



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Trabalho de Conclusão de Curso
Avaliação proteômica do baço como efeito do envenenamento por *Bothrops*
***jararaca* em modelo murino**

VICTÓRIA GUIMARÃES DALATORRE

SÃO PAULO
2025

Avaliação proteômica do baço como efeito do envenenamento por *Bothrops jararaca* em
modelo murino

Trabalho de Conclusão de Curso
de Farmácia da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

Orientador: Dr. Alison Felipe
Alencar Chaves

São Paulo
2025

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos.....	6
1.2 Composição dos venenos e efeitos fisiopatológicos.....	8
1.3 O baço no envenenamento	11
1.4 Uso de antivenenos como terapia	13
1.5 O estudo das proteínas como ciência Ômica	14
1.6 Proteômica baseada em Espectrometria de Massas.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Origem das amostras.....	19
3.2 Lise do tecido e preparo do extrato proteico.....	20
3.3 Single-Pot, Solid-Phase enhanced Sample Preparation (SP3):.....	20
3.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	21
3.5 Análise dos dados.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÃO	35
6. ASPECTOS ÉTICOS	36
7. REFERÊNCIAS	36
8. APÊNDICE	46
Apêndice A- Tabela estatística.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
APC	(<i>Antigen Presentation Cells</i>) Células Apresentadoras de Antígenos
SVMP	(<i>Snake Venom Metaloprotease</i>) Metaloproteases do veneno
SVSP	(<i>Snake Venom Serineprotease</i>) Serinoproteases do veneno
OMS	Organização Mundial da Saúde
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas
PEA	<i>Proximity Extension Assay</i>
sPLS-DA	<i>sparse Partial Least Square – Discriminant Analysis</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
LAO	L-aminoácido oxidase
PLA2	Fosfolipase do tipo A2
CTL	Lectinas do tipo C
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
CID	Dissociação induzida por Colisão
HCD	Dissociação Colisional de alta anergia
DDA	Aquisição Dependente de Dados
DIA	Aquisição Independente de Dados

RESUMO

O envenenamento por picada de serpentes é considerado uma doença tropical negligenciada e é responsável por milhares de mortes no mundo todo. No Brasil, a maior parte dos acidentes é causada por cobras do gênero *Bothrops*, cujo envenenamento causa severos efeitos locais e sistêmicos. Embora os efeitos locais sejam bem caracterizados, a literatura ainda apresenta um conhecimento fragmentado e pouco detalhado sobre os efeitos sistêmicos do envenenamento, como medido em órgãos distantes do sítio de inoculação do veneno. Uma vez que o baço é um órgão que recebe grande aporte sanguíneo e acumula funções imunológica e hematológica, interessa saber os efeitos que o envenenamento por *Bothrops jararaca* pode causar neste órgão, direta ou indiretamente. Nesse sentido, o presente trabalho propôs o estudo do proteoma do baço após injeção de veneno de *B. jararaca*, seguida de injeção de antiveneno ou não em camundongos eutanasiados 3 ou 24 horas após o envenenamento. Para isso, tecido criopreservado do baço de animais submetidos ao experimento foram lisados para preparação de extratos proteicos. As proteínas foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina utilizando o protocolo SP3 (Single-Pot, Solid-Phase-enhanced Sample Preparation) e analisadas em sistema LC-MS/MS operando em modo DIA (Data-Independent Acquisition). As identificações de peptídeos e inferência de proteínas foram realizadas usando os softwares DIA-NN versão 2.1.0 ao passo que as análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem R versão 4.2.2 com um documento Quarto markdown desenvolvido especificamente para o projeto. No total, foram identificadas 8.036 proteínas únicas, com base nas quais foi possível observar que os efeitos do veneno de *B. jararaca* no baço são mais intensos após 24 horas da inoculação, caracterizados pelo aumento de proteínas de fase aguda. Embora o antiveneno tenha reduzido o número total de proteínas com abundância diferencial, não foi capaz de reverter o aumento de proteínas inflamatórias. Os resultados apresentados contribuem para o entendimento dos efeitos sistêmicos do envenenamento, reforçando a importância destes estudos para o desenvolvimento de terapias que possam mitigar os danos inflamatórios e estruturais não neutralizados pelo antiveneno.

Palavras chave: envenenamento; *Bothrops jararaca*; antiveneno; baço

ABSTRACT

Snakebite envenomation is considered a neglected tropical disease and is responsible for thousands of deaths worldwide. In Brazil, most accidents are caused by snakes of the *Bothrops* genus, whose venom induces severe local and systemic effects. While local manifestations are well characterized, the literature still presents fragmented and insufficiently detailed knowledge regarding the systemic effects of envenomation, particularly in organs distant from the site inoculation. Since the spleen is a highly vascularized organ with both immunological and hematological functions, it is of interest to investigate the direct or indirect effects that *Bothrops jararaca* venom may have on this organ. In this context, the present study proposed to evaluate the spleen proteome following *B. jararaca* venom injection, with or without subsequent antivenom administration, in mice euthanized at 3 or 24 hours post-envenomation. For this purpose, cryopreserved spleen tissue from experimental animals was lysed to prepare protein extracts. Proteins were reduced, alkylated, and digested with trypsin using the SP3 protocol (Single-Pot, Solid-Phase-enhanced Sample Preparation) and analyzed by LC-MS/MS operating in Data-Independent Acquisition (DIA) mode. Peptide identification and protein inference were performed using DIA-NN software version 1.9, while statistical analyses were conducted using R language version 4.2.2 with a Quarto markdown document specifically developed for the project. In total, 8,036 unique proteins were identified. Based on this dataset, it was observed that the effects of *B. jararaca* venom on the spleen are more pronounced 24 hours after inoculation, characterized by an increase in proteins associated with the acute-phase inflammatory response. Although antivenom treatment reduced the overall number of differentially abundant proteins, it was not able to reverse the increase in inflammatory proteins. These findings contribute to the understanding of the systemic effects of envenomation and reinforce the importance of such studies for the development of therapies capable of mitigating inflammatory and structural damage not neutralized by antivenom.

Key words: envenomation; *Bothrops jararaca*; antivenom; spleen.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

O envenenamento por picada de serpente é uma doença tropical negligenciada potencialmente fatal causada pela inoculação de toxinas de uma serpente venenosa (WHO, 2023). Os acidentes ofídicos configuram um sério problema de saúde mundial, particularmente em regiões tropicais e subtropicais do globo e, em especial, comunidades rurais em países de baixa e média renda com difícil acesso à saúde e recursos médicos escassos (Machado, 2018). Esses eventos podem levar a complicações graves, incapacidades, sequelas e à morte.

O envenenamento por picada de serpentes foi incluído pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na lista de doenças tropicais negligenciadas. Estima-se que aproximadamente 5,8 bilhões de pessoas em todo o mundo estejam expostas ao risco de acidentes ofídicos (WHO, 2019). Desses casos, entre 81.410 e 137.880 resultam em morte a cada ano, seja pelo envenenamento em si ou por complicações associadas. Além disso, cerca de 400.000 vítimas sobrevivem com sequelas físicas e psicológicas, como cegueira, amputações e transtorno de estresse pós-traumático (Minghui et al., 2019).

Em muitos países onde picadas de cobra são comuns, os sistemas de saúde frequentemente carecem de infraestrutura e recursos adequados para coletar dados estatísticos precisos sobre o problema. Esta limitação é agravada pelo fato de que os casos reportados aos ministérios da saúde por clínicas e hospitais geralmente representam apenas uma fração do impacto real, já que muitas vítimas não chegam a acessar unidades de cuidados primários e, portanto, não são contabilizadas. Fatores socioeconômicos e culturais desempenham um papel importante nesse contexto, influenciando o comportamento de busca por tratamento. Além destes, fatores como custo da terapia, disponibilidade do tratamento, custo do atendimento médico e treinamento adequado dos profissionais de saúde são fatores que atuam como barreira para as populações mais afetadas pela problemática (Chippaux, 2017; Gutiérrez, 2017; Bagcchi, 2015).

Os acidentes ofídicos ocorrem em todo o mundo, mas são mais prevalentes em áreas rurais da África, Ásia, América Latina e Oceania. A prevalência de serpentes venenosas, práticas agrícolas e acesso limitado a cuidados médicos em caso de acidentes são fatores que influenciam a incidência dos acidentes em algumas regiões geográficas, especialmente em países tropicais e subtropicais. No Brasil, os acidentes ofídicos de importância médica são divididos em botrópico, causado por serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni*); Crotálico, ocasionado por serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis); Laquéticos, provocados por serpentes do gênero *Lachesis* (surucucus)

e Elapídicos, representados principalmente por corais verdadeiras do gênero *Micrurus* (Ministério da Saúde, 2021). A maioria dos casos de acidentes ofídicos no Brasil são causados por serpentes peçonhentas pertencentes ao gênero *Bothrops*. De acordo com o Ministério da Saúde, em 2022, a espécie *Bothrops jararaca* representou 69,3% das picadas registradas no país, com um índice de letalidade de 0,45%, afetando principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino em idade produtiva na região Norte do país (Figura 1) (SINAN, 2022; Bochner, 2003).

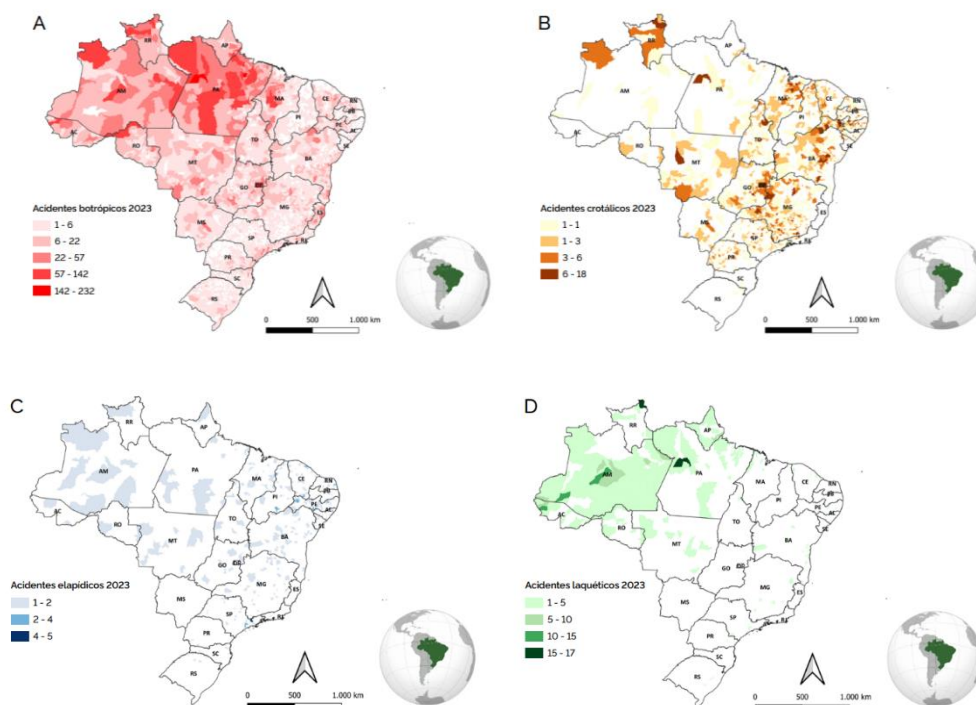


Figura 1. Distribuição espacial dos acidentes ofídicos no Brasil em 2023 segundo o tipo de serpente. **(A)** Acidentes botrópicos, **(B)** acidentes crotálicos, **(C)** acidentes elapídicos e **(D)** acidentes laquéticos. Fonte: Boletim Epidemiológico – Ministério da Saúde, Volume 55, 8 de outubro de 2024.

Registros do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), em 2022, mostram que os coeficientes de incidência de acidentes foram maiores nas Regiões Norte 10.284 (34,81%) e Nordeste 8.822 (29,86%), que agregaram quase dois terços dos acidentes ofídicos no país. Em 2022 foram notificados 94 óbitos por ofidismo no Brasil, dos quais os estados que mais notificaram óbitos foram Pará (14), Minas Gerais (12) e Amazonas (11). A Região Norte notificou mais óbitos (36), seguida pela Região Nordeste (23) (Boletim Epidemiológico, 2022). Acidentes de menor gravidade causados por outras serpentes de menor importância e repercussão também são notificados e ocorrem em todo o país (Melgarejo, 2009). Diante deste quadro, a OMS assumiu com o Brasil e outros países da América o compromisso de reduzir em 50% a mortalidade por picada de serpentes até 2030 por meio da capacitação e envolvimento das comunidades, fortalecimento do sistema de

saúde, coordenação de recursos e garantia de tratamentos seguros e eficazes. Para isso, a pesquisa e compreensão acerca das bases fisiológicas do envenenamento se fazem necessárias para o desenvolvimento de terapias cada vez mais eficazes, para a melhora dos desfechos clínicos e também para o fortalecimento da saúde pública e melhoria da qualidade de vida para as populações mais afetadas pela doença.

1.2 Composição dos venenos e efeitos fisiopatológicos

A composição dos venenos de serpentes é complexa e sua caracterização é um dos elementos que têm ajudado na compreensão dos efeitos locais e sistêmicos do envenenamento (Fox e Serrano, 2008; Calvete, 2011). A complexidade dos venenos de serpentes da família Viperidae foi observada pela primeira vez por meio de cromatografia em coluna de amostras de veneno bruto, na qual foram detectados diversos picos com absorção na faixa do ultravioleta (Ohsaka, 1960). Desde então, diversas técnicas de separação, identificação e caracterização foram empregadas a fim de melhor compreender os componentes dos venenos. A maioria desses componentes são proteínas e peptídeos biologicamente ativos, que compreendem cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno e funcionam para imobilizar, matar e auxiliar na digestão da presa (Serrano, 2005; Elaine et al., 2012). Entre as proteínas mais abundantes do veneno de *B. jararaca* (Figura 2A) destacam-se as metaloproteases, serinoproteases, lectinas do tipo C, L-aminoácido oxidases, fosfolipases A2 (Figura 2B) e, entre os componentes em menor abundância, mas com importante efeito fisiopatológico, destacam-se as hialuronidases.

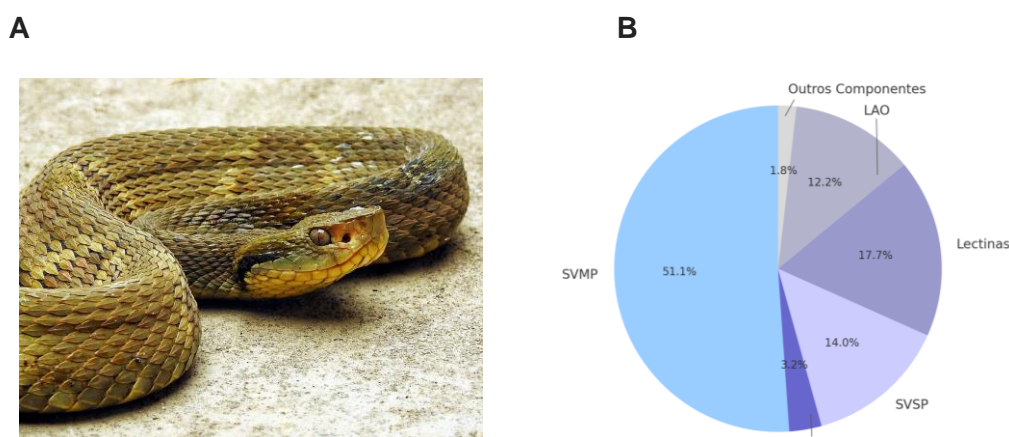


Figura 2. (A) Exemplar de serpente *Bothrops jararaca*. **(B)** Composição proteica do veneno de *B. jararaca* descrita por meio de proteômica baseada em espectrometria de massas. Metaloproteases (SVMPs) e serinoproteases (SVSPs) compõem o grupo mais abundante de toxinas do veneno. Adaptado de Fox e Serrano, 2008.

As frações não proteicas são representadas por cátions metálicos como cálcio e zinco, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas, aminoácidos livres, e lipídeos, porém a função de cada um desses componentes, bem como seu mecanismo de ação e efeitos sinérgicos durante o envenenamento não são totalmente conhecidos. O veneno é uma mistura complexa de proteínas com grande variedade de atividades biológicas, toxicidade e características cinéticas e dinâmicas, cuja complexidade vem sendo explorada extensivamente a fim de compreender a bioquímica e o efeito fisiológico destes compostos isolados e atuando de forma sinérgica sistemicamente. Como exemplo, as modificações pós-traducionais (PTMs) são uma fonte de variação de proteínas que contribuem significativamente com a diversidade de efeitos desencadeados pelo envenenamento (Markland, 1998; Cidade, 2006; Fox e Serrano, 2008; França et al., 2009; Moio, 2012).

O envenenamento por serpentes da família Viperidae é caracterizado por alterações proeminentes no local da picada, incluindo dor, edema, bolhas, hemorragia e necrose, que podem resultar em sequelas permanentes, como disfunção ou perda do tecido afetado (Gutiérrez, 1995; Warrell, 1995). Os efeitos sistêmicos do veneno de viperídeo incluem diversos distúrbios hemodinâmicos como hipotensão, choque circulatório, coagulação intravascular disseminada (CID), sangramento gengival, além de insuficiência renal aguda (Gutiérrez et al., 2006; Williams et al., 2019).

As metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs) são as principais responsáveis pela atividade hemorrágica característica dos venenos de serpentes viperídeas. Essas enzimas degradam diversos componentes da membrana basal e também hidrolisam proteínas da membrana celular endotelial, como integrinas e caderinas, que desempenham papéis cruciais na adesão célula-matriz e nas junções celulares. Em especial, o efeito destas proteases nas células endoteliais que formam os vasos sanguíneos resulta em extravasamento sanguíneo. Como consequência, as células tornam-se mais vulneráveis à força de cisalhamento do fluxo sanguíneo, o que agrava a ruptura da parede capilar e intensifica o processo hemorrágico (Gutierrez, 2005). As serinoproteases de venenos de serpentes (SVSPs) presentes no veneno botrópico são caracterizadas como enzimas com atividade do tipo trombina e que ativam os componentes sanguíneos da cascata de coagulação. De maneira geral, as serinoproteases atuam na conversão do fibrinogênio em fibrina, que por sua vez atua na consolidação de um tampão plaquetário inicial. Essas enzimas prejudicam o processo de coagulação normal pelo acentuado consumo dos fatores de coagulação e causam distúrbios hemostáticos como a incoagulabilidade sanguínea concomitante à coagulação intravascular disseminada como consequência da ativação dos fatores de coagulação ou pela disseminada agressão às células endoteliais (Ferreira, 2010; Yamashita, 2013; Cotran et al., 2000).

Outras classes de toxinas presentes no veneno botrópico são as lectinas do tipo C (CTLs), L-aminoácido oxidases (LAAOs) e fosfolipases do tipo A2 (PLA2). As lectinas do tipo C são proteínas que interferem no processo de reconhecimento célula-célula e célula-moléculas. Essas proteínas atuam como anticoagulantes, pró-coagulantes e moduladores da ativação plaquetária (Morita, 2004). A enzima L-aminoácido oxidase (LAAO), cuja atividade não é totalmente conhecida, está envolvida na catalisação da desaminação oxidativa de vários L-aminoácidos e possivelmente contribui para a toxicidade do veneno por meio da geração de peróxido de hidrogênio formado como resultado desta reação (Braga et al., 2008). Além destas, as fosfolipases (PLA2) catalisam a hidrólise de fosfolipídios de membranas celulares, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres. Esse processo resulta na geração de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e outros mediadores de fenômenos fisiológicos envolvidos principalmente na inflamação, além do efeito anticoagulante pela hidrólise e desordem da hemostasia primária. A ativação da cascata inflamatória resulta no aumento da permeabilidade microvascular, com recrutamento de leucócitos e liberação de mais mediadores inflamatórios, iniciando reações inflamatórias locais e sistêmicas (Serrano, 1999; Moio, 2012). As hialuronidases do veneno, por sua vez, degradam o ácido hialurônico da matriz extracelular, facilitando assim a difusão dos componentes tóxