e PHA-E

Os resultados deste estudo, mostrando que as três lectinas utilizadas para o enriquecimento de proteínas contendo resíduos de ácido siálico ou a estrutura *bisecting* GlcNAc também reconheceram proteínas putativamente não glicosiladas (CTL e PLA2) está em concordância com achados anteriores de nosso grupo, que mostraram o enriquecimento CTLs e PLA2s pelas lectinas ConA, WGA e PNA⁴¹. Esse fato pode ser explicado admitindo-se que pode ter ocorrido a interação inespecífica desses componentes de veneno com as lectinas em regiões diferentes daquelas envolvidas no reconhecimento de carboidratos. E o caráter de inespecificidade do reconhecimento desses componentes de veneno pode ser verificado pelo fato de que as três lectinas enriqueceram conteúdos diferentes de CTLs e PLA2s entre os venenos analisados (Figuras 8, 12 e 18). De todo modo, esse resultado corrobora diversos estudos que mostraram a variabilidade interespecífica de componentes de venenos de serpentes.

Não obstante, o uso de lectinas com diferentes especificidades possibilitou o enriquecimento de um total de 507 proteínas únicas de venenos do gênero *Bothrops*, incluindo 205 enriquecidas pela SNA, 308 pela MAL I e 326 por PHA-E, e (Figura 21;

Tabela Suplementar 15). Essas diferentes quantidades de proteínas enriquecidas refletem a abundância das proteínas acessadas por cada lectina, e apesar de a SNA ter sido usada apenas em experimentos com sete venenos, comparativamente, MAL I resultou em mais identificações, considerando que seu enriquecimento ocorreu majoritariamente em poucos venenos (quatro de nove venenos). Isso não ocorreu com a PHA-E que enriqueceu de forma homogênea as proteínas entre todos os venenos e teve contribuição de todas as espécies analisadas para a soma das proteínas acessadas. Uma explicação para o grande número de proteínas identificadas nas frações enriquecidas pela MAL I pode ser a etapa de descomplexação da amostra, que ocorreu antes da etapa de digestão das proteínas com tripsina. Essa etapa, provavelmente possibilitou aumentar o número de peptídeos tripsínicos identificados após a diminuição da complexidade das proteínas digeridas, já que o fracionamento da amostra ocorreu no momento da eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (Figura 21).

Estas diferentes proporções de grupos de proteínas identificados entre os venenos (Figura 20), assim como a quantidade variável de proteínas únicas enriquecidas (Figura 21), resultam da combinação entre as características de cada lectina em enriquecer diferentes estruturas de glicanos, e da diversidade estrutural dos *N*-glicanos que cada espécie de serpente utiliza na composição das glicoproteínas presentes em seus venenos. Com relação às proteínas reconhecidas pelas três lectinas (Figura 21), muitas provavelmente compartilham de *N*-glicanos que contêm Neu5Ac α 2-6, Neu5Ac α 2-3 e a estrutura *bisecting* GlcNAc. Uma vez que Andrade e colaboradores ¹³¹ mostraram que ácido siálico na posição α 2-6 é provavelmente menos comum em venenos de *Bothrops* e considerando que no caso da lectina PHA-E, a presença de ácido siálico ligado nesta posição exerce um efeito inibitório ¹⁴³ sobre a interação de oligossacarídeos, em contraste com a presença de ácido siálico ligado em α 2-3 ²²¹, é possível inferir que o número de proteínas compartilhadas entre PHA-E e SNA (48), quando comparado com o observado entre MAL I e PHAE (65) seja menor devido a limitações do reconhecimento da PHA-E. Além disso, é importante ressaltar que a presença de dímeros terminais de ácido siálico (ligados na posição α 2-8), relatados em quase todas as estruturas de *N*-glicanos de venenos de *Bothrops* ¹³¹ limita o reconhecimento de glicoproteínas pela lectina SNA ¹⁹¹. Este fato, aliado às configurações estruturais que a lectina SNA requer para se ligar ao *N*-glicano, pode explicar a pouca sobreposição de proteínas comuns enriquecidas por SNA e MAL I

(15) que contenham em suas estruturas de glicanos com ácido siálico nas duas configurações (α 2-6 e α 2-3).

Embora o método geralmente usado em muitos estudos para fracionar misturas complexas de glicoproteínas seja o reconhecimento por lectinas, há desvantagens nessa abordagem. A primeira desvantagem é a baixa especificidade e sensibilidade, que é bastante comum na maioria dos métodos de reconhecimento entre lectina e glicano. A segunda desvantagem é que o reconhecimento de glicoproteínas por uma lectina não tem correlação direta com a quantidade relativa da estrutura do glicano reconhecida por ela, presente na amostra. E ainda, este método não é capaz de revelar o sítio de glicosilação ou a estrutura do glicano. Entretanto, a aplicação de diferentes lectinas para o reconhecimento de glicoproteínas de venenos de serpentes é vantajosa no sentido de que os resultados revelam a variabilidade de componentes glicosilados e a sua contribuição na geração da complexidade dos venenos.

Os conjuntos de proteínas enriquecidos pelas três lectinas (subproteomas) também foram analisados em agrupamento hierárquicos de acordo com os venenos, permitindo avaliar as relações entre as espécies de *Bothrops* avaliadas neste estudo. O subproteoma enriquecido pela SNA, diferentemente das outras lectinas, gerou um agrupamento hierárquico de sete espécies que não espelhou a classificação filogenética das mesmas (Figura 22), com exceção de *B. moojeni* e *B. atrox* que se agruparam próximos e que são espécies relacionadas filogeneticamente ²⁵, apresentando dieta muito similar, fato que levou ¹⁵ a classificá-las no grupo *atrox*.

Por outro lado, o subproteoma enriquecido pela MAL I, apesar de agrupar as espécies em apenas dois clados (Figura 24), classificou quatro dos nove venenos (*B. jararaca*, *B. insularis*, *B. fonsecai* e *B. cotiara*) agrupando-os de forma semelhante ao observado nas classificações taxonômicas ²⁵. Esse resultado, de agrupamento hierárquico pelas proteínas enriquecidas pela MAL I, mostra a limitação da lectina em acessar todos os proteomas de forma similar, já que esse enriquecimento não depende apenas de sua especificidade, mas da distribuição dos *N*-glicanos entre as espécies.

A lectina PHA-E, por sua vez, devido à diversidade e quantidade de proteínas enriquecidas entre todos os venenos, possibilitou agrupar espécies relacionadas, gerando quatro clados distintos: um que reúne *B. jararaca* e *B. insularis*, em acordo com a classificação filogenética do Complexo Jarararaca; outro que agrupa *B. fonsecai* e *B.*

cotiara, espécies que são correlacionadas filogeneticamente; outro que agrupa *B. moojeni* e *B. erythromelas*, espécies não próximas filogeneticamente; e por último o grupo *B. jararacussu*, *B. atrox* e *B. neuwiedi*, espécies também distantes filogeneticamente²⁵ (Figura 23).

Ainda, com relação aos subproteomas enriquecidos por essas lectinas, ficou evidente que suas diferentes especificidades ampliou a identificação de proteínas pouco abundantes nos venenos, além de revelar sutis diferenças entre as composições dos venenos. Levando em consideração estes aspectos, todas as proteínas enriquecidas pelas três lectinas foram reunidas para compor a clusterização hierárquica dos venenos analisados, resultando no agrupamento das espécies em três grupos distintos (Figura 25), que parcialmente se assemelha à classificação filogenética das serpentes, baseada em dados de morfologia, marcadores genéticos e hábitos de alimentação. Considerando a diversidade de agrupamentos obtidos a partir dos subproteomas revelados por nossas análises, é provável que essa variabilidade reflita os caminhos distintos seguidos por cada espécie durante o processo evolutivo. No caso dos venenos do Complexo Jararaca (*B. jararaca* e *B. insularis*), apesar de apresentarem padrões de glicosilação semelhantes revelados pelo presente estudo, pela caracterização de *N*-glicanos¹³¹ e de subproteomas de proteínas com afinidade pelas lectinas ConA, WGA e PNA⁴¹, são consideradas espécies divergentes em relação a seus hábitos alimentares, sendo *B. jararaca* uma espécie generalista e *B. insularis* especialista em se alimentar de aves¹⁵. Considerando esses fatos, é possível sugerir que no caso dessas duas espécies, a estreita relação evolutiva se sobrepôs às diferenças relacionadas à dieta, moldando a manutenção do repertório de carboidratos presentes nas toxinas destes venenos.

Em contrapartida, nas espécies *B. cotiara* e *B. fonsecai* essa relação aparenta ser diferente, visto que além de serem intimamente relacionadas quanto ao seu habitat natural e classificação filogenética, também são consideradas, no que diz respeito aos hábitos alimentares, especialistas *stricto sensu*, alimentando-se apenas de mamíferos¹⁵.

De fato, hábitos alimentares têm sido associados à variabilidade em venenos de serpentes e, neste contexto, a microheterogeneidade encontrada entre as toxinas, pode ser considerada como uma assinatura funcional da variabilidade dos venenos que permita às espécies lidarem com diferentes tipos de presas.

5.4. Efeito da remoção enzimática de ácido siálico na atividade proteolítica de venenos do gênero *Bothrops*

Distúrbios hemostáticos estão entre os efeitos mais dramáticos do envenenamento por serpentes viperídeas. Os mecanismos que regulam a coagulação, fibrinólise, função plaquetária e integridade vascular em mamíferos são os principais alvos das toxinas e em especial, nos venenos do gênero *Bothrops*, além de componentes que atuam na fibrinólise direta, predominam os pró-coagulantes, muitos deles atuando na parte final na cascata de coagulação, ativando o fator X, a protrombina ou convertendo diretamente o fibrinogênio em fibrina.

Considerando que metaloproteases e serinoproteases são componentes importantes no quadro de envenenamento botrópico, e que estas proteínas contêm diversos sítios de glicosilação, avaliamos o papel de resíduos de ácido siálico em suas atividades enzimáticas. Para tanto, após a remoção de ácido siálico pela incubação com a enzima neuraminidase, o efeito da dessialilação das glicoproteínas dos venenos foi avaliado por ensaios de atividade enzimática sobre a gelatina (Figuras 30 e 31), o fibrinogênio (Figuras 33 e 34), o substrato Bz-Arg-pNA (Figura 32) e o plasma humano, avaliando tanto a atividade pró-coagulante dos venenos (Figura 35), quanto a degradação das proteínas do plasma após incubação com o veneno de *B. jararaca* dessialilado (Figura 37).

Com exceção da atividade amidolítica sobre Bz-Arg-pNA, que mostrou pouca alteração após a remoção de resíduos de ácido siálico, em todas as outras atividades enzimáticas avaliadas, nas quais foram utilizados substratos proteicos, a dessialilação provocou uma redução (Tabela 11), ainda que em proporções diferentes, de todos os venenos, indicando que as porções de carboidratos que contêm ácido siálico de SVSPs e SVMPs de *Bothrops* desempenham um papel na atividade proteolítica das mesmas, e possivelmente no quadro de envenenamento botrópico.

Tabela 11. Resumo do efeito da remoção de ácido siálico sobre as atividades amidolítica e proteolítica de venenos de *Bothrops*.

Veneno	Atividade amidolítica	Atividade gelatinolítica	Atividade fibrinogenolítica	Atividade coagulante
<i>B. atrox</i>	n.s.	↓ 66%	↓ 54%	↓ 10%
<i>B. cotiara</i>	n.s.	↓ 69%	↓ 20%	↓ 35%
<i>B. erythromelas</i>	n.s.	↓ 29%	n.s.	↓ 19%
<i>B. fonsecai</i>	↓ 30%	↓ 69%	n.s.	↓ 48%
<i>B. insularis</i>	n.s.	↓ 16%	n.s.	↓ 54%
<i>B. jararaca</i>	n.s.	↓ 54%	↓ 18%	↓ 42%
<i>B. jararacussu</i>	n.s.	↓ 47%	↓ 69%	↓ 47%
<i>B. moojeni</i>	n.s.	↓ 76%	↓ 61%	↓ 33%
<i>B. neuwiedi</i>	n.s.	↓ 21%	n.s.	↓ 37%

n.s. não alterada significativamente.

Em especial, com relação às atividades gelatinolítica e coagulante, todos os venenos tiveram suas atividades reduzidas significativamente após a dessialilação, evidenciando a importância desse monossacarídeo, no que diz respeito à atividade das proteases sobre substratos proteicos isolados ou sobre misturas de proteínas complexas, como no caso do plasma humano.

Quanto às diferentes quedas das atividades proteolíticas mensuradas (Tabela 11) é importante considerar que os conteúdos enzimáticos são diferentes nos venenos, assim como a quantidade de glicoproteínas que contêm ácido siálico em suas estruturas de *N*-glicanos. Dessa forma, alguns desses fatores podem influenciar o resultado final da remoção dos ácidos siálicos sobre a ação das proteases, quando suas atividades são avaliadas em amostras complexas, como os venenos.

De fato, considerando a variabilidade dos proteomas das espécies do gênero *Bothrops*, assim como as diferentes potências hidrolíticas de suas enzimas proteolíticas, uma das razões que explicam a diferença observada entre as atividades proteolíticas pode residir nos diferentes conteúdos de proteases presentes nos venenos, fato que é ampliado pelas modificações pós-traducionais nessas proteínas, resultando em diferentes conteúdos de glicofomas afetadas pela dessialilação. Ainda, o efeito da remoção de ácido siálico em proteínas isoladas pode levar a diferentes resultados no caso das proteases, a depender de como esses monossacarídeos contribuem para a manutenção de suas estruturas tridimensionais, para a proteção contra a degradação por outras proteases, para a atividade catalítica, ou se são essenciais para a interação com determinados substratos.

Ainda, quanto à presença de componentes que atuam sobre a cascata de coagulação sanguínea, é importante destacar que entre os venenos existem diferenças em relação às atividades de conversão de fibrinogênio em fibrina, e de ativação da protombina e do fator X, resultante de diferentes conteúdos de enzimas proteolíticas ²²²⁻²²⁵

O papel das porções de carboidratos nas atividades das proteases é muito diverso, uma vez que a glicosilação pode ter efeitos estimulante e inibidor sobre a atividade enzimática e muitos dados contraditórios foram apresentados para ligar o papel das porções de carboidratos na atividade/estabilidade de proteases. Somado a isso, poucas informações estão disponíveis a respeito do papel da glicosilação e suas implicações funcionais para proteases secretadas ²²⁶, especialmente quando se trata da presença dos carboidratos terminais, como os ácidos siálicos.

Na área de toxinologia, alguns trabalhos têm relatado efeitos determinantes dos glicanos sobre algumas toxinas ^{40,151,165,177,182,227}, e neste contexto poucos são os estudos que avaliam a função de ácidos siálicos sobre a atividade proteolítica de venenos de serpente. Além disso, vale destacar que a presença deste monossacarídeo tem sido estudada, em sua maior parte, apenas com toxinas isoladas.

Na Tabela 12 são apresentados alguns exemplos de toxinas (SVMPs e SVSPs) nas quais foi descrita a presença de resíduos de ácido siálico e os poucos estudos nos quais a análise da função desse monossacarídeo foi realizada.

Tabela 12. Enzimas proteolíticas isoladas de venenos de serpente nas quais foi descrita a presença de resíduos de ácido siálico, e a avaliação de seu papel na atividade proteolítica.

Toxina	Classe de toxina	Veneno	Ácido siálico		Referência
			Descrição	Avaliação da função	
Ancrod	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	*		159,228
Acutobina	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Deinagkistrodon acutus</i>		*	132,160
Batroxobina	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Bothrops atrox/B. moojeni atrox</i>		*	158,228–230
Bilineobina	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Agkistrodin bilineatus</i>		*	231
BJ-48	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	*		183
BjussuSP-I	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	*		185,232
BpSP-I	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Bothrops pauloensis</i>		*	165
Crotalase	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>		*	233
Giroxina	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	*		234
Kangshuanmei	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Agkistrodon halys brevicaudus stejneger</i>	*		151
TLE_B. pictus	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Bothrops pictus</i>	*		186
TLBan	<i>SVSP_thrombin-like enzyme</i>	<i>Bothrops andianus</i>	*		235
Trocarina	<i>SVSP_prothrombin-activator</i>	<i>Tropidechis carinatus</i>	*		236
VAA-E	<i>SVSP- kallikrein-like</i>	<i>Vipera aspis aspis</i>		*	237
VLfVA	<i>SVSP_factor V activator</i>	<i>Vipera lebetina</i>	*		238,239

ACLH	<i>SVMP</i>	<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	*	42
Bilitoxin-1	<i>SVMP</i>	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	*	240
Proteinase G	<i>SVMP</i>	<i>Bothrops asper</i>	*	241
RVV-X	<i>SVMP_factor X activator</i>	<i>Daboia siamensis</i>	*	133,154,242
VLFXA	<i>SVMP_factor X activator</i>	<i>Vipera lebetina</i>	*	243

A maioria das SVSPs contém vários sítios de glicosilação e, portanto, a taxa de glicosilação difere muito entre essas enzimas^{46,182,184,244}. Responsáveis por causar um desequilíbrio do sistema hemostático no envenenamento botrópico humano, ao realizar a hidrólise específica de vários substratos chave da cascata de coagulação, as serinoproteases atuam principalmente sobre os sistemas fibrino(geno)lítico e calicreína-cinina, e sobre as plaquetas, conforme ilustrado na Figura 41.

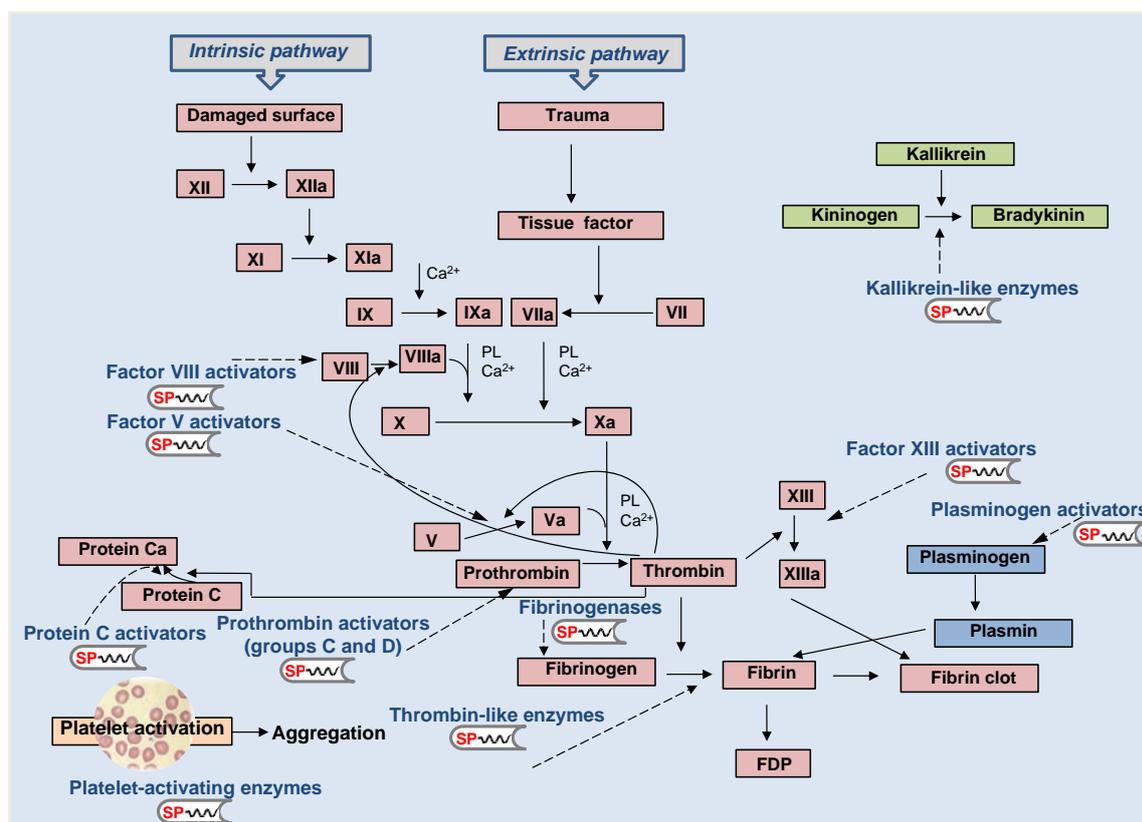


Figura 41. Esquema das vias fisiológicas de coagulação sanguínea/fibrinólise e de agregação plaquetária nas quais ocorrem a ação das SVSPs. Figura extraída de Serrano, 2013⁴⁶.

Uma vez que o fibrinogênio está envolvido nas fases finais da coagulação como um precursor da fibrina, a avaliação de sua degradação por SVSPs tem sido o foco de muitos estudos que avaliam tanto a presença de *N*-glicanos^{182,183,231,232,245}, como de resíduos de ácido siálico (Tabela 12), os quais têm reportado papéis diversos para a porção de carboidratos nas atividades das enzimas.

As serinoproteases do tipo trombina, conhecidas como enzimas que convertem diretamente o fibrinogênio em fibrina em decorrência da clivagem das cadeias alfa e/ou beta do fibrinogênio e liberação dos fibrinopeptídeos A e/ou B, são ativadores da cascata de coagulação presentes na maioria dos venenos de serpentes da família Viperidae²²³.

Geralmente, essas enzimas exibem atividade fibrinogenolítica específica, não ativando o fator XIII, o plasminogênio ou as plaquetas^{45,246}. Por gerarem polímeros de fibrina, e não serem inibidas pelo complexo heparina/antitrombina III, são úteis para reduzir a concentração de fibrinogênio e a viscosidade do sangue em pacientes; mostrando um importante potencial terapêutico²²⁸.

Dessa forma, efeitos diversos foram relatados para as SVSPs tipo trombina após a remoção de ácido siálico, como (i) a não alteração das atividades fibrinogenolítica e amidolítica das enzimas, no caso da acutobina¹⁶⁰ e crotalase²³³, sobre os substratos sintéticos Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA e H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, respectivamente; (ii) a manutenção da degradação das cadeias alfa e beta do fibrinogênio, mas a perda da atividade hidrolítica sobre TAME (*N* α -*p*-tosyl-*l*-arginine methyl ester), no caso da bilineobina²³¹; (iii) ou apenas a diminuição da capacidade proteolítica da enzima, como ocorreu com a batroxobina²³⁰. Ainda, no caso da enzima tipo trombina de *B. pauloensis* (BpSP-I)¹⁶⁵, a cinética da atividade pró-coagulante manteve-se inalterada após a remoção de ácido siálico, da mesma forma que a VAA-E, uma SVSP do tipo calicreína, cuja atividade proteolítica não foi afetada pela dessialilação²³⁷.

De forma geral, embora os resultados dos estudos com as serinoproteases tenham sido variados, a remoção de ácido siálico provocou a diminuição ou não alterou a atividade de catálise dessas enzimas ou seja, não favoreceu a atividade catalítica, como foi descrito para algumas proteases submetidas à *N*-desglicosilação como a *Bothrops* protease A¹⁸² e a própria bilineobina²³¹. Nestas proteases, as variações de resultados poderiam ser explicadas principalmente levando em consideração a posição dos *N*-glicanos em suas estruturas tridimensionais, já que próximos aos sítios catalíticos, os carboidratos poderiam ter efeito protetor e pró-catalítico, como proposto para as proteases I e II (AaV-SP-I e AaV-SP-II) de *Agkistrodon acutus*²⁴⁴, que se diferenciaram quanto à presença de Asn ou Asp na posição 35, ou podem resultar em um impedimento estérico, dificultando o acesso de substratos ao sítio ativo, como sugerido para AhV_TL_1²⁴⁷, onde um dissacarídeo foi mapeado na estrutura próxima ao centro catalítico, deformando a alça 99.

Com relação à batroxobina, além da diminuição, em diferentes proporções, das atividades dessa protease após a dessialilação²³⁰, também foi relatada a ação protetora dos resíduos de ácido siálico contra inibidores. Efeito similar também foi observado com as enzimas tipo trombina BJ-48¹⁸³ e russelobina²⁴⁵ com os inibidores, respectivamente, SBTI, e alfa-2-macroglobulina e antithrombin-III, porém após a remoção de seus *N*-glicanos.

Assim, foi identificado que no caso da batroxobina os ácidos siálicos contribuem para a atividade catalítica ²³⁰, e também desempenham um papel na proteção dessa enzima contra a neutralização por inibidores fisiologicamente relevantes, como alfa-2-macroglobulina ²³⁰. Este é um bom exemplo de como as funções exercidas pelos ácidos siálicos em uma mesma proteína, não são mutuamente exclusivas, podendo estes exercer diferentes papéis.

Nesse sentido, um bom exemplo de variabilidade são os diferentes níveis de sialilação em algumas toxinas e como esta confere microheterogeneidade entre os venenos, ou mesmo dentro de um mesmo veneno. Diferentes glicofomas têm sido descritas e observadas a partir de focalização isoelétrica ou análise por eletroforese bidimensional de venenos ^{119,184,233} e dessa forma a microheterogeneidade de formas de toxinas individuais deve ser considerada quando se avalia o papel dos glicanos em suas atividades enzimáticas.

Assim, em relação à microheterogeneidade, a contribuição da presença de ácidos siálicos foi relatada para as enzimas tipo trombina ancoed ²⁴⁸, crotalase ²³³ e batroxobina ²³⁰. E apesar de o tratamento da crotalase com neuraminidase ter gerado mudança no perfil de focalização isoelétrica da enzima, não ocorreu a alteração da atividade amidolítica e de coagulação do fibrinogênio ²³³. Os autores deste trabalho sugeriram que o ácido siálico não desempenha, nessa proteína, um papel funcional na atividade enzimática, mas pode estar envolvido na estabilidade durante o armazenamento na glândula de veneno ou durante a circulação no sangue da presa ²³³.

O mesmo também foi observado por Komori e Nikai ²³⁷, que associaram à presença de ácido siálico grande contribuição na manutenção da estabilidade da enzima tipo calicreína do veneno de *Vipera aspis aspis* (VAA-E), sugerindo que as cadeias de carboidratos poderiam servir para proteger a enzima de inibidores naturais no plasma. Já a atividade enzimática da protease, manteve-se inalterada após tratamento com sialidase.

A presença de ácido siálico também tem sido citada como importante fonte de microheterogeneidade em outras proteases isoladas, e estudos de remoção deste monossacarídeo têm mostrado que essa variabilidade pode ser conferida não apenas pela presença de diferentes graus de sialilação dos *N*-glicanos (Fator B, uma protease da cascata do Complemento ²⁴⁹), mas também pelas diferenças estruturais nas sequências de oligossacarídeos (plasminogênio, o precursor da plasmina ²⁵⁰).

Com relação às metaloproteases de venenos de serpentes, muitas desempenham papéis importantes nos efeitos patológicos do envenenamento, incluindo dano tecidual local, hemorragia e coagulopatia ^{35,222,251}. A hemorragia e a coagulopatia induzidas por

metaloproteases de veneno de serpente são fenômenos de grande complexidade que envolvem seu efeito sinérgico sobre proteínas plasmáticas, plaquetas e vasos capilares 223,252,253.

Nesse sentido, as metaloproteases RVV-X, de *Daboia siamensis*, e bilitoxin-1, de *Agkistrodon bilineatus*, foram avaliadas quanto à suas atividades pró-coagulante e hemorrágica, após a remoção de ácido siálico. A dessialilação de RVV-X não alterou sua atividade catalítica sobre o substrato Fator X, da mesma forma que o processo de sialilação enzimática dos resíduos de β -galactosil terminais dos glicanos também não provocou a alteração desta atividade, o que levou os autores a sugerir que os carboidratos terminais não eram críticos para o reconhecimento e ativação do fator X ²⁴². Mais tarde, Chen e colaboradores ¹³³ demonstraram que o tratamento com a neuraminidase não alterou a capacidade pro-coagulante da enzima *in vitro*; porém, em experimentos *in vivo*, a geração de produtos de degradação do fibrinogênio (PDFs) de RVV-X dessialilada foi mais lenta e cerca de 30-40% menor do que a proteína nativa. Com esses resultados, os autores sugeriram a contribuição dos epítomos S_{Lex} e S_{Lea} presentes em RVV-X para ligação específica às selectinas E e P de células endoteliais ativadas ou plaquetas, e que a remoção de ácido siálico de RVV-X possivelmente tenha diminuído ou retardado sua localização no sistema vascular, diminuindo sua capacidade de se ligar ao complexo protrombinase, gerando assim menos PDF.

Quanto à remoção do ácido siálico de bilitoxin-1, foi observada uma diminuição de 75% da atividade hemorrágica da metaloprotease, enquanto que a atividade proteolítica sobre a caseína não foi afetada ²⁴⁰. De forma semelhante, os autores hipotetizaram que a remoção dos ácidos siálicos tenha provocado uma diminuição da interação com as selectinas E ou P das células endoteliais, fator importante e essencial para posicionar a toxina em estreita proximidade com as membranas basais ao redor dos capilares.

A presença de ácido siálico também tem sido citada como crítica na atividade de alguns fatores de coagulação sanguínea, assim como na determinação da meia-vida plasmática de várias glicoproteínas que fazem parte deste sistema ²⁵⁴. E considerando que a cascata de coagulação é um conjunto de reações sequenciais, no qual muitas proteases também são substratos de outras, estudos que avaliam a glicosilação e seus efeitos tanto para a ativação das proteases, como em relação às suas atividades enzimáticas são de relevante importância para avaliar o papel de ácido siálico nestas proteases, afim de compreender os seus múltiplos papéis.

Assim, a avaliação do Fator X, que possui *N*- e *O*-glicanos na porção peptídica clivada proteoliticamente durante sua ativação para FXa, foi realizada por meio de mutagênese de seus sítios de ligação de glicanos²⁵⁵ e remoção enzimática de ácido siálico²⁵⁶. Remover os *N*-glicanos aumentou significativamente a ativação de FX por FVIIa ou FIXa, enquanto que sua dessialilação resultou em uma redução significativa da ativação do zimogênio pelos complexos intrínsecos (FIXa/FVIIIa) e extrínsecos (TF/FVIIa) de ativação.

As metaloproteases de veneno, além de serem capazes de degradar proteínas da cascata de coagulação sanguínea, também podem apresentar como alvo o fator de von Willebrand (vWF)^{40,257}. Com relação à metaloproteases endógenas, a ADAMTS 13, uma metaloprotease que processa o vWF, estudos sobre o papel do ácido siálico²⁵⁸ na enzima mostraram que presença desse carboidrato favorecia a forma fechada/inativa da proteína impedindo a ativação de vWF, enquanto que no vWF, o ácido siálico exercia a função de proteção contra ação de outras serinoproteases e cisteíno-proteases, ao mesmo tempo que aumentava a suscetibilidade à proteólise de ADAMTS 13²⁵⁹. Em contrapartida, foi observado que a clivagem das proteínas plaquetárias GPIb e GPV, mediada por ADAM 17, requeria a ação de dessialidases para estas glicoproteínas se tornarem substratos alvos da enzima²⁶⁰.

Efeito semelhante em relação a proteases e seus substratos também foi obtido tanto com a neprilisina (NEP) e a DPP-IV, quanto para GLP-1, um de seus substratos. Para DPP-IV (CD26), uma serina exopeptidase que cliva dipeptídeos Xaa-Pro no N-terminal de oligopeptídeos, presente em várias sialoformas¹²⁸ na membrana celular de muitos tecidos, foi demonstrada não apenas a importância da sialilação para o seu tráfego até a membrana apical nas células²⁶¹, mas também diferentes funções do ácido siálico em casos patológicos, nos quais a remoção de ácido siálico dessa enzima em amostras de pacientes com artrite reumatoide, aumentou sua atividade²⁶². Da mesma forma, no caso da NEP, uma metaloprotease de membrana, dependente de zinco, foram reportadas diferentes funções do ácido siálico, a depender do tecido avaliado. Assim, em células hematopoiéticas de linhagem B²⁶³ a remoção deste resíduo não provocou uma perda da atividade da NEP, mas em contrapartida, o nível de hipossialilação desta enzima em músculo de portadores de miopatia autossômica recessiva hereditária, mostrou-se associado à perda de função e estabilidade da enzima, exercendo um papel importante no mecanismo patogênico da doença²⁶⁴.

Em contrapartida, estudos de sialilação, aplicando uma estratégia de glicoengenharia para aumentar a estabilidade do peptídeo *glucacon-like* (GLP-1), mostrou aumentar sua estabilidade frente a proteases e principalmente sua resistência contra ambas as metalopeptidases (NEP e DPP-IV), quando adicionado o grupo sialil LacNAc ao peptídeo. Dessa forma, pela análise cinética das reações de degradação, foi sugerido que o componente de ácido siálico desempenhou um papel fundamental na diminuição da afinidade DPP-IV pelo peptídeo ²⁶⁵. No caso das metaloproteases de matriz (MMPs) a importância do ácido siálico tem sido reportada principalmente em *O*-glicanos, no qual seu papel tem sido relacionado tanto na manutenção das enzimas, protegendo da auto-proteólise (MT1-MMP ²⁶⁶), ou mesmo exercendo papel fundamental da ligação de inibidores (SSL5, uma toxina de estafilococos) à sua molécula alvo (MMP-9, uma gelatinase B) ²⁶⁷.

Por fim, com relação à degradação das proteínas do plasma humano pelas proteases do veneno da *B. jararaca*, a análise peptidômica mostrou que a remoção de ácido siálico com a neuraminidase resultou na redução da atividade proteolítica e na geração de diferentes peptídeos (Figura 37). Ainda, em alguns casos, como na degradação de fibrinogênio (Figura 38) e de protrombina (Figura 39), houve alteração dos peptídeos oriundos desses substratos após incubação com amostras de veneno íntegro e pré-incubado com neuraminidase, sugerindo que a dessialilação possivelmente provocou uma alteração na especificidade das proteases do veneno que degradam essas proteínas plasmáticas.

Nesse contexto, Wang e colaboradores ¹⁶⁰, ao avaliarem os *N*-glicanos presentes na acutobina, e a atividade enzimática de suas formas recombinantes (HKATB e SWATB), identificaram que a ausência de estruturas dissialiladas e uma distribuição em diferentes extensões deste resíduo nas estruturas dos *N*-glicanos, quando comparado com a acutobina nativa, provocaram alterações tanto na sua especificidade, quanto na reatividade dessas enzimas em relação ao fibrinogênio, o substrato da acutobina. Originalmente, a acutobina cliva preferencialmente apenas cadeia Aa do fibrinogênio, com maior especificidade para fibrinogênio humano; porém no caso da forma recombinante HKATB, as três cadeias do fibrinogênio humano e de coelho foram clivadas, sendo que a clivagem do fibrinogênio humano tornou-se menos específica, com a ausência de liberação do fibrinopeptídeo A pela enzima. Ainda com relação à forma recombinante SWATB, a alteração dos *N*-glicanos em comparação com a forma nativa mostrou menor estabilidade e atividade mais baixa sobre o fibrinogênio humano.

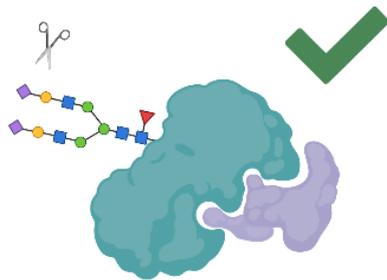
Dessa forma, considerando esses exemplos, podemos sugerir que a dessialilação do veneno de *B. jararaca* pode ter provocado tanto a perda de estabilidade das proteases, quanto a alteração de suas interações com seus substratos e catálise.

Ainda que diferentes resultados tenham sido reportados sobre a função do ácido siálico na atividade proteolítica de venenos de serpentes, é possível resumir alguns dos papéis identificados em proteases, tais como: (i) o efeito estabilizador sobre a estrutura, ainda que sem alteração da atividade catalítica sobre alguns substratos^{237,240}; (ii) a participação desse carboidrato na atividade catalítica sobre diferentes substratos, sendo estes macromoleculares ou sintéticos^{230,231}; (iii) a proteção contra a proteólise²⁵⁹; (iv) proteção contra inibidores²²⁸; (v) possível interação com células imunes carregando *siglecs* específicas que se ligam preferencialmente a epítomos disialil; (vi) aumento da meia-vida *in vivo* por servir de máscara biológica, escondendo porções Gal e GalNAc terminais, normalmente removidas da circulação por receptores de asialoproteínas (receptor Ashwell-Morell)¹⁶⁰, (vii) interação *in vivo* com selectinas E e P, auxiliando a protease na localização no sistema vascular, assim como na interação com as plaquetas^{133,240}.

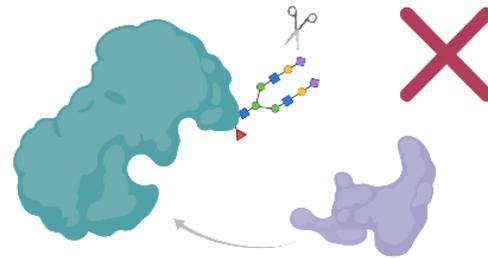
A ilustração mostrada na Figura 42 sintetiza alguns dos papéis atribuídos aos resíduos de ácido siálico em proteases de venenos de serpentes, assim como em enzimas humanas.

A. Função em estabilidade e catálise

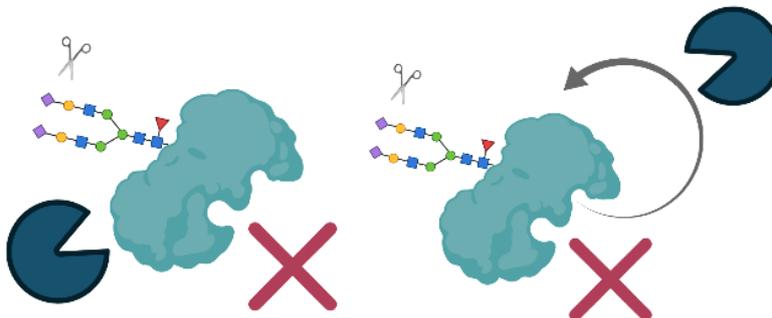
Papel neutro



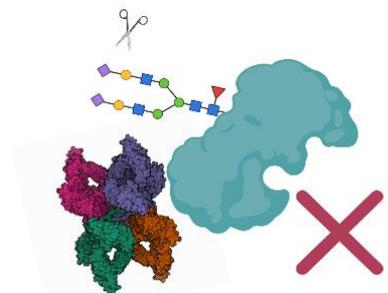
Pró-catálise



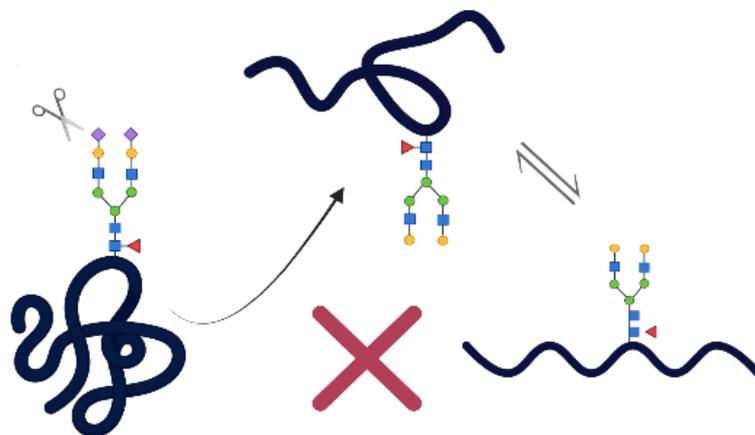
Proteção contra proteólise e autoproteólise



Proteção contra inibidores



Manutenção da estrutura proteica



B. Função biológica

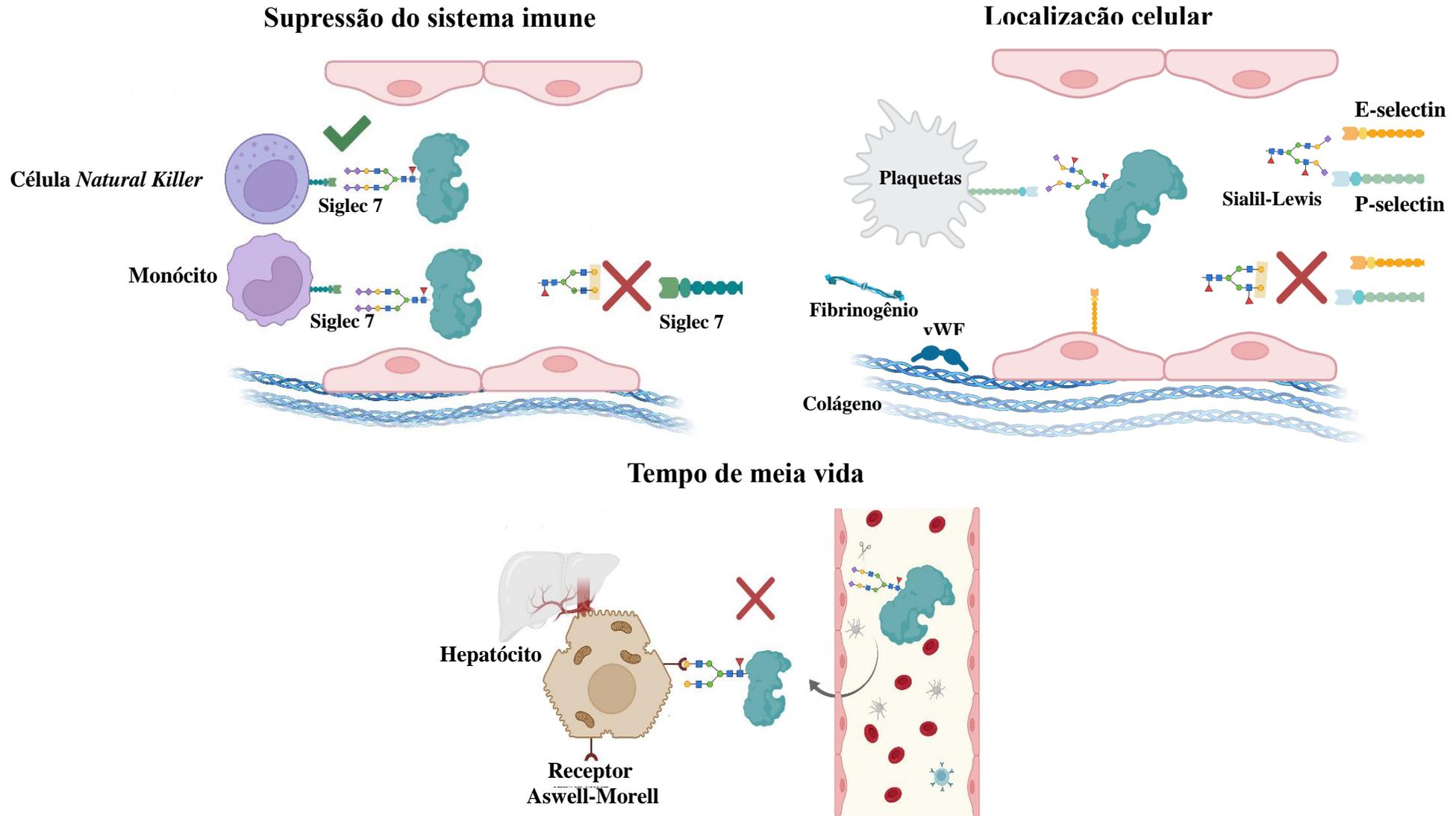


Figura 42. Resumo das principais ideias sugeridas sobre o papel de resíduos de ácido siálico em proteases. (A) Funções estruturais deste monossacarídeo para estabilidade da proteína, e sua contribuição para a atividade catalítica. (B) Papel biológico no organismo da presa, servindo de ligantes para células imunológicas, ou como máscaras biológicas evitando a remoção da protease da circulação sanguínea, ou contribuindo para o direcionamento celular e posicionamento da protease próxima a seus substratos, via interação com selectinas. Os sinais ✓ e ✗ indicam, respectivamente, a manutenção e a supressão da atividade, após a remoção enzimática de ácido siálico.

Considerando essa representação gráfica sobre o papel múltiplo de resíduos de ácido siálico em proteases glicosiladas, é possível ter a dimensão de como este carboidrato, em misturas complexas como os venenos de serpentes, pode ter efeitos diversos e que não são mutuamente exclusivos. Além disso, apesar de todos os efeitos possíveis, a observação da redução da maioria das atividades proteolíticas dos venenos de venenos do gênero *Bothrops* aqui analisados, nos leva a afirmar que os resíduos de ácido siálico apresentam um papel fundamental nas principais proteases dos venenos, contribuindo de forma efetiva nas manifestações do quadro de envenenamento botrópico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo atingiu sua meta principal, que foi analisar a variabilidade dos proteomas de nove venenos do gênero *Bothrops*, com foco em seus sub-proteomas de glicoproteínas, e o papel do ácido siálico na atividade de proteases desses venenos.

Este estudo, de caráter pioneiro em toxinologia, possibilitou a aplicação da capacidade de reconhecimento de carboidratos de diferentes lectinas, aliada à identificação de proteínas por espectrometria de massas, para caracterizar os diferentes subproteomas de glicoproteínas contendo ácido siálico e *N*-acetilglicosamina bissecada em venenos de *Bothrops*.

Os resultados obtidos sobre a identificação dos subproteomas de glicoproteínas evidenciaram a complexidade e a variabilidade desses venenos, caracterizada pelos diferentes conteúdos de componentes glicosilados contendo ácido siálico e *N*-acetilglicosamina bissecada, nas diferentes famílias de toxinas.

O papel de resíduos de ácido siálico em glicanos de enzimas proteolíticas, seja na interação com substratos ou na catálise, ficou claro, na medida em que as atividades de hidrólise de diversas proteínas foram afetadas pela remoção de ácido siálico pelo tratamento dos venenos com neuraminidase.

Assim, investigações futuras sobre a composição dos proteomas de venenos de serpentes e sobre as relações entre estrutura química e função de enzimas proteolíticas poderão se beneficiar dos resultados mostrados aqui, permitindo sua ampliação no sentido de avançar o conhecimento sobre o arsenal de toxinas de venenos de *Bothrops* e seus efeitos nos casos de acidentes ofídicos em humanos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Pyron, R. A.; Burbrink, F. T.; Colli, G. R.; de Oca, A. N. M.; Vitt, L. J.; Kuczynski, C. A.; Wiens, J. J. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2011**, *58* (2), 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.006>.
- (2) Pyron, R. A.; Burbrink, F. T.; Wiens, J. J. A phylogeny and revised classification of squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol. Biol.* **2013**, *13* (1), 1–54. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-93/FIGURES/28>.
- (3) Vidal, N. Colubroid Systematics: Evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. *J. Toxicol-Toxin Rev.* **2002**, *21* (2), 21–41.
- (4) Longbottom, J.; Shearer, F. M.; Devine, M.; Alcoba, G.; Chappuis, F.; Weiss, D. J.; Ray, S. E.; Ray, N.; Warrell, D. A.; Ruiz De Castañeda, R.; Williams, D. J.; Hay, S. I.; Pigott, D. M.; Vulnerability to snakebite envenoming: a global mapping of hotspots. *Lancet* **2018**, *392*, 673–684. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31224-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31224-8).
- (5) Warrell, D. A. Snake bite. *The Lancet*. Lancet Publishing Group January **2010**, pp 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2).
- (6) Gutiérrez, J. M.; Calvete, J. J.; Habib, A. G.; Harrison, R. A.; Williams, D. J.; Warrell, D. A. Snakebite envenoming. *Nat. Publ. Gr.* **2017**, *3*, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>.
- (7) Gutiérrez, J. M.; Williams, D.; Fan, H. W.; Warrell, D. A. snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. *Toxicon* **2010**, *56* (7), 1223–1235. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.020>.
- (8) Kerkkamp, H. M. I.; Casewell, N. R.; Vonk, F. J. Evolution of the snake venom delivery system. *Evol. Venom. Anim. Their Toxins* **2015**. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6727-0_11-1.
- (9) Sant’Ana Malaque, C. M.; Gutiérrez, J. M. Snakebite envenomation in Central and South America. In *Critical Care Toxicology*; Springer International Publishing, **2015**; pp 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2_146-1.
- (10) Warrell, D. A. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. In *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*; Comstock Publishing Associates: London, **2004**; p 709–761.

- (11) Melgarejo, A. R. Animais peçonhentos no Brasil. In *Serpentes peçonhentas do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*; São Paulo, **2009**; pp 42–70.
- (12) Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Acidente Por Animais Peçonhentos, Serpentes Peçonhentas. Notificações Registradas: Banco de Dados. *Ministério da Saúde*. **2019**.
- (13) Nogueira, C. C.; Argôlo, A. J. S.; Arzamendia, V.; Azevedo, J. A.; Barbo, F. E.; Bérnils, R. S.; Bolochio, B. E.; Borges-Martins, M.; Brasil-Godinho, M.; Braz, H.; Buononato, M. A.; Cisneros-Heredia, D. F.; Colli, G. R.; Costa, H. C.; Franco, F. L.; Giraud, A.; Gonzalez, R. C.; Guedes, T.; Hoogmoed, M. S.; Marques, O. A.V.; Montingelli, G. G.; Passos, P.; Prudente, A. L.C.; Rivas, G. A.; Sanchez, P. M.; Serrano, F. C.; Silva, N. J.; Strüssmann, C.; Vieira-Alencar, J. P. S.; Zaher, H.; Sawaya, R. J.; Martins, M. . Atlas of brazilian snakes: verified point-locality maps to mitigate the wallacean shortfall in a megadiverse snake fauna. *South Am. J. Herpetol.* **2020**, *14* (sp1), 1. <https://doi.org/10.2994/sajh-d-19-00120.1>.
- (14) Campbel, J. A.; Lamar, W. W. *The Venomous Reptiles of Latin America*, 6^o ed.; Comstock; Ithaca and London, **1989**.
- (15) Martins, M., Marques, O. A. V., and Sazima, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: Schuett, G.W., Hoggren, M., Douglas, M.E., Greene, HW (Eds). *Biology of the vipers*. Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain Publishing, **2002**; pp 307–328
- (16) Zelanis, A.; Tashima, A. K.; Rocha, M. M. T.; Furtado, M. F.; Camargo, A. C. M.; Ho, P. L.; Serrano, S. M. T. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (5), 2278–2291. <https://doi.org/10.1021/pr901027r>.
- (17) Zelanis, A.; de Souza Ventura, J.; Chudzinski-Tavassi, A. M.; Furtado, M. de F. D. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: an ontogenetic approach. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *145* (4), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.02.009>.
- (18) Zelanis, A.; Tashima, A. K.; Pinto, A. F. M.; Leme, A. F. P.; Stuginski, D. R.; Furtado, M. F.; Sherman, N. E.; Ho, P. L.; Fox, J. W.; Serrano, S. M. T. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. *Proteomics* **2011**, *11* (21), 4218–4228. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100287>.
- (19) Zelanis, A.; Andrade-Silva, D.; Rocha, M. M.; Furtado, M. F.; Serrano, S. M. T.; Junqueira-de-Azevedo, I. L. M.; Ho, P. L. A transcriptomic view of the proteome

- variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (3), 15–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001554>.
- (20) Freitas-de-Sousa, L. A.; Nachtigall, P. G.; Portes-Junior, J. A.; Holding, M. L.; Nystrom, G. S.; Ellsworth, S. A.; Guimarães, N. C.; Tioyama, E.; Ortiz, F.; Silva, B. R.; et al. Size Matters: An evaluation of the molecular basis of ontogenetic modifications in the composition of *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxins (Basel)*. **2020**, *12* (12). <https://doi.org/10.3390/toxins12120791>.
- (21) Dias, G. S.; Kitano, E. S.; Pagotto, A. H.; Sant’Anna, S. S.; Rocha, M. M. T.; Zelanis, A.; Serrano, S. M. T. Individual variability in the venom proteome of juvenile *Bothrops jararaca* specimens. *J. Proteome Res.* **2013**, *12* (10), 4585–4598. <https://doi.org/10.1021/pr4007393>.
- (22) Zelanis, A.; Menezes, M. C.; Kitano, E. S.; Liberato, T.; Tashima, A. K.; Pinto, A. F. M.; Sherman, N. E.; Ho, P. L.; Fox, J. W.; Serrano, S. M. T. Proteomic identification of gender molecular markers in *Bothrops jararaca* venom. *J. Proteomics* **2016**, *139*, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.030>.
- (23) Gonçalves-Machado, L.; Pla, D.; Sanz, L.; Jorge, R. J. B.; Leitão-De-Araújo, M.; Alves, M. L. M.; Alvares, D. J.; De Miranda, J.; Nowatzki, J.; de Moraes-Zani, K.; et al. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the brazilian atlantic rainforest. *J. Proteomics* **2016**, *135*, 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.04.029>.
- (24) Carrasco, P. A.; Mattoni, C. I.; Leynaud, G. C.; Scrocchi, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zool. Scr.* **2012**, *41* (2), 109–124. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x>.
- (25) Fenwick, A. M.; Gutberlet, R. L.; Evans, J. A.; Parkinson, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zool. J. Linn. Soc.* **2009**, *156* (3), 617–640. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00495.x>.
- (26) Wüster, W.; Salomão, M. D. G.; Quijada-Mascareñas, J. A.; Thorpe, R. S.; BBBSP. Origin and evolution of the south american pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. *Biol. Vipers* **2002**, No. May 2014, 111–128.
- (27) Castoe, T. A.; Parkinson, C. L. Bayesian mixed models and the phylogeny of

- pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2006**, *39* (1), 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.12.014>.
- (28) Markland, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* **1998**, *36* (12), 1749–1800. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00126-3).
- (29) Aird, S. D.; Aggarwal, S.; Villar-Briones, A.; Tin, M. M. Y.; Terada, K.; Mikheyev, A. S. Snake venoms are integrated systems, but abundant venom proteins evolve more rapidly. *BMC Genomics* **2015**, *16* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1832-6>.
- (30) Villar-Briones, A.; Aird, S. D. Organic and peptidyl constituents of snake venoms: the picture is vastly more complex than we imagined. *Toxins* **2018**, *10* (10), 392. <https://doi.org/10.3390/TOXINS10100392>.
- (31) Casewell, N. R.; Wüster, W.; Vonk, F. J.; Harrison, R. A.; Fry, B. G. Complex Cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Cell Trends in Ecology and Evolution* **2013**. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>.
- (32) Karlsson, E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Herken, H., Welch, B. A. D., Lee, C., Eds.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York, 1979; Vol. 52, pp 159–212.
- (33) Warrell, D. A. Snake Bite. *Lancet* **2010**, *375*, 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2).
- (34) Fox, J. W.; Serrano, S. M. T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* **2008**, *8* (4), 909–920. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700777>.
- (35) Fox, J. W.; Serrano, S. M. T. Insights snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* **2008**, *275* (12), 3016–3030. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>.
- (36) Fox, J. W.; Serrano, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* **2005**, *45* (8), 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>.
- (37) Gram, F.; Hubera, R.; Kressb, L. F.; Moroder, L.; Bode, W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS* **1993**, *335*, 76–80.
- (38) Shimokawa, K.-I.; Jia, L.-G.; Wang, X.-M.; Fox, J. W. Expression, activation, and

- processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *335* (2), 283–294.
- (39) Moura-Da-Silva, A. M.; Almeida, M. T.; Portes-Junior, J. A.; Nicolau, C. A.; Gomes-Neto, F.; Valente, R. H. Processing of snake venom metalloproteinases: generation of toxin diversity and enzyme inactivation. *Toxins (Basel)*. **2016**, *8*, 183. <https://doi.org/10.3390/toxins8060183>.
- (40) Oliveira, A. K.; Leme, A. F. P.; Asega, A. F.; Camargo, A. C. M.; Fox, J. W.; Serrano, S. M. T. New Insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. *Thrombosis and Haemostasis* **2010**, 485–497. <https://doi.org/10.1160/TH09-12-0855>.
- (41) Andrade-Silva, D.; Zelanis, A.; Kitano, E. S.; Junqueira-De-Azevedo, I. L. M.; Reis, M. S.; Lopes, A. S.; Serrano, S. M. T. Proteomic and glycoproteomic profilings reveal that post-translational modifications of toxins contribute to venom phenotype in snakes. *J. Proteome Res.* **2016**, *15* (8), 2658–2675. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00217>.
- (42) Garcia, L. T.; Parreiras, L. T.; Ramos, O. H. P.; Carmona, A. K.; Bersanetti, P. A.; Selistre-de-araujo, H. S. The effect of Post-Translational Modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Comp. Biochem. Physiol.* **2004**, *138*, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.04.004>.
- (43) Laing, G. D.; Moura-Da-Silva, A. M.; Reid, A. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon* **2005**. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.013>.
- (44) Escalante, T.; Rucavado, A.; Fox, J. W.; María Gutiérrez, J. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics* **2011**. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.026>.
- (45) Serrano, S. M. T.; Maroun, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* **2005**, *45*, 1115–1132. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>.
- (46) Serrano, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* **2013**, *62*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>.
- (47) Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318* (2), 247–250. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1995.1227>.
- (48) Serrano, S. M. T.; Oliveira, A. K.; Menezes, M. C.; Zelanis, A. The proteinase-rich proteome of *Bothrops jararaca* venom. *J. Toxicol. Toxin. Rev* **2014**.

- <https://doi.org/10.3109/15569543.2014.922581>.
- (49) Teixeira, C. F. P.; Landucci, E. C. T.; Antunes, E.; Chacur, M.; Cury, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* **2003**, *42* (8), 947–962. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2003.11.006>.
- (50) Burke, J. E.; Dennis, E. A. Phospholipase A₂ biochemistry. *Cardiovasc. drugs Ther.* **2009**, *23* (1), 49–59. <https://doi.org/10.1007/S10557-008-6132-9>.
- (51) Valentin, E.; Lambeau, G. What can venom phospholipases A₂(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂(2)? *Biochimie* **2000**, *82* (9–10), 815–831. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01168-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01168-8).
- (52) Kini, R. M. Excitement Ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* **2003**, *42* (8), 827–840. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2003.11.002>.
- (53) Fernandes, C. A. H.; Borges, R. J.; Lomonte, B.; Fontes, M. R. M. A Structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. *BBA - Proteins Proteomics* **2014**, *1844*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.09.015>.
- (54) Ghazaryan, N. A.; Ghulikyan, L.; Kishmiryan, A.; Andreeva, T. V.; Utkin, Y. N.; Tsetlin, V. I.; Lomonte, B.; Ayvazyan, N. M. Phospholipases A₂ from Viperidae snakes: differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848* (2), 463–468. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2014.10.037>.
- (55) Doley, R.; Kini, R. M. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (17), 2851–2871. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>.
- (56) Guo, C.; Liu, S.; Yao, Y.; Zhang, Q.; Sun, M. Z. Past decade study of snake venom L-Amino acid oxidase. *Toxicon* **2012**, *60* (3), 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.001>.
- (57) Du, X. Y.; Clemetson, K. J. Snake venom L-Amino acid oxidases. *Toxicon* **2002**, *40* (6), 659–665. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00102-2).
- (58) Paloschi, V. M.; Pontes, S. A.; Soares, M. A.; Zuliani, P. J. No T; An update on potential molecular mechanisms underlying the actions of snake venom L-Amino acid oxidases (LAAOs) Tle. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25* (21), 2520–2530. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.2174/0929867324666171109114125>.
- (59) Ullah, A. Structure–function studies and mechanism of action of snake venom L-Amino acid oxidases. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 110.

- <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00110/BIBTEX>.
- (60) Tan, N.-H.; Fung, S.-Y. Snake venom L-Amino acid oxidases. In Mackessy P.S. (Ed) *Handbook of Venoms and toxin of Reptiles*; **2010**, pp 221-236.
- (61) Suzuki, N.; Yamazaki, Y.; Brown, R. L.; Fujimoto, Z.; Morita, T.; Mizuno, H. Structures of pseudochetoxin and pseudodecin, two snake-venom cysteine-rich secretory proteins that target cyclic nucleotide-gated ion channels: implications for movement of the c-terminal cysteine-rich domain. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2008**, *64* (Pt 10), 1034. <https://doi.org/10.1107/S09074444908023512>.
- (62) Wang, F.; Li, H.; Liu, M. na; Song, H.; Han, H. mei; Wang, Q. ling; Yin, C. chen; Zhou, Y. cong; Qi, Z.; Shu, Y. yan; et al. Structural and functional analysis of natrin, a venom protein that targets various ion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *351* (2), 443–448. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.10.067>.
- (63) Wang, Y. L.; Kuo, J. H.; Lee, S. C.; Liu, J. S.; Hsieh, Y. C.; Shih, Y. T.; Chen, C. J.; Chiu, J. J.; Wu, W. G. Cobra CRISP Functions as an inflammatory modulator via a novel zn²⁺- and heparan sulfate-dependent transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (48), 37872–37883. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.146290>.
- (64) Lu, Q.; Clemetson, J. M.; Clemetson, K. J. Snake venoms and hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3* (8), 1791–1799. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01358.x>.
- (65) Morita, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-Type Lectin-like Proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon* **2005**, *45*, 1099–1114. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.021>.
- (66) Arlinghaus, F. T.; Eble, J. A. C-Type Lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon* **2012**, *60* (4), 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.001>.
- (67) Du, X.-Y.; Clemetson, K. J. Reptile C-Type Lectins. In Mackessy P.S *Handbook of Venoms and toxin of Reptiles*; 2010; pp 359–375.
- (68) Boldrini-França, J.; Cologna, C. T.; Pucca, M. B.; Bordon, K. de C. F.; Amorim, F. G.; Anjolette, F. A. P.; Cordeiro, F. A.; Wiesel, G. A.; Cerni, F. A.; Pinheiro-Junior, E. L.; et al. Minor Snake venom proteins: structure, function and potential applications. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2017**, *1861* (4), 824–838. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.022>.
- (69) Aird, S. D. Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem.*

- Mol. Biol.* **2005**, *140* (1), 109–126. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2004.09.020>.
- (70) Aird, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* **2002**, *40* (4), 335–393. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00232-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00232-X).
- (71) Bordon, K. C. F.; Wiesel, G. A.; Amorim, F. G.; Arantes, E. C. Arthropod venom hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2015**, *21* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40409-015-0042-7>.
- (72) Duran-Reynals, F. A Spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action. *J. Exp. Med.* **1939**, *69* (1), 91–108. <https://doi.org/10.1084/JEM.69.1.69>.
- (73) Otrrock, Z. K.; Makarem, J. A.; Shamseddine, A. I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **2007**. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2006.12.003>.
- (74) Kostiza, T.; Meier, J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. *Toxicon* **1996**, *34* (7), 787–806. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00023-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00023-2).
- (75) Aloulou, A.; Ali, Y. Ben; Bezzine, S.; Gargouri, Y.; Gelb, M. H. Phospholipases: An overview. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *861*, 63–85. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_4.
- (76) Vaiyapuri, S.; Wagstaff, S. C.; Watson, K. A.; Harrison, R. A.; Jonathan, M.; Hutchinson, E. G. Purification and functional characterisation of rhiminopeptidase a , a novel aminopeptidase from the venom of *Bitis gabonica rhinoceros*. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4* (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000796>.
- (77) Warshawsky, H.; Haddad, A.; Gonçalves, R. P.; Valeri, V.; De lucca, F. L. Fine structure of the venom gland epithelium o f the south american rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by the secretory cells. *AM. J. ANAT* **1973**, *138*, 79–120.
- (78) Carneiro, S. M.; Pinto, V. R.; Jared, C.; Lula, L. A. B. M.; Faria, F. P.; Sesso, A. morphometric studies on venom secretory cells from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) before and after venom extraction. *Toxicon* **1991**, *29* (6), 569–580. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90051-R](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90051-R).
- (79) Schmidt, M.; Hemmi, R.; Perales, J.; Larucci, M.; Yamanouye, N. Activation of *Bothrops jararaca* snake venom gland and venom production: a proteomic approach. *J. Proteomics* **2013**, *94*, 460–472.

- <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.026>.
- (80) Portes-Junior, J. A.; Yamanouye, N.; Carneiro, S. M.; Knittel, P. S.; Santanna, S. S.; Nogueira, F. C. S.; Junqueira, M.; Magalhaes, G. S.; Domont, G. B.; Moura-Da-Silva, A. M. Unraveling the processing and activation of snake venom metalloproteinases. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (7), 3338–3348. <https://doi.org/10.1021/pr500185a>.
- (81) Junqueira-De-Azevedo, I. L. M.; Bastos, C. M. V.; Ho, P. L.; Luna, M. S.; Yamanouye, N.; Casewell, N. R. Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32* (3), 754–766. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu337>.
- (82) Augusto De-Oliveira, C.; Stuginski, D. R.; Kitano, E. S.; Andrade-Silva, D.; Liberato, T.; Fukushima, I.; Serrano, S. M. T.; Zelanis, A. dynamic rearrangement in snake venom gland proteome: insights into *Bothrops jararaca* intraspecific venom variation. *J. Proteome Res.*, **2016**. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00561>.
- (83) Robeva, A.; Politi, V.; Shannon, J.; Bjarnason, J.; Fox, J.; Synthetic. synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. *Biomed Biochim Acta* **1991**, *50*, 769–773.
- (84) Odell, G. V.; Ferry, P. C.; Vick, L. M.; Fenton, A. W.; Decker, L. S.; Cowell, R. L.; Ownby, C. L.; Gutierrez, J. M. Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon* **1998**, *36* (12), 1801–1806. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00084-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00084-1).
- (85) Tashima, A. K.; Zelanis, A.; Kitano, E. S.; Ianzer, D.; Melo, R. L.; Rioli, V.; Sant’anna, S. S.; Schenberg, A. C. G.; Camargo, A. C. M.; Serrano, S. M. T. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (11), 1245–1262. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.019331>.
- (86) Wong, E. S. W.; Belov, K. Venom evolution through gene duplications. *Gene* **2012**, *496* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.009>.
- (87) Casewell, N. R.; Jackson, T. N. W.; Laustsen, A. H.; Sunagar, K. Causes and consequences of snake venom variation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2020**, *41* (8), 570–581. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2020.05.006>.
- (88) Reeks, T. A.; Fry, B. G.; Alewood, P. F. Privileged frameworks from snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72* (10), 1939–1958. <https://doi.org/10.1007/S00018-015->

1844-Z/FIGURES/7.

- (89) Nakashima, K. I.; Ogawa, T.; Oda, N.; Hattori, M.; Sakaki, Y.; Kihara, H.; Ohno, M. Accelerated evolution of trimeresurus flavoviridis venom gland phospholipase A2 isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90* (13), 5964–5968. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.13.5964>.
- (90) Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Nakashima, K.; Nobuhisa, I.; Chijiwa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Niwa, M.; Yamashina, I.; Hattori, S.; et al. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Lett.* **1996**, *397* (1), 83–88. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(96\)01144-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01144-1).
- (91) Ohno, M.; Ménez, R.; Ogawa, T.; Danse, J. M.; Shimohigashi, Y.; Fromen, C.; Ducancel, F.; Zinn-Justin, S.; Le Du, M. H.; Boulain, J. C.; 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.* **1997**, *59* (C), 307–364. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)61036-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)61036-3).
- (92) Brust, A.; Sunagar, K.; Undheim, E. A. B.; Vetter, I.; Yang, D. C.; Casewell, N. R.; Jackson, T. N. W.; Koludarov, I.; Alewood, P. F.; Hodgson, W. C.; et al. Differential evolution and neofunctionalization of snake venom metalloprotease domains. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (3), 651–663. <https://doi.org/10.1074/MCP.M112.023135>.
- (93) Fry, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* **2005**, *15* (3), 403–420. <https://doi.org/10.1101/GR.3228405>.
- (94) Fry, B. G.; Wüster, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21* (5), 870–883. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSH091>.
- (95) Kini, R. M.; Chan, Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes. *J. Mol. Evol.* **1999**, *48* (2), 125–132. <https://doi.org/10.1007/PL00006450>.
- (96) Stanley, P.; Taniguchi, N.; Aebi, M. N-Glycans. *Essentials Glycobiol.* **2017**.
- (97) Casewell, N. R.; Wagstaff, S. C.; Wüster, W.; Cook, D. A. N.; Bolton, F. M. S.; King, S. I.; Pla, D.; Sanz, L.; Calvete, J. J.; Harrison, R. A. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (25), 9205–9210.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>.
- (98) Serrano, S. M. T.; Maroun, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* **2005**, *45* (8), 1115–1132. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>.
- (99) Spiro, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **2002**, *12* (4). <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43R>.
- (100) Caragea, C.; Sinapov, J.; Silvescu, A.; Dobbs, D.; Honavar, V. Glycosylation Site Prediction using ensembles of support vector machine classifiers. *BMC Bioinformatics* **2007**, *8* (1), 1–13..
- (101) Schjoldager, K. T. B. G.; Clausen, H. Site-Specific protein o-glycosylation modulates proprotein processing - deciphering specific functions of the large polypeptide galnac-transferase gene Family. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820* (12), 2079–2094.
- (102) Serrano, S. M. T.; Shannon, J. D.; Wang, D.; Camargo, A. C. M.; Fox, J. W. A Multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics* **2005**, *5* (2), 501–510. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400931>.
- (103) Tsai, I.-H.; Chang, H.-C.; Chen, J.-M.; Cheng, A.-C.; Khoo, K. H.; Tsai, -H. Glycan Structures and intragenetic variations of venom acidic phospholipases A 2 from tropidolaemus pitvipers. *FEBS J.* **2012**, *279*, 2672–2682. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08648.x>.
- (104) Tsai, I. H.; Wang, Y. M.; Huang, K. F. Effects of single N-Glycosylation site knockout on folding and defibrinogenating activities of acutobin recombinants from HEK293T. *Toxicon* **2015**, *94*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2014.12.008>.
- (105) Gavel, Y.; Heijne, G. Von. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser Acceptor Sites: Implications for protein engineering. *Protein Eng.* **1990**, *3* (5), 433–442. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/3.5.433>.
- (106) Wujek, P.; Kida, E.; Walus, M.; Wisniewski, K. E.; Golabek, A. A. N-Glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (13), 12827–12839. <https://doi.org/10.1074/JBC.M313173200>.
- (107) Roth, J.; Zuber, C.; Park, S.; Jang, I.; Lee, Y.; Kysela, K. G.; Le Fourn, V.;

- Santimaria, R.; Guhl, B.; Cho, J. W. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol. Cells* **2010**, *30* (6), 497–506. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0159-z>.
- (108) Van Den Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33* (3), 151–208. <https://doi.org/10.1080/10409239891204198>.
- (109) Aebi, M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833* (11), 2430–2437.
- (110) Wopereis, S.; Lefeber, D. J.; Morava, É.; Wevers, R. A. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A Review. *Clin. Chem.* **2006**, *52* (4), 574–600.
- (111) Vanderschaeghe, D.; Festjens, N.; Delanghe, J.; Callewaert, N. Glycome profiling using modern glycomics technology: technical aspects and applications. *Biol. Chem.* **2010**, *391* (2–3), 149–161. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.031>.
- (112) Hart, G. W.; Copeland, R. J. Glycomics hits the big time. *Cell* **2010**, *143* (5), 672. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.11.008>.
- (113) Tharmalingam, T.; Adamczyk, B.; Doherty, M. A.; Royle, L.; Rudd, P. M. Strategies for the profiling, characterisation and detailed structural analysis of N-linked oligosaccharides. *Glycoconj J* **2013**, *30*, 137–146. <https://doi.org/10.1007/s10719-012-9443-9>.
- (114) Geyer, A.; Fitzpatrick, T. B.; Pawelek, P. D.; Kitzing, K.; Vrieling, A.; Ghisla, S.; Macheroux, P. Structure and characterization of the glycan moiety of L-Amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268* (14), 4044–4053. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02321.x>.
- (115) Murayama, N.; Saguchi, K.; Mentele, R.; Assakura, M. T.; Ohi, H.; Fujita, Y.; Camargo, A. C. M.; Higuchi, S.; Serrano, S. M. T. The unusual high molecular mass of Bothrops Protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2003**, *1652* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.08.001>.
- (116) Gowda, D. C.; Davidson, E. A. Structural features of carbohydrate moieties in snake venom glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *182* (1), 294–301.
- (117) Nawarak, J.; Phutrakul, S.; Chen, S. T. Analysis of lectin-bound glycoproteins in snake venom from the Elapidae and Viperidae families. *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (3), 383–392. <https://doi.org/10.1021/pr034052+>.

- (118) Birrell, G. W.; Earl, S. T. H.; Wallis, T. P.; Masci, P. P.; de Jersey, J.; Gorman, J. J.; Lavin, M. F. The Diversity of bioactive proteins in australian snake venoms. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6* (6), 973–986. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600419-MCP200>.
- (119) Hayes, M.; Wellner, D. Microheterogeneity of L-Amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (24).
- (120) Serrano, S. M. T.; Hagiwara, Y.; Murayama, N.; Higuchi, S.; Mentele, R.; Sampaio, C. A. M.; Camargo, A. C. M.; Fink, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its CDNA. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251* (3), 845–853. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2510845.x>.
- (121) Mandal, S.; Bhattacharyya, D. Two L-Amino acid oxidase isoenzymes from Russell's Viper (*Daboia russelli russelli*) venom with different mechanisms of inhibition by substrate analogs. *FEBS J.* **2008**, *275* (9), 2078–2095. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06362.x>.
- (122) Thaysen-Andersen, M.; Larsen, M. R.; Packer, N. H.; Palmisano, G. Structural Analysis of glycoprotein sialylation-part I: Pre-LC-MS analytical strategies. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 22683–22705. <https://doi.org/10.1039/c3ra42960a>.
- (123) Schauer, R.; Kamerling, J. P. Exploration of the sialic acid world. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2018**, *75*, 1. <https://doi.org/10.1016/BS.ACCB.2018.09.001>.
- (124) Varki, A.; Schnaar, R. L.; Schauer, R. Sialic Acids and other nonulosonic acids. *Essentials Glycobiol.* **2017**.
- (125) Lis, H.; Sharon, N. Protein Glycosylation: structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218* (1), 1–27. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18347.x>.
- (126) Wuhrer, M.; Catalina, M. I.; Deelder, A. M.; Hokke, C. H. Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *849* (1–2), 115–128. 2
- (127) Schachter, H. Biosynthesis . 4b . Substrate level controls for N-Glycan assembly. In *Glycoproteins.*; **1995**; p . 281–286.
- (128) Schmauser, B.; Kilian, C.; Reutter, W.; Tauber, R. Sialoforms of Dipeptidylpeptidase IV from rat kidney and liver. *Glycobiology* **1999**, *9* (12), 1295–1305. <https://doi.org/10.1093/glycob/9.12.1295>.
- (129) Schauer, R. Sialic Acids as Regulators of Molecular and Cellular Interactions. *Curr.*

- Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.06.003>.
- (130) Schauer, R. Sialic Acids and Their Role as Biological Masks. *Trends Biochem. Sci.* **1985**, *10* (9), 357–360. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(85\)90112-4](https://doi.org/10.1016/0968-0004(85)90112-4).
- (131) Andrade-Silva, D.; Ashline, D.; Tran, T.; Lopes, A. S.; Cardoso, S. R. T.; Da Silva Reis, M.; Zelanis, A.; Serrano, S. M. T.; Reinhold, V. Structures of N-Glycans of *Bothrops* Venoms revealed as molecular signatures that contribute to venom phenotype in Viperid snakes. *Mol. Cell. Proteomics* **2018**, *17* (7), 1261–1284. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000748>.
- (132) Lin, C. W.; Chen, J. M.; Wang, Y. M.; Wu, S. W.; Tsai, I. H.; Khoo, K. H. Terminal disialylated multiantennary complex-type N-Glycans carried on acutobin define the glycosylation characteristics of the *Deinagkistrodon Acutus* venom. *Glycobiology* **2011**, *21* (4), 530–542. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq195>.
- (133) Chen, H. Sen; Chen, J. M.; Lin, C. W.; Khoo, K. H.; Tsai, I. H. New insights into the functions and N-Glycan structures of factor X activator from Russell's Viper venom. *FEBS J.* **2008**, *275* (15), 3944–3958. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06540.x>.
- (134) Menezes, M. C.; Furtado, M. F.; Travaglia-Cardoso, S. R.; Camargo, A. C. M.; Serrano, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* **2006**, *47* (3), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.007>.
- (135) Grazziotin, F. G.; Monzel, M.; Echeverrigaray, S.; Bonatto, S. L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the brazilian atlantic forest. *Mol. Ecol.* **2006**, *15* (13), 3969–3982. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2006.03057.X>.
- (136) Cavinato, R. A.; Remold, H.; Kipnis, T. L. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. *Toxicon* **1998**, *36* (2), 257–267. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00129-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00129-3).
- (137) Calvete, J. J.; Sanz, L.; Pérez, A.; Borges, A.; Vargas, A. M.; Lomonte, B.; Angulo, Y.; Gutiérrez, J. M.; Chalkidis, H. M.; Mourão, R. H. V.; et al. Snake Population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J. Proteomics* **2011**, *74* (4), 510–527. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003>.
- (138) Paes Leme, A. F.; Kitano, E. S.; Furtado, M. F.; Valente, R. H.; Camargo, A. C. M.;

- Ho, P. L.; Fox, J. W.; Serrano, S. M. T. Analysis of the subproteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. *Proteomics* **2009**, *9* (3), 733–745. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800484>.
- (139) Sousa, L. F.; Nicolau, C. A.; Peixoto, P. S.; Bernardoni, J. L.; Oliveira, S. S.; Portes-Junior, J. A.; Mourão, R. H. V.; Lima-dos-Santos, I.; Sano-Martins, I. S.; Chalkidis, H. M.; et al. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7* (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002442>.
- (140) Bradford, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (141) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- (142) Mortz, E.; Krogh, T. N.; Vorum, H.; Görg, A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **2001**, *1* (11), 1359–1363. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200111\)1:11<1359::aid-prot1359>3.3.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200111)1:11<1359::aid-prot1359>3.3.co;2-h).
- (143) Yamashita, K.; Hitoi, A. Structural determinants of *Phaseolus Vulgaris* Erythroagglutinating lectin for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14753–14755.
- (144) Kinter, M.; Sherman, N. E. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2000. <https://doi.org/10.1002/0471721980>.
- (145) Rappsilber, J.; Ishihama, Y.; Mann, M. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (3), 663–670. <https://doi.org/10.1021/ac026117i>.
- (146) Hanna, S. L.; Sherman, N. E.; Kinter, M. T.; Goldberg, J. B. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient : An Analysis by 2-D Gel Electrophoresis and Capillary Column Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. *Microbiology* **2000**, 2495–2508.
- (147) Team, R. C. R: A Language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria 2021.

- (148) Conway, J. R.; Lex, A.; Gehlenborg, N. Genome Analysis UpSetR : An R Package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* **2017**, *33* (June), 2938–2940. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx364>.
- (149) Oliveira, A. K.; Paes Leme, A. F.; Assakura, M. T.; Menezes, M. C.; Zelanis, A.; Tashima, A. K.; Lopes-Ferreira, M.; Lima, C.; Camargo, A. C. M.; Fox, J. W.; et al. Simplified procedures for the isolation of HF3, Bothropasin, Disintegrin-like/Cysteine-Rich protein and a novel P-I Metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* **2009**, *53* (7–8), 797–801. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.019>.
- (150) Theakston, R. D. G.; Reid, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. World Health Organ.* **1983**, *61* (6), 949–956.
- (151) Sakai, J.; Rojnuckarin, P.; Jangprasert, P.; Nakano, T. Structure of carbohydrate chain of a thrombin-like protease from the venom of *Agkistrodon Halys brevicaudus stejneger* snake. *J. Nagoya Gakuin Univ.* **2009**, *46*, 35–43.
- (152) Gowda, D. C.; Glushka, J.; Van Halbeek, H.; Thotakura, R. N.; Bredehorst, R.; Vogel, C. W. N-Linked oligosaccharides of cobra venom factor novel $\alpha(1-3)$ galactosylated LeX structures. *Glycobiology* **2001**, *11* (3), 195–208. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.3.195>.
- (153) Ogawa, Y.; Murayama, N.; Fujita, Y.; Yanoshita, R. Characterization and CDNA cloning of aminopeptidase A from the venom of *Gloydius blomhoffi brevicaudus*. *Toxicon* **2007**, *49*, 1172–1181. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.012>.
- (154) Gowda, D. C.; Jackson, C. M.; Hensley, P.; Davidsons, E. a. Factor X-activating glycoprotein of Russell ' s Viper venom. *Biochemistry* **1994**, *269* (14), 10644–10650.
- (155) Igarashi, T.; Araki, S.; Mori, H.; Takeda, S. Crystal structures of Catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/Adamalysin/Reprolysin family proteins. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (13), 2416–2422. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.057>.
- (156) Wang, W.; Cummings, R. D. The Immobilized leukoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked α -2 , 3 to penultimate galactose residues *. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (10), 4576–4585. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68821-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68821-0).

- (157) Geisler, C.; Jarvis, D. L. Letter to the Glyco-Forum: Effective Glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* **2011**, *21* (8), 988–993. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr080>.
- (158) Tanaka, N.; Nakada, H.; Itoh, N.; Mizuno, Y.; Takanish, M.; Kawasaki, T.; Tate, S. I.; Inagaki, F.; Yamashina, I. Novel structure of the N- Acetylgalactosamine containing n-glycosidic carbohydrate chain of batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biochem.* **1992**, *112* (1), 68–74. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123867>.
- (159) Pfeiffer, G.; Dabrowski, U.; Dabrowski, J.; Stirm, S.; Strube, K. -H; Geyer, R. Carbohydrate Structure of a thrombin-like serine protease from *Agkistrodon rhodostoma* structure elucidation of oligosaccharides by methylation analysis, liquid secondary-ion mass spectrometry and proton magnetic resonance. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205* (3), 961–978. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16863.x>.
- (160) Wang, Y. M.; Tsai, I. H.; Chen, J. M.; Cheng, A. C.; Khoo, K. H. Correlation between the glycan variations and defibrinogenating activities of acutobin and its recombinant glycoforms. *PLoS One* **2014**, *9* (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100354>.
- (161) Dall'Olio, F.; Malagolini, N.; Trinchera, M.; Chiricolo, M. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *Front. Biosci.* **2012**, *17* (2), 670–699. <https://doi.org/10.2741/3951>.
- (162) Varki, N. M.; Varki, A. Diversity in cell surface sialic acid presentations : implications for biology and disease. *Pathobiol. Focus* **2007**, *87* (September), 851–857. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700656>.
- (163) Pett, C.; Nasir, W.; Sihlbom, C.; Olsson, B. M.; Caixeta, V.; Schorlemer, M.; Zahedi, R. P.; Larson, G.; Nilsson, J.; Westerlind, U. Effective assignment of α 2,3/ α 2,6-sialic acid isomers by LC-MS/MS-based glycoproteomics. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (30), 9320–9324. <https://doi.org/10.1002/anie.201803540>.
- (164) Sasaki, G. L.; Elli, S.; Rudd, T. R.; Macchi, E.; Yates, E. A.; Naggi, A.; Shriver, Z.; Raman, R.; Sasisekharan, R.; Torri, G.; et al. Human (α 2→6) and avian (α 2→3) sialylated receptors of influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. *Biochemistry* **2013**, *52* (41), 7217–7230.
- (165) Costa, L. S.; Rodrigues, R. S.; Izidoro, L. F. M.; Menaldo, D. L.; Fuly, L.; Soares,

- S. G.; Homsibrandeburgo, M. I.; Barraviera, B.; Soares, A. M.; Selistre-de-arau, H. S.; et al. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* **2009**, *54*, 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.040>.
- (166) Parasuraman, P.; Murugan, V.; Selvin, J. F. A.; Gromiha, M. M.; Fukui, K.; Veluraja, K. Insights into the binding specificity of wild type and mutated wheat germ agglutinin towards Neu5Ac α (2-3) Gal: A Study by *in silico* mutations and molecular dynamics simulations. *J. Mol. Recognit.* **2014**, No. February, 482–492. <https://doi.org/10.1002/jmr.2369>.
- (167) Nagata, Y.; Burger, M. M. Wheat Germ Agglutinin. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249* (10), 3116–3122. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42646-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42646-X).
- (168) Iskratsch, T.; Braun, A.; Paschinger, K.; Wilson, I. B. H. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal. Biochem.* **2009**, *386* (2), 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.12.005>.
- (169) Sharon, N. L.; Halina. *LECTINS*, Second Edi.; 2007.
- (170) Shibuya, N.; Goldstein, I. J.; Broekaert, W. F.; Nsimba-lubaki, M.; Peeters, B. E. N.; Peumanst, W. J.; Galnac, N. G. Fractionation of sialylated oligosaccharides, glycopeptides, and glycoproteins on immobilized Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark lectin. *Archives of biochemistry and biophysics*. **1987**, *254* (1), 1–8.
- (171) Shibuyas, N.; Goldstein, I. J.; Broekaertg, W. F.; Nsimba-lubakiq, M.; Peetersll, B.; Peumansg, W. J. The Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark lectin recognizes the Neu5Ac(A2-6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1596–1601.
- (172) Damme, E. J. M. V. A. N.; Barre, A.; Rougel, P.; Leuven, F. V. A. N.; Peumans, W. J. The NeuAc(a-2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from Elderberry (*Sumbucus nigra*) Bark, a Type-2 Ribosome-Inactivating Protein with an unusual specificity and structure. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *137*, 128–137.
- (173) Cummings, R. D.; Schnaar, R. L. R-Type Lectins. *Essentials Glycobiol.* **2017**. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.031>.
- (174) Izidoro, L. F. M.; Ribeiro, M. C.; Souza, G. R. L.; Sant'Ana, C. D.; Hamaguchi, A.; Homsibrandeburgo, M. I.; Goulart, L. R.; Belebony, R. O.; Nomizo, A.; Sampaio, S. V.; et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14* (20), 7034–7043. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.025>.
- (175) Stábeli, R. G.; Marcussi, S.; Carlos, G. B.; Pietro, R. C. L. R.; Selistre-De-Araújo,

- H. S.; Giglio, J. R.; Oliveira, E. B.; Soares, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-Amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorganic Med. Chem.* **2004**, *12* (11), 2881–2886. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.049>.
- (176) Stábeli, R. G.; Sant’Ana, C. D.; Ribeiro, P. H.; Costa, T. R.; Ticli, F. K.; Pires, M. G.; Nomizo, A.; Albuquerque, S.; Malta-Neto, N. R.; Marins, M.; et al. Cytotoxic L-Amino Acid Oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41* (2), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006>.
- (177) Rodrigues, R. S.; da Silva, J. F.; Boldrini França, J.; Fonseca, F. P. P.; Otaviano, A. R.; Henrique Silva, F.; Hamaguchi, A.; Magro, A. J.; Braz, A. S. K.; dos Santos, J. I.; et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-Amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie* **2009**, *91* (4), 490–501. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.12.004>.
- (178) deKok, A.; Rawitch, A. B. Studies on L-Amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits. *Biochemistry* **1969**, *8* (4), 1405–1411. <https://doi.org/10.1021/bi00832a015>.
- (179) Ciscotto, P.; Machado De Avila, R. A.; Coelho, E. A. F.; Oliveira, J.; Diniz, C. G.; Farías, L. M.; De Carvalho, M. A. R.; Maria, W. S.; Sanchez, E. F.; Borges, A.; et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **2008**. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.004>.
- (180) Ande, R. S.; Kommoju, Rao Phaneeswara· Draxl, S.; Murkovic, M.; Macheroux, P.; Ghisla, S.; Ferrando-May, E. Mechanisms of cell death induction by L-Amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis* **2006**, *11*, 1439–1451. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-7959-9>.
- (181) Serrano, S. M. T.; Sampaio, C. A. M.; Mentele, R.; Camargo, A. C. M.; Fink, E.; Bioquímica, L. De; Butantan, I.; Paulo, S.; Bioquímica, D. De. A novel fibrinogen-clotting enzyme , TL-BJ , from the venom of the snake *Bothrops jararaca* : purification and characterization. *Thromb Haemost* **2000**, 438-444.
- (182) Paes Leme, A. F.; Prezoto, B. C.; Yamashiro, E. T.; Bertholim, L.; Tashima, A. K. Bothrops Protease A , a unique highly glycosylated serine proteinase , is a potent , specific fibrinogenolytic Agent. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, 1363–1372. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02995.x>.

- (183) Silva-junior, F. P.; Guedes, H. L. M.; Garvey, L. C.; Aguiar, A. S.; Bourguignon, S. C.; Di, E.; Giovanni-de-simone, S. BJ-48 , a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1 : Role of N -glycosylation in thermostability and active site accessibility. *Toxicon* **2007**, *50*, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.018>.
- (184) Yamashiro, E. T.; Oliveira, A. K.; Kitano, E. S.; Menezes, M. C.; Junqueira-De-Azevedo, I. L.; Paes Leme, A. F.; Serrano, S. M. T. Proteoforms of the platelet-aggregating enzyme PA-BJ, a serine proteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2014**, *1844* (12), 2068–2076. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.09.012>.
- (185) Sant' Ana, C. D.; Ticli, F. K.; Oliveira, L. L.; Giglio, J. R.; Rechia, C. G. V; Fuly, A. L.; Selistre, H. S.; Araújo, D.; Franco, J. J.; Stabeli, R. G.; et al. BjussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom . *Comparative Biochemistry and Physiology* **2008**, *151*, 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.036>.
- (186) Vivas-Ruiz ,D.; Sandoval, G.A.; Lazo, F.; Rodríguez, E.; Yarlequé, A.; Flores-Sánchez, E. Characterization of thrombin like enzyme from *Bothrops pictus* venom. **2015**, *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015 Oct;32(4):652-8. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2015.324.1754>.
- (187) Shibuya, N.; Tazaki, K.; Song, Z.; Tarr, G. E.; Goldstein, I. J.; Peumans, W. J. A Comparative study of bark lectins from three Elderberry. *Archives of biochemistry and biophys.* **1989**, *1103*, 1098–1103.
- (188) Van Damme, E. J. M.; Roy, S.; Barre, A.; Citores, L.; Mostafapous, K.; Rougé, P.; Van Leuven, F.; Girbés, T.; Goldstein, I. J.; Peumans, W. J. Elderberry (*Sambucus nigra*) Bark contains two structurally different Neu5Ac(Alpha2,6)Gal/GalNAc-binding Type 2 Ribosome-Inactivating proteins. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245* (3), 648–655. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1997.00648.X>.
- (189) Smith, D. F.; Song, X.; Cummings, R. D. *Use of Glycan Microarrays to Explore Specificity of Glycan-Binding Proteins.* In *Methods in Enzymology: Functional Glycomics*; Elsevier Inc., **2010**; Vol. 480, pp 417–444.
- (190) Wu, Z.; Liu, Y.; Li, L.; Wan, X.; Zhu, H.; Guo, Y.; Wei, M.; Guan, W.; Wang, P. G. Decoding glycan protein interactions by a new class of asymmetric N-glycans., *Org. Biomol. Chem.* **2017**. <https://doi.org/10.1039/C7OB02303K>.
- (191) Padler-Karavani, V.; Song, X.; Yu, H.; Hurtado-ziola, N.; Huang, S.; Muthana, S.;

- Chokhawala, H. A.; Cheng, J.; Verhagen, A.; Langereis, M. A.; et al. Cross-comparison of protein recognition of sialic acid diversity on two novel sialoglycan microarrays *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (27), 22593–22608. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359323>.
- (192) Song, X.; Yu, H.; Chen, X.; Lasanajak, Y.; Tappert, M. M.; Air, G. M.; Tiwari, V. K.; Cao, H.; Chokhawala, H. A.; Zheng, H.; et al. A sialylated glycan microarray reveals novel interactions of modified sialic acids with proteins and viruses *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (36), 31610–31622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274217>.
- (193) Cummings, R. D. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (10), 1087–1104. <https://doi.org/10.1039/b907931a>.
- (194) Nakano, M.; Hincapie, M.; Kolarich, D.; Lee, A.; Baker, M. S.; Hancock, W. S.; Packer, N. H. The lectin riddle : glycoproteins fractionated. *Omi. A J. Integr. Biol.* **2010**, *14* (4). <https://doi.org/10.1089/omi>.
- (195) Knibbs, R. N.; Goldstein, I. J.; Ratcliffell, R. M.; Shibuyall, N. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the Leukoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*: comparison with other sialic acid-specific lectins. *The journal of biological chemistry* **1991**, *266* (1), 83–88. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52405-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52405-4).
- (196) Imberty, A.; Gautier, C.; Chem, J. B.; Imberty, A.; Gautier, C.; Lescar, J.; Pe, S.; Wyns, L. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with an unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins. *The journal of biological chemistry*. **2000**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000560200>.
- (197) Brinkman-Van der Linden, Els C. M. Sonnenburg, J. L.; Varki, A. Effects of sialic acid substitutions on recognition by *Sambucus nigra* agglutinin. *Analytical Biochemistry* **2002**, *104*, 98–104. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5539>.
- (198) Unverzagt, C.; André, S.; Seifert, J.; Kojima, S.; Fink, C.; Srikrishna, G.; Freeze, H.; Kayser, K.; Gabius, H.-J. Structure-activity profiles of complex biantennary glycans with core fucosylation and with/without additional α 2,3/ α 2,6 sialylation: synthesis of neoglycoproteins and their properties in lectin assays, cell binding, and organ uptake. *J. Med. Chem* **2002**. <https://doi.org/10.1021/jm0110237>.
- (199) Steirer, L. M.; Park, E. I.; Townsend, R. R.; Baenzinger, J. U. The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid α 2,6-galactose. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (6), 3777–3783. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808689200>.

- (200) Narasimhan, S. Control of Glycoprotein Synthesis: UDP-GlcNAc:Glycopeptide B4-N-Acetylglucosaminyltransferase iii, an enzyme in hen oviduct which adds GlcNAc in D1-4 linkage to the d-linked mannose of the trimannosyl core of n-glycosyl oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257 (17), 10235–10242. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)34010-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34010-9).
- (201) Nakano, M.; Mishra, S. K.; Tokoro, Y.; Sato, K.; Nakajima, K.; Yamaguchi, Y.; Taniguchi, N.; Kizuka, Y. Bisecting GlcNAc is a general suppressor of terminal modification of N-glycan correspondence In Brief. *Mol. Cell. Proteomics* **2019**, 18. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001534>.
- (202) Harpaz, N.; Schachter, H. Control of glycoprotein synthesis: processing of Asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver Golgi A-D-mannosidases dependent on the prior action of Udp-n-acetylglucosamine:ci-d-mannoside P2-n-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255 (10), 4894–4902. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85580-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85580-1).
- (203) Chen, Q.; Tan, Z.; Guan, F.; Ren, Y. The essential functions and detection of bisecting glcnac in cell biology. *Front. Chem.* **2020**, 8 (July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00511>.
- (204) Ihara, Y.; Nishikawa, A.; Tohma, T.; Soejima, H.; Niikawa, N.; Taniguchi, N. CDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human n-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III). *J. Biochem.* **1993**, 113 (6), 692–698.
- (205) Cummings, R. D.; Kornfeld, S. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of Asparagine-linked Oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* Leukoagglutinating and Erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257 (19), 11230–11234.
- (206) Irimura, T.; Tsuji, T.; Tagami, S.; Yamamoto, K.; Osawa, T. Structure of a complex-type sugar chain of human glycophorin A. *Biochemistry* **1981**, 20 (3), 560–566. <https://doi.org/10.1021/bi00506a018>.
- (207) Nagae, M.; Soga, K.; Morita-Matsumoto, K.; Hanashima, S.; Ikeda, A.; Yamamoto, K.; Yamaguchi, Y. Phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) displays a novel glycan recognition mode using a common legume lectin fold. *Glycobiology* **2014**, 24 (4), 368–378. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu004>.
- (208) Pawlak, J.; Manjunatha Kini, R. Snake venom glutaminyl cyclase. *Toxicon* **2006**, 48 (3), 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.05.013>.
- (209) Hayashi, M. A. F.; Camargo, A. C. M. The bradykinin-potentiating peptides from

- venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* **2005**, *45* (8), 1163–1170. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2005.02.017>.
- (210) Gomis-Rüth, F. X.; Kress, L. F.; Kellermann, J.; Mayr, I.; Lee, X.; Huber, R.; Bode, W. Refined 2·0 Å X-Ray crystal structure of the snake venom Zinc-Endopeptidase Adamalysin II: primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. *J. Mol. Biol.* **1994**, *239* (4), 513–544. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1994.1392>.
- (211) Watanabe, L.; Shannon, J. D.; Valente, R. H.; Rucavado, A.; Alape-Giro'n, A.; Giro'n, G.; Kamiguti, A. S.; David, R.; Theakston, G.; Fox, J. W.; et al. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Sci.* **2003**, *12* (10), 2273–2281. <https://doi.org/10.1110/PS.03102403>.
- (212) Wermelinger, L. S.; Dutra, D. L. S.; Oliveira-Carvalho, A. L.; Soares, M. R.; Bloch, C.; Zingali, R. B. Fast Analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (12), 1703–1708. <https://doi.org/10.1002/RCM.1973>.
- (213) Melani, R. D.; Araujo, G. D. T.; Carvalho, P. C.; Goto, L.; Nogueira, F. C. S.; Junqueira, M.; Domont, G. B. Seeing beyond the tip of the iceberg: a deep analysis of the venome of the brazilian rattlesnake, *crotalus durissus terrificus*. *EuPA Open Proteomics* **2015**, *8* (June), 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2015.05.006>.
- (214) Andrade-Silva, D.; Zelanis, A.; Travaglia-Cardoso, S. R.; Nishiyama, M. Y.; Serrano, S. M. T. Venom profiling of the insular species *Bothrops alcatraz*: characterization of proteome, glycoproteome, and n-terminome using terminal amine isotopic labeling of substrates. *J. Proteome Res.* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00737>.
- (215) Isaji, T.; Kariya, Y.; Xu, Q.; Fukuda, T.; Taniguchi, N.; Gu, J. Functional roles of the bisecting GlcNAc in Integrin-Mediated Cell Adhesion. In *Methods in Enzymology*; Academic Press Inc., 2010; Vol. 480, pp 445–459. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)80019-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)80019-9).
- (216) Miwa, H. E.; Song, Y.; Alvarez, R.; Cummings, R. D.; Stanley, P. The bisecting GlcNAc in cell growth control and tumor progression. *Glycoconj. J.* **2012**, *29* (8–9), 609–618. <https://doi.org/10.1007/s10719-012-9373-6>.

- (217) Nagae, M.; Kanagawa, M.; Morita-Matsumoto, K.; Hanashima, S.; Kizuka, Y.; Taniguchi, N.; Yamaguchi, Y. Atomic visualization of a flipped-back conformation of bisected glycans bound to specific lectins. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep22973>.
- (218) Li, W.; Takahashi, M.; Shibukawa, Y.; Yokoe, S.; Gu, J.; Miyoshi, E.; Honke, K.; Ikeda, Y.; Taniguchi, N. Introduction of bisecting GlcNAc in N-Glycans of adenylyl cyclase III enhances its activity. *Glycobiology* **2007**, *17* (6), 655–662. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWM022>.
- (219) Nagae, M.; Yamanaka, K.; Hanashima, S.; Ikeda, A.; Morita-Matsumoto, K.; Satoh, T.; Matsumoto, N.; Yamamoto, K.; Yamaguchi, Y. Recognition of bisecting n-acetylglucosamine: structural basis for asymmetric interaction with the mouse lectin dendritic cell inhibitory receptor 2. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (47), 33598–33610. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513572>.
- (220) Patankar, M. S.; Ozgur, K.; Oehninger, S.; Dell, A.; Morris, H.; Seppala, M.; Clark, G. F. Expression of glycans linked to natural killer cell inhibition on the human Zona Pellucida. *Mol. Hum. Reprod.* **1997**, *3* (6), 501–505. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/3.6.501>.
- (221) Green, E. D.; Baenziger, J. U. Oligosaccharide specificities of *Phaseolus Vulgaris* Leukoagglutinating and Erythroagglutinating Phytohemagglutinins. interactions with N-Glycanase-released oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (25), 12018–12029.
- (222) Kini, R. M.; Koh, C. Y. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins* **2016**, *8* (10), 1–27. <https://doi.org/10.3390/toxins8100284>.
- (223) Hutton, R. A.; Warrell, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood Rev.* **1993**, 176–189.
- (224) Nahas, L.; Kamiguti, A. S.; Barros, M. A. Thrombin-like and Factor X-Activator Components of Bothrops Snake Venoms. *Thromb. Haemost.* **1979**, *41* (2), 314–328.
- (225) Ferreira, M. L.; Moura-Da-Silva, A. M.; França, F. O. S.; Cardoso, J. L.; Mota, I. toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon* **1992**, *30*, 1603–1608.
- (226) Goettig, P. Effects of glycosylation on the enzymatic activity and mechanisms of proteases. *Int. J. Mol. Sci* **2016**, 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms17121969>.
- (227) Stábeli, R. G.; Sant’ana, C. D.; Ribeiro, P. H.; Costa, T. R.; Ticli, F. K.; Pires, M.

- G.; Nomizo, A.; Albuquerque, S.; Malta-Neto, N. R.; Marins, M.; et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006>.
- (228) Stocker, K., Fischer H., M. J. Thrombin-like Snake Venom Proteinases. *Toxicon* **1982**, *20*, 265–273.
- (229) Lochnit, G.; Geyer, R. Carbohydrate structure analysis of Batroxobin, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228* (3), 805–816. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20326.x>.
- (230) Stocker, K., Barlow, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). *Methods Enzym.* **1976**, *45*, 214–223.
- (231) Nikai, T.; Ohara, A.; Komori, Y.; Fox, J. W.; Sugihara, H. Primary structure of a coagulant enzyme, Bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318* (1), 89–96. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1208>.
- (232) Sant, C. D.; Bernardes, C. P.; Fernando, L.; Izidoro, M.; Mazzi, V.; Soares, S. G.; Fuly, L.; Zingali, R. B.; Magro, A. J.; Braz, A. S. K.; et al. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* **2008**, *90*, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.10.005>.
- (233) Bajwa, S. S.; Markland, F. S.; Angeles, L. A New method for purification of the thrombin-like enzyme from the venom of the eastern diamondback rattlesnake. *Thromb. Res.* **1979**, *16* (3), 11–23.
- (234) Aguiar, A. S.; Aguiar, A. S.; Alves, C. R.; Melgarejo, A. R. Purification and partial characterization of a thrombin-like / Gyroxin enzyme from Bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) Venom. *Toxicon* **1996**, *34* (5), 555–565.
- (235) Valeriano-zapana, J. A.; Segovia-cruz, F. S.; Rojas-hualpa, J. M.; Martins-de-souza, D.; Ponce-soto, L. A.; Marangoni, S. Toxicon functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. *Toxicon* **2012**, *59* (2), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.018>.
- (236) Joseph, J. S.; Valiyaveettil, M.; Gowda, D. C.; Kini, R. M. Occurrence of O-linked Xyl-GlcNAc and Xyl-Glc disaccharides in Trocarin, a factor Xa homolog from snake venom. *J. Thromb. Haemost.* **2003**, *1* (3), 545–550. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00090.x>.

- (237) Komori, Y.; Nikai, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. *J. Toxicol.* **1998**, 3837 (April). <https://doi.org/10.3109/15569549809040394>.
- (238) Segers, K.; Rosing, J.; Nicolaes, G. A. F. Structural models of the snake venom Factor V activators from *Daboia russelli* and *Daboia lebetina*. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatic* **2006**, 984 (June), 968–984. <https://doi.org/10.1002/prot>.
- (239) Siigur, E.; Samel, M. Isolation, properties and N-terminal amino acid sequence of a Factor V activator from *Vipera lebetina* (Levantine Viper) snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, 1429, 239–248.
- (240) Nikai, T.; Taniguchi, K.; Komori, Y.; Masuda, K.; Fox, J. W.; Sugihara, H. Primary Structure and Functional Characterization of Bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom 1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, 378 (1), 6–15. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1795>.
- (241) Aaragon-Ortiz, F.; Gubensek, F. Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxinon*, **1987**, 25., 739-766.
- (242) Gowda, D. C.; Jackson, C. M.; Kurzban, G. P.; McPhie, P.; Davidson, E. A. Core sugar residues of the N-linked Oligosaccharides of Russell's Viper venom Factor X-activator maintain functionally active polypeptide structure. *Biochemistry* **1996**, 35 (18), 5833–5837. <https://doi.org/10.1021/bi953043e>.
- (243) Siigur, J.; Aaspollu, A.; Tonismägi, K.; Trummal, K.; Samel, M.; Vija, H.; Subbi, J.; Siigur, E. Proteases from *Vipera lebetina* venom affecting coagulation and fibrinolysis. *Haemostasis* **2002**, 31, 123–132.
- (244) Zhu, Z.; Liang, Z.; Zhang, T.; Zhu, Z.; Xu, W.; Teng, M.; Niu, L. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (11), 10524–10529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412900200>.
- (245) Mukherjee, A. K.; Mackessy, S. P. Biochemical and pharmacological properties of a new thrombin-like serine protease (Russelobin) from the venom of Russell's Viper (*Daboia russelii russelii*) and assessment of its therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta* **2013**, 1830 (6), 3476–3488. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.007>.
- (246) Kini, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake

- venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2005**, *34* (4–5), 200–204. <https://doi.org/10.1159/000092424>.
- (247) Zeng, F.; Shen, B.; Zhu, Z.; Zhang, P.; Ji, Y.; Niu, L.; Li, X.; Teng, M. Crystal structure and activating effect on RyRs of AhV-TL-I, a glycosylated thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* snake venom. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87* (3), 535–545. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0957-5>.
- (248) Hatton, B. M. W. C. Studie on the coagulant enzyme from *Agkistrodon Riodostoma* venom. *Biochem J.* **1973**, 799–807.
- (249) Garnier, G.; Davrinche, C.; Charlionet, R.; Fontaine, M. Molecular basis for the microheterogeneity of human Complement Factor B. *Complement* **1988**, *5* (2), 77–88. <https://doi.org/10.1159/000463038>.
- (250) Taverna, M.; Baillet, A.; Schlüter, M.; Baylocq-Ferrier, D. N-glycosylation site mapping of recombinant tissue plasminogen activator by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **1995**, *9* (2), 59–67. <https://doi.org/10.1002/bmc.1130090202>.
- (251) Tans, G.; Rosing, J. Snake venom activators of Factor X: An Overview. *Haemostasis*. 2001, pp 225–233. <https://doi.org/10.1159/000048067>.
- (252) Gutiérrez, J. M.; Escalante, T.; Rucavado, A.; Herrera, C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. *Toxins (Basel)*. **2016**, *8* (4). <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>.
- (253) Gutiérrez, M. J.; Rucavado, A.; Escalante, T.; Díaz, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* **2005**. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>.
- (254) Stack, M. S.; Pizzo, S. V.; Gonzalez-Gronow, M. Effect of desialylation on the biological properties of human plasminogen. *Biochem. J.* **1992**, *284* (1), 81–86. <https://doi.org/10.1042/bj2840081>.
- (255) Yang, L.; Manithody, C.; Rezaie, A. R. Functional role of O-linked and N-linked glycosylation sites present on the activation peptide of Factor X. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7* (10), 1696. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2009.03578.X>.
- (256) Sinha, U.; Wolf, D. L. Carbohydrate residues modulate the activation of coagulation factor X. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (5), 3048–3051. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53657-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53657-7).
- (257) Serrano, S. M. T.; Wang, D.; Shannon, J. D.; Pinto, A. F. M.; Polanowska-

- Grabowska, R. K.; Fox, J. W. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. *FEBS J.* **2007**, *274* (14), 3611–3621. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2007.05895.X>.
- (258) Nowak, A. A.; O'Brien, H. E. R.; Henne, P.; Doerr, A.; Vanhoorelbeke, K.; Laffan, M. A.; McKinnon, T. A. J. ADAMTS-13 Glycans and Conformation-Dependent Activity. *J. Thromb. Haemost.* **2017**, *15* (6), 1155–1166. <https://doi.org/10.1111/jth.13688>.
- (259) McGrath, R. T.; McKinnon, T. A. J.; Byrne, B.; O'Kennedy, R.; Terraube, V.; McRae, E.; Preston, R. J. S.; Laffan, M. A.; O'Donnell, J. S. Expression of Terminal A2-6-Linked Sialic Acid on von Willebrand Factor Specifically Enhances Proteolysis by ADAMTS13. *Blood* **2010**, *115* (13), 2666–2673. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241547>.
- (260) Jansen, A. J. G.; Josefsson, E. C.; Rumjantseva, V.; Liu, Q. P.; Falet, H.; Bergmeier, W.; Cifuni, S. M.; Sackstein, R.; Von Andrian, U. H.; Wagner, D. D.; et al. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIIb α metalloproteinase-mediated cleavage in mice. *Blood* **2012**, *119* (5), 1263–1273. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-355628>.
- (261) Mulvihill, E. E.; Drucker, D. J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of Dipeptidyl Peptidase-4 inhibitors. *Endocr. Rev.* **2014**, *35* (6), 992–1019. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1035>.
- (262) Cuchacovich, M.; Gatica, H.; Pizzo, S. V.; Gonzalez-Gronow, M. Characterization of human serum dipeptidyl peptidase IV (CD26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2001**, *19* (6), 673–680.
- (263) Sato, B.; Katagiri, Y. U.; Iijima, K.; Yamada, H.; Ito, S.; Kawasaki, N.; Okita, H.; Fujimoto, J.; Kiyokawa, N. The human CD10 lacking an N-glycan at asn628 is deficient in surface expression and neutral endopeptidase activity. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2012**, *1820* (11), 1715–1723. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.017>.
- (264) Broccolini, A.; Gidaro, T.; De Cristofaro, R.; Morosetti, R.; Gliubizzi, C.; Ricci, E.; Tonali, P. A.; Mirabella, M. Hyposialylation of neprilysin possibly affects its expression and enzymatic activity in hereditary inclusion-body myopathy muscle. *J.*

- Neurochem.* **2008**, *105* (3), 971–981. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05208.x>.
- (265) Ueda, T.; Tomita, K.; Notsu, Y.; Ito, T.; Fumoto, M.; Takakura, T.; Nagatome, H.; Takimoto, A.; Mihara, S. I.; Togame, H.; et al. Chemoenzymatic synthesis of glycosylated glucagon-like peptide 1: effect of glycosylation on proteolytic resistance and in vivo blood glucose-lowering activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (17), 6237–6245. <https://doi.org/10.1021/ja900261g>.
- (266) Remacle, A. G.; Chekanov, A. V.; Golubkov, V. S.; Savinov, A. Y.; Rozanov, D. V.; Strongin, A. Y. O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP). *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (25), 16897–16905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600295200>.
- (267) Kurisaka, C.; Oku, T.; Itoh, S.; Tsuji, T. Role of sialic acid-containing glycans of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in the interaction between MMP-9 and staphylococcal superantigen-like protein 5. *Microbiol. Immunol.* **2018**, *62* (3), 168–175. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12573>.

8. ANEXO

FIGURAS SUPLEMENTARES

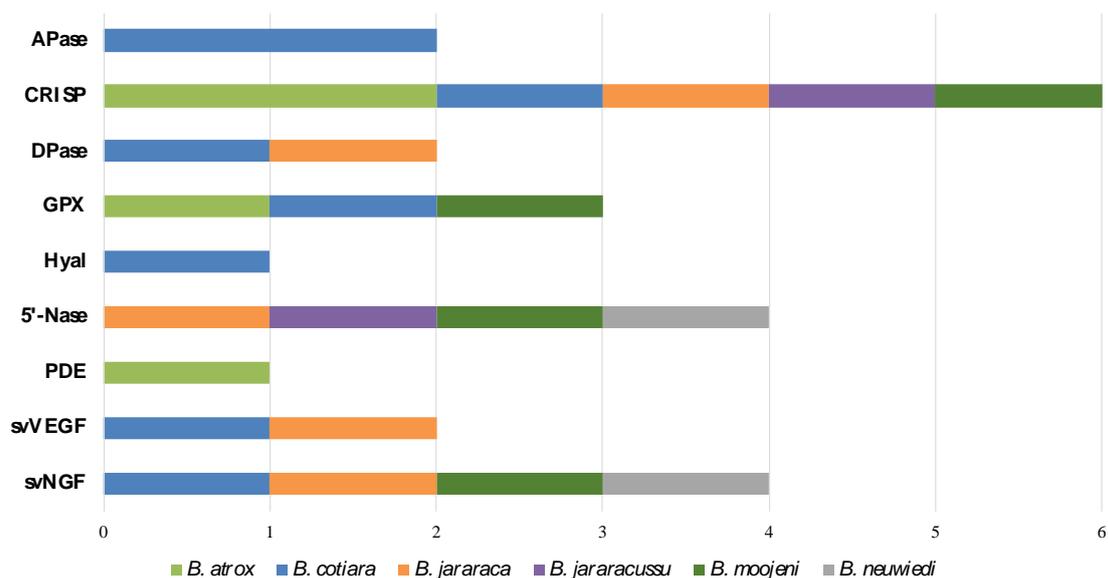


Figura Suplementar 1. Representação gráfica do número de grupos de proteínas menos abundantes nos venenos (Outros; OT), identificados nas frações retidas das cromatografias de afinidade de SNA-agarose com venenos do gênero *Bothrops*. Os valores no eixo X indicam o número de grupos de proteínas identificados e as cores nas barras indicam em quais venenos essas proteínas foram enriquecidas pela lectina SNA.

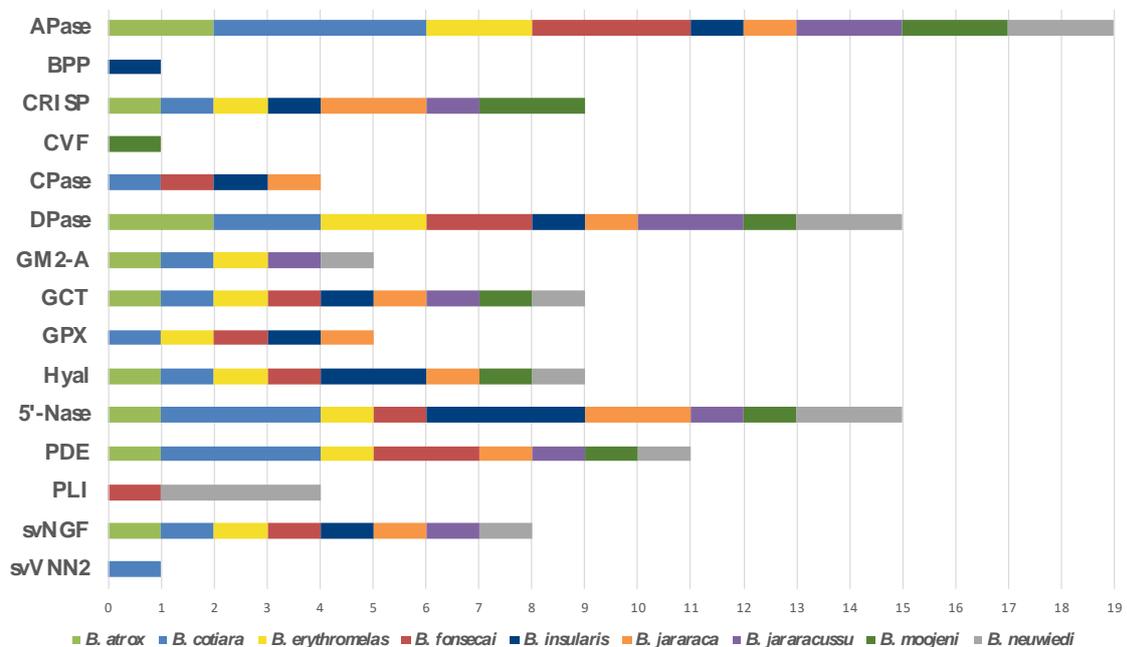


Figura Suplementar 2. Representação gráfica do número de grupos de proteínas menos abundantes nos venenos (Outros; OT), identificados nas frações retidas das cromatografias de afinidade de PHA-E-agarose com venenos do gênero *Bothrops*. Os valores no eixo X indicam o número de grupos de proteínas identificados e as cores nas barras indicam em venenos essas proteínas foram enriquecidas pela lectina PHA-E.

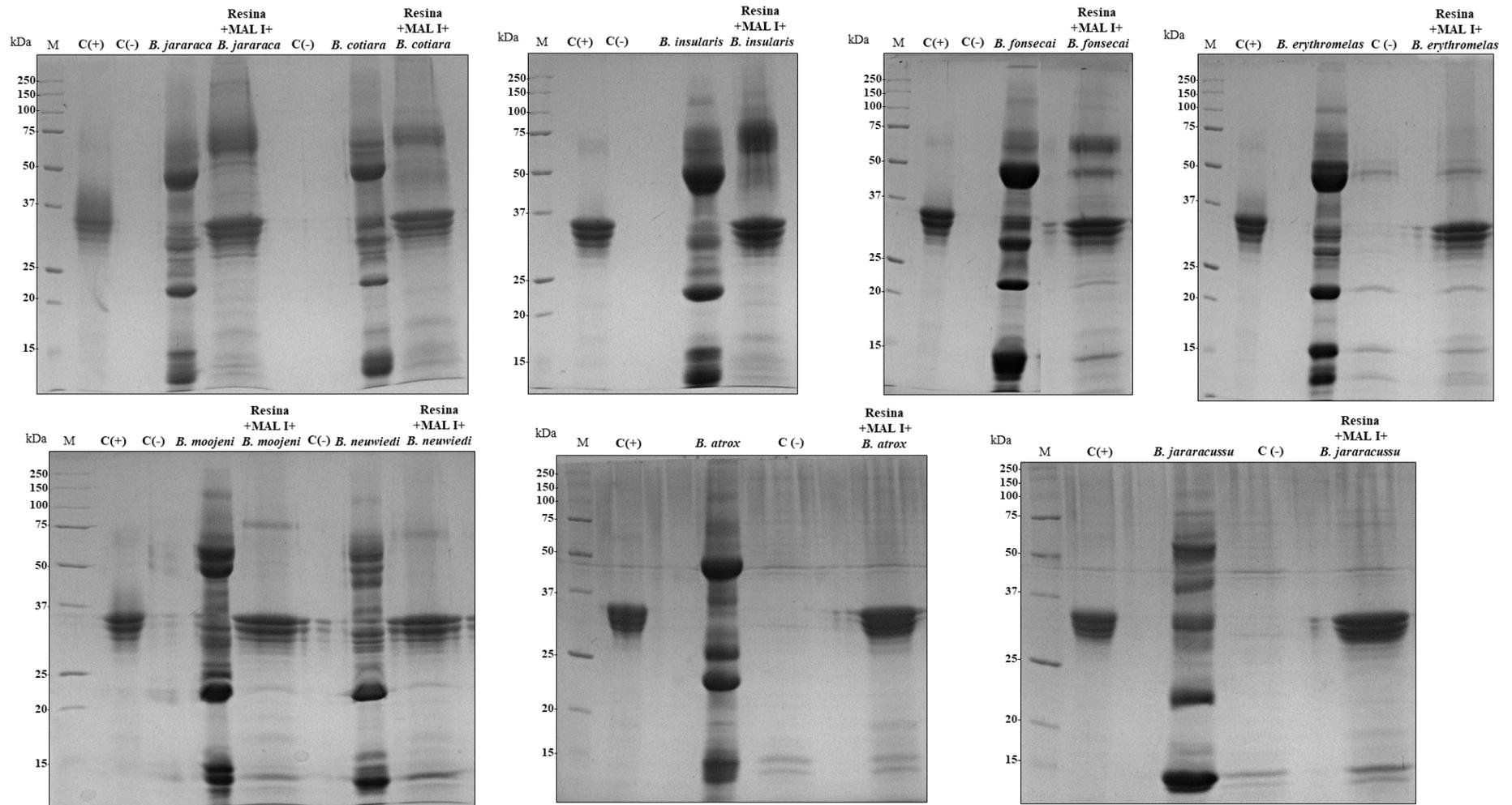


Figura Suplementar 3. Perfis eletroforéticos em gel de SDS-poliacrilamida (12%) das amostras obtidas do experimento de *pull down* utilizando a lectina MAL I e venenos do gênero *Bothrops*. No gel foram aplicados 20 μ L de cada resina de estreptavidina-Sepharose e 20 μ g de cada veneno. (C-) Controle negativo: incubação dos venenos com a resina. (C+) Controle positivo: incubação da MAL I com a resina. M: padrões de massa molecular. Proteínas coradas com Comassie Blue G.

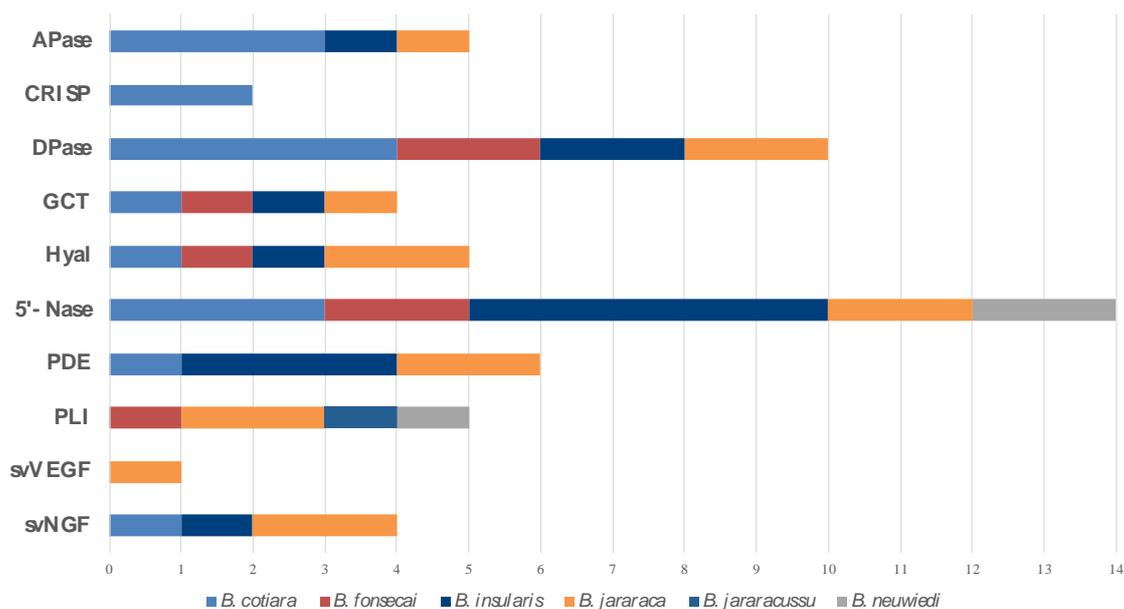


Figura Suplementar 4. Representação gráfica dos grupos de proteínas menos abundantes nos venenos (OT; Outros) identificadas nas frações retidas no ensaio de *pull down* realizado com a lectina MAL I e venenos do gênero *Bothrops*. Os valores no eixo X indicam o número de grupos de proteínas identificados e as cores nas barras indicam em quais venenos essas proteínas foram enriquecidas pela lectina MAL I.

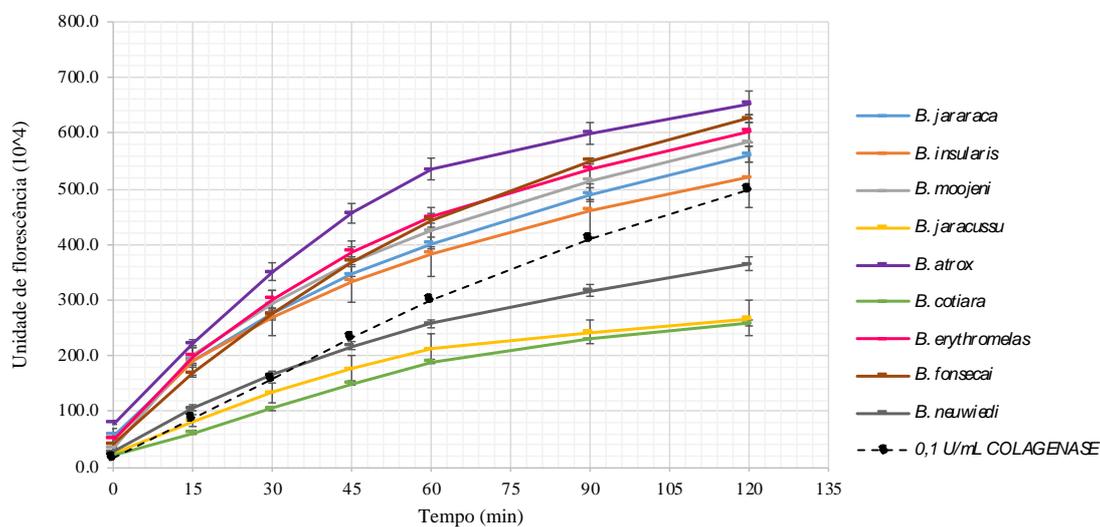
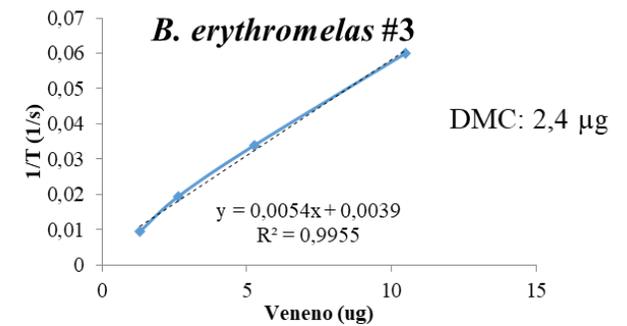
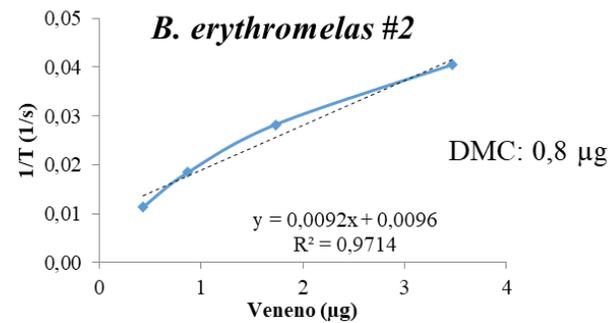
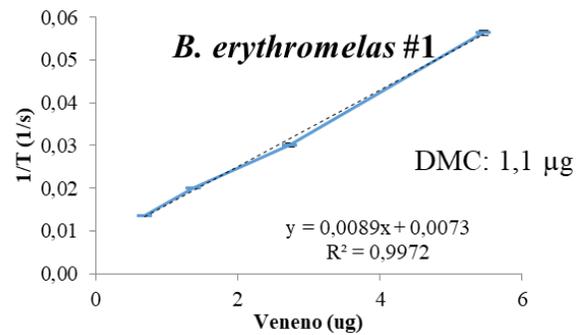
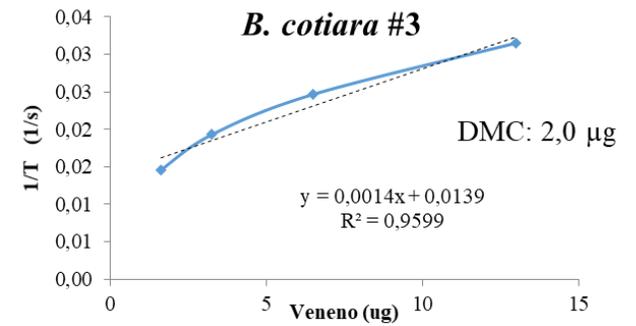
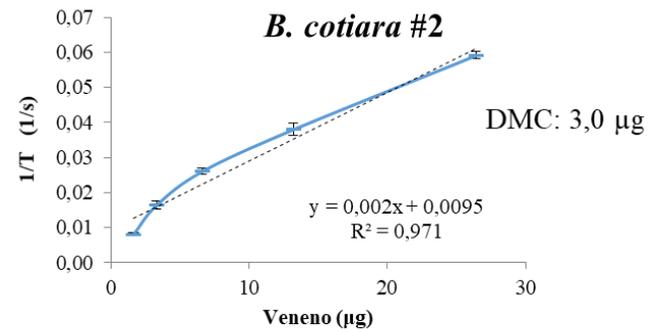
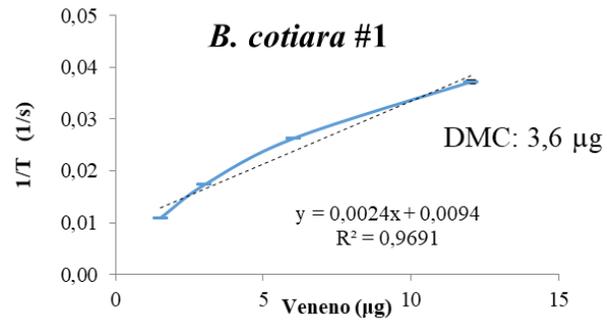
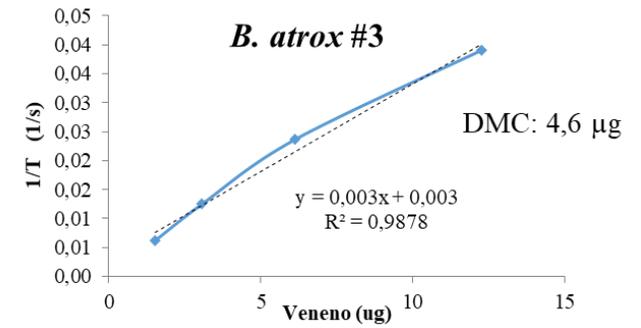
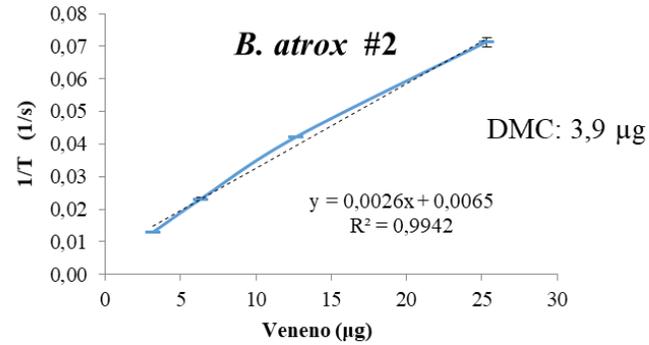
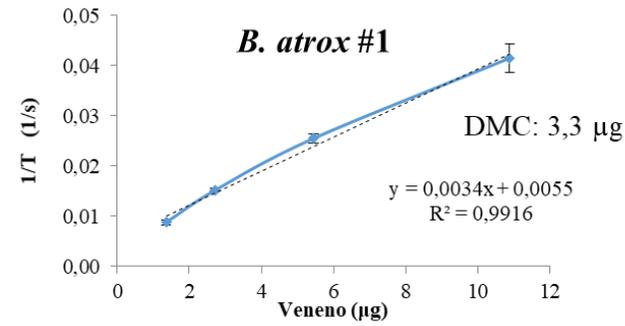
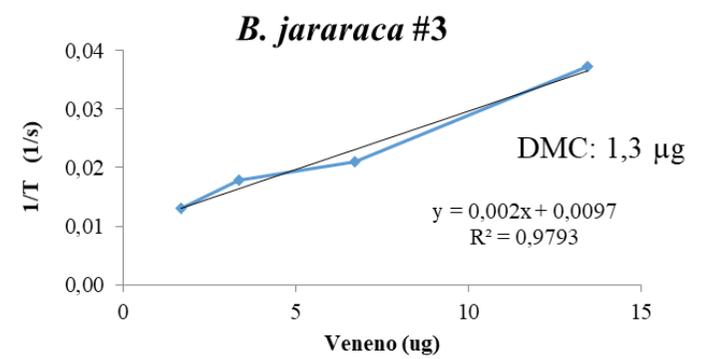
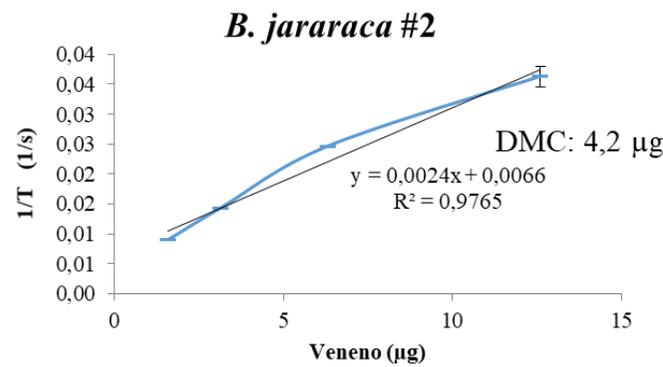
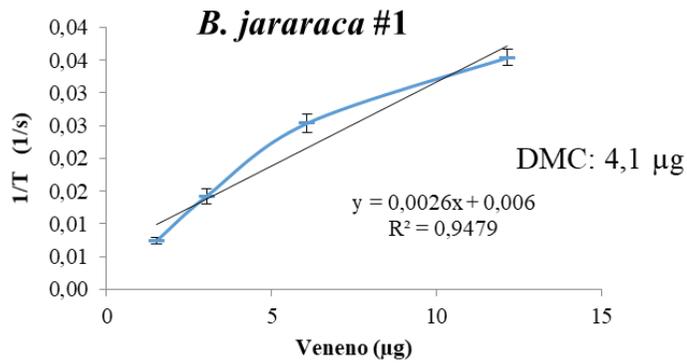
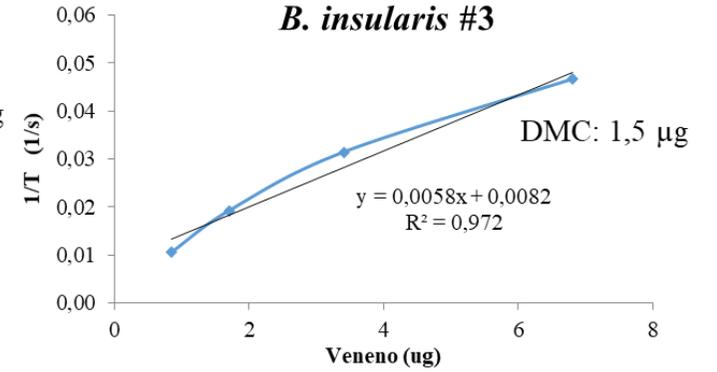
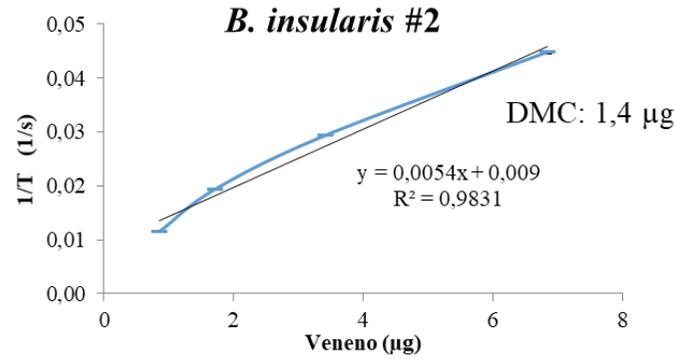
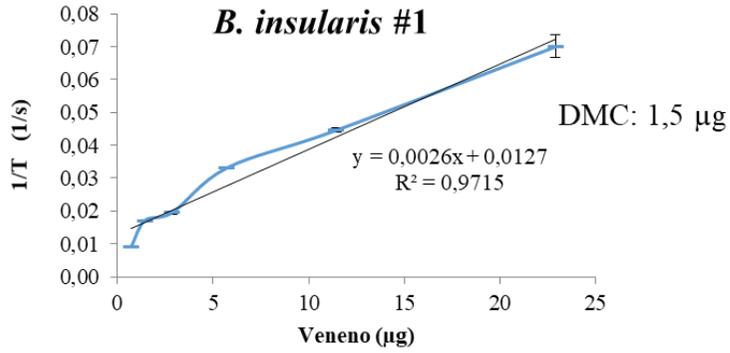
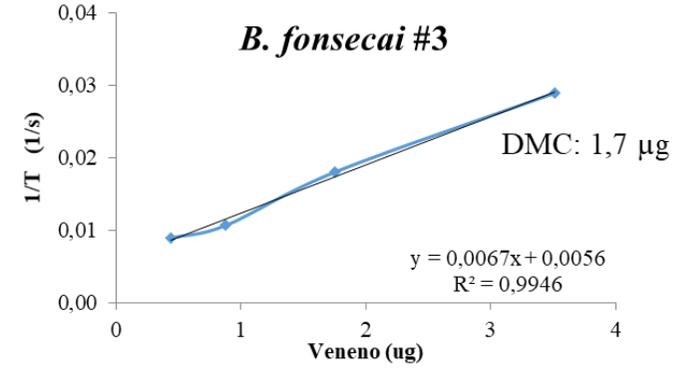
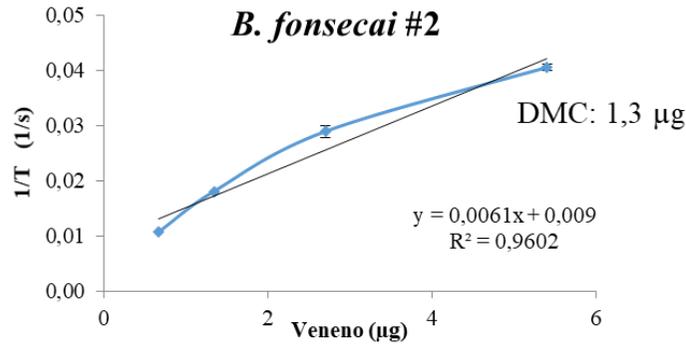
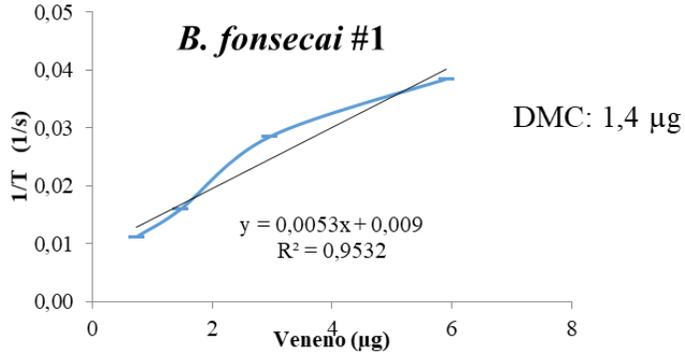


Figura Suplementar 5. Atividade gelatinolítica de venenos do gênero *Bothrops*. Amostras de venenos (1 μ g) foram incubadas com gelatina conjugada com fluoresceína (5 μ g) a 37 °C por 120 min. Fluorescência monitorada em Ex=480 nm e Em=530 nm. Os resultados estão apresentados como média \pm DP, n=3.





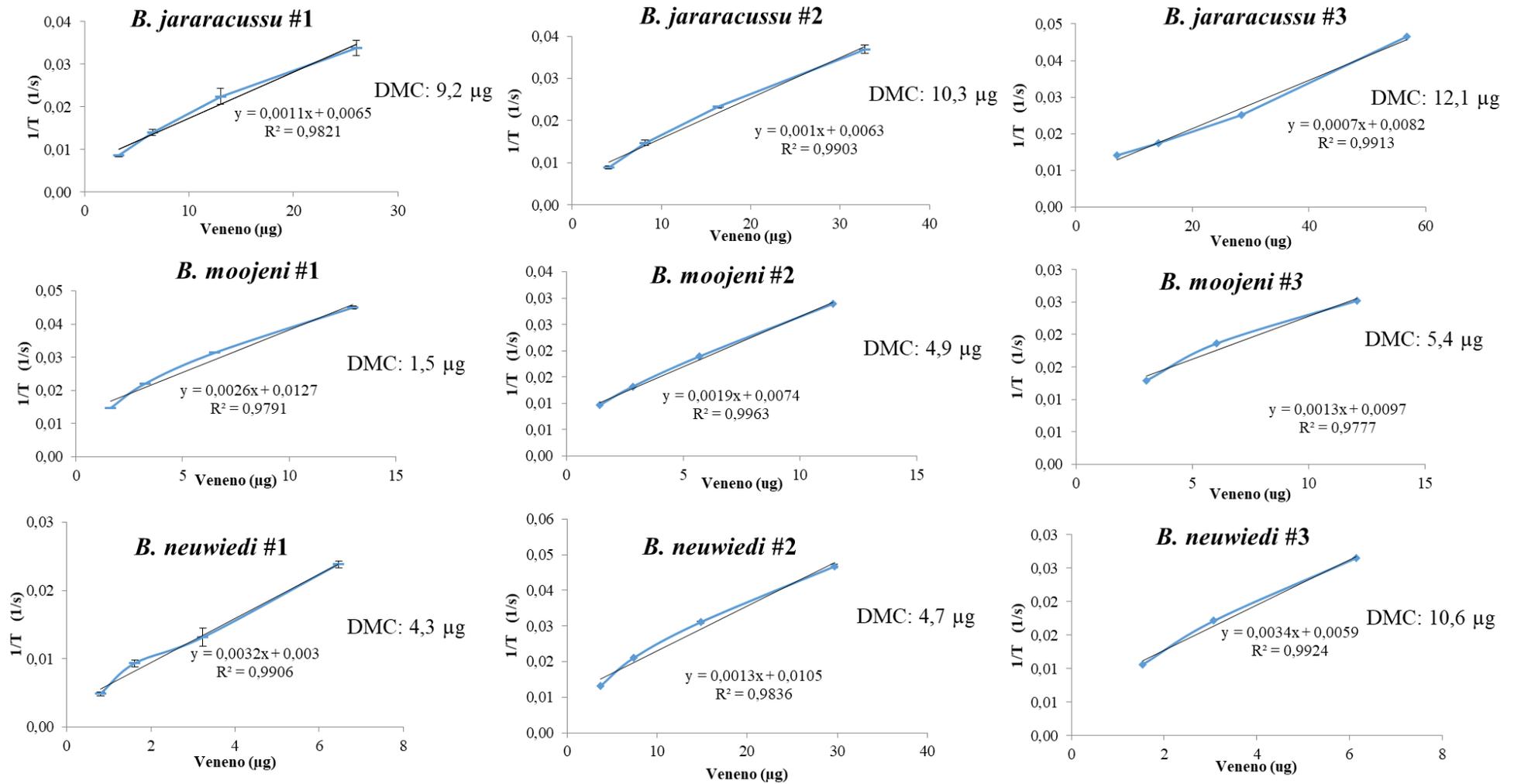


Figura Suplementar 6. Curvas de atividade coagulante de venenos do gênero *Bothrops* no plasma humano indicando os valores de Dose Mínima Coagulante (DMC). Resultados de três experimentos independentes

TABELAS SUPLEMENTARES (ARQUIVO ANEXO)

Tabela Suplementar 1 Número de proteínas totais e grupos de proteínas identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS nas frações retidas das comatografias de afinidade da lectina SNA e os venenos do gênero *Bothrops*.

Tabela Suplementar 1A-G. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS da fração do veneno de *Bothrops* retida na resina de SNA-agarose.

Tabela Suplementar 2. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS da fração do veneno de *Bothrops* retida na resina de SNA-agarose.

Tabela Suplementar 3. Número de proteínas totais e grupos de proteínas identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS nas frações retidas das comatografias de afinidade da lectina PHA-E e os venenos do gênero *Bothrops*.

Tabela Suplementar 3A-G. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS da fração do veneno de *Bothrops* retida na resina de PHA-E-agarose.

Tabela Suplementar 4. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS da fração do veneno de *Bothrops* retida na resina de PHA-E-agarose

Tabela Suplementar 5. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS de bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. jararaca* obtida no ensaio de pull down com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 5A-M. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-12 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. jararaca* obtida no ensaio de pull down com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 6. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS de bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. cotiara* obtida no ensaio de pull down com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 6A-M. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-13 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. cotiara* obtida no ensaio de pull down com a lectina MAL I

Tabela Suplementar 7. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS de bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. insularis* obtida no ensaio de pull down com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 7A-M. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-13 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. insularis* obtida no ensaio de pull down com a lectina MAL I

Tabela Suplementar 8. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS de bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. fonsecai* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 8A-I. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-9 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. fonsecai* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I

Tabela Suplementar 9. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. moojeni* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 9A-F. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-6 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. moojeni* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 10. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS de bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. neuwiedi* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 10A-F. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-6 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. neuwiedi* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 11. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS de bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. atrox* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 11A-C. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-3 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. atrox* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 12. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS de bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. erythromelas* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 12A-C. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-3 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. erythromelas* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 13. Proteínas identificadas por digestão com tripsina e LC-MS/MS de bandas de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. jararacussu* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 13A-D. Peptídeos identificados por digestão com tripsina e LC-MS/MS das bandas #1-4 de gel de SDS-poliacrilamida da fração do veneno de *B. jararacussu* obtida no ensaio de *pull down* com a lectina MAL I.

Tabela Suplementar 14. Listas de proteínas totais e de grupos de proteínas identificados nas bandas de proteínas de venenos do gênero *Bothrops* enriquecidas pela lectina MAL I, após a remoção de redundâncias.

Tabela Suplementar 15A-C. Proteínas totais de venenos de *Bothrops* identificadas nas frações enriquecidas pela lectina SNA, PHA-E e MAL I por digestão com tripsina e LC-MS/MS.

Tabela Suplementar 16A. Proteínas do plasma humano identificadas por LC-MS/MS a partir dos peptídeos gerados pela incubação do plasma com o veneno de *B. jararaca* não tratado com neuraminidase, considerando as três incubações independentes (JAC1, JAC2, JAC3).

Tabela Suplementar 16B. Peptídeos identificados por LC-MS/MS, gerados pela incubação do plasma humano com o veneno de *B. jararaca* não tratado com neuraminidase, considerando as três incubações independentes (JAC1, JAC2, JAC3).

Tabela Suplementar 16C. Proteínas do plasma humano identificadas por LC-MS/MS a partir dos peptídeos gerados pela incubação do plasma com o veneno de *B. jararaca* tratado com neuraminidase, considerando as três incubações independentes (JAT1, JAT2, JAT3).

Tabela Suplementar 16D. Peptídeos identificados por LC-MS/MS, gerados pela incubação do plasma humano com o veneno de *B. jararaca* tratado com neuraminidase, considerando as três incubações independentes (JAT1, JAT2, JAT3).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Carolina Brás Costa
Nascimento: 27/04/1990
Cidade: Piumhi /MG -Brasil
E-mail: carolina.bras.costa@gmail.com

EDUCAÇÃO

Doutorado Direto: Bioquímica (2017-presente)
 Universidade de São Paulo- USP
 Instituto Butantan
Orientador: Solange Maria de Toledo Serrano

- Mestrado (Interrompido): Bioquímica (2015-2016)
 Universidade de São Paulo- USP
 Instituto Butantan
Orientador: Solange Maria de Toledo Serrano
- Graduação: Bacharel em Bioquímica (2014)
 Universidade Federal de Viçosa-UFV
Título: Avaliação do potencial de produção de enzimas glicohidrolíticas pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MIBA-0016
Orientador: José Geraldo da Cruz Pradella (CTBE)
- Ensino médio: Sistema Anglo de Ensino (2007)
 Piumhi-MG

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

- **West Pomeranian University of Technology (ZUT)- Szczecin- Polônia**
Ocupação: Estagiária bolsista- TRAINEE-IAESTE
Resumo das atividades: Métodos de preparação de amostras; técnicas de separação de proteínas e análises de espectrômetro de massa (MALDI-TOF). Técnica histoquímica básica e identificação da estrutura histológica.
- **Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE- CNPEM)**
Ocupação: Estagiário Bolsista (2013- 2014)
Resumo das atividades: Otimização de meio de cultura e melhoria da cinética enzimática para a produção de bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar.
- **Universidade Federal de Viçosa e SESu/MEC - PET (Programa de Educação Tutorial)**
Ocupação: Bolsista do grupo PET-Bioquímica (2011 – 2013)
Resumo das atividades: Desenvolvimento de projetos que integram ensino, pesquisa e extensão na área de bioquímica, tutorado pelo Professor Doutor João Paulo Viana Leite.

➤ **Universidade Federal de Viçosa – Empresa Junior de Bioquímica-TECNOMOL)**

Ocupação: Bolsista do PET pelo SESu/MEC (2012 – 2013).

Resumo das atividades Realização de atividades como treinamento e desenvolvimento de membros, práticas motivacionais e auto-motivação; recrutamento e demissão de membros.

ATIVIDADES CIENTÍFICAS

➤ **Resumo expandido publicado em congressos e apresentação oral**

AUTORIA

1. **COSTA, C. B.**, ANDRADE-SILVA D, CARVALHO C D, SERRANO S M T. “Glycoproteomic complexity of *Bothrops* snake venoms and sialic acid contribution in toxin function”. *Toxicon* 168 (2019) S1-S42 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010119302387>)
2. **COSTA, C. B.**; COSTA, C. B, ANDRADE-SILVA D, KITANO E S, MENEZES M C, SERRANO S M T. Glycoproteome profiling of *Bothrops* venoms by selective enrichment using lectin-affinity chromatography and mass spectrometric identification. In: Sao Paulo School of Advanced Science (SPSAS-MS), Campinas – Brazil, 2017
3. **COSTA, C. B.**; BARRETO, L. P. ; SILVA, A. S. ; FONTES, P P. ; COSTA, P. A. ; ALMEIDA, A. A. MONTEIRO, L. M. O. ; MEIRELES, L MELO, B. P. ; DIAS, B. K. M. ; KONIG, I. F. M. ; HENRIQUES, L. R. ; SANTOS, R. C. V. ; PIRES, C. S. ; ALVES, M. L. P. ; PEREIRA, B. D. ; MEDEIROS, L. R. ; LEITE, J. P. V. “Biochemistry in Daily Life: How to bring the science of biochemistry lay public through radio and television”. In: XVII National Meeting of PET Groups, 2012, São Luis MA-Brazil- XVII National Meeting Groups Tutorial Education Program, 2012.

➤ **Resumos publicados em congressos**

AUTORIA

1. **COSTA, C. B.**, ANDRADE-SILVA D, CARVALHO C D, SERRANO S M T. “*Bothrops* snake venoms: glycoproteomic analysis and the role of sialic acid in toxin function.” In: 67th ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Atlanta, USA, 2019
2. **COSTA, C. B.**, ANDRADE-SILVA D, CARVALHO C D, MENEZES M C, SERRANO S M T. “*Bothrops* snake venoms: impact of glycosylation on proteome complexity and toxin function.” In: 2018 EuPA School on Practical Proteomics, Vienna, Austria, 2018
3. **COSTA, C.B.**, COSTA, P. S. ; DELABONA, P. S. ; LIMA, D. J. S. ; CRUZ G. “Glicohidrolases production potential (Ghs) by the new fungus *Lasiodiplodia theobromae* MIBA-0016 in submerged fermentation.” In: Anais do XI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, ENZITEC, 2014
4. **COSTA, C. B.** VIEIRA, B.C., MILK, LEITE J. P. V “Phytochemical analyzes and proximate composition of *Psychotria vellosiana* as ethological strategy for bioprospecting pharmaceutical”, In: Simpósio de Iniciação Científica da UFV, Viçosa. CD de Resumos, 2010.

CO- AUTORIA

5. COSTA, P. S. ; DELABONA, P. S. ; **COSTA, C. B.** ; ROLBL, D. ; COSTA, A. C. ; PRADELLA, J. G. C. . “Evolution of *T. harzianum* wild strains by UV irradiation followed by selection by fermentation of microorganism promising mutants for the production of glicohidrolases.” In: Anais do XI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, ENZITEC, 2014.
6. KATAYAMA, K.; TAVARES, A. G.; **COSTA, C. B.**; GONÇALVES, V. M.; PRADELLA, J. G. C.; FREITAS, S.; "Production of recombinant accessory enzymes for enzymatic cocktail supplementation *L. theobromae* for use in the hydrolysis of bagasse ", p. 1327-1335 . In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014
7. MENDENSKA W; PIETRZAK S., **COSTA C. B.**; GALEA R.; GIRELL C. “Analiza histologiczna struktury nerek emu zwyczajnego (*Dromaius novaelloandiae*)”. In: VI Conferência de Apresentações Acadêmica de Estudantes Universitários, ZUT. Szczecin, Polônia, 2014
8. **COSTA, C. B.**, ELISEI, J. L. F., LEITE, J. P. V., SILVA, A. S., ALMEIDA, A. A., BARRETO, L. P., COSTA, M. P., FONTES, P. P., SANTOS, R. C. V., DIAS, B. K. M. “Democratization and popularization of scientific knowledge on the biodiversity of rural territory Serra do Brigadeiro under the program BIOPEBS.” In: Anais do Simpósio de Integração Acadêmica-SIA, UFV. , 2012
9. ALMEIDA, A. A., BARRETO, L. P., **COSTA, C. B.**, COSTA, M. P., COSTA, P. A., FERREIRA, I. S., FONTES, P. P., FREITAS, P. H. M., MEIRELES, L. M., MONTEIRO, L. M. O., SILVA, A. S., TAVARES, B. S., LEITE, J. P. V., SIQUEIRA, R. P. “Development, production and dissemination Newsletter BioPEBS in the region of Serra do Brigadeiro - Minas Gerais”. In: Anais do XVI Encontro Nacional dos Grupos do Programa de Educação Tutorial, ENAPET, Goiânia. 2011

ATIVIDADES EM CURSOS E PROJETO DE EXTENSÃO

Título: Espaço Ciência UFV - Bioquímica No Cotidiano

Descrição: Produção de material audiovisual para a popularização da ciência. O material abordou temas cotidianos envolvendo bioquímica, produzindo conteúdos na forma de spots para o rádio (totalizando 77,5 minutos) e para a televisão (totalizando 32,5 minutos), veiculados na Rádio FM Universitária e TV Viçosa. O projeto foi desenvolvido pelo Núcleo de Divulgação Científica da UFV em parceria com o PET-Bioquímica.

Título: Democratização e popularização do conhecimento científico sobre a biodiversidade do território rural Serra do Brigadeiro no âmbito do Programa BioPEBS.

Descrição: Projeto de produção do periódico bimensal Boletim BioPEBS, com o objetivo de popularizar e democratizar o conhecimento científico no território rural Serra do Brigadeiro, produzindo instrumento para as práticas de ensino de ciência nas escolas rurais, especialmente nas áreas de educação ambiental.

Título: Biologia Molecular e Biotecnologia na Formação Continuada de Professores de Ciências: Aproximando Universidade e Escola Pública

Descrição: O projeto visou à criação e difusão de material pedagógico para o ensino de temas ligados à biologia molecular e biotecnologia, e sua utilização na formação continuada de professores de ciência de escolas públicas ligadas a Superintendência Regional de Ensino de Ponte Nova MG. A parte prática se destinou à capacitação de professores para o desenvolvimento de experimentos e utilização do Kit de modelos moleculares “Construindo as moléculas da vida: DNA-mRNA-Proteína”, desenvolvido por pesquisadores do Instituto de Física da USP-São Carlos.

CURRICULUM LATTES

<http://lattes.cnpq.br/4540289047342316>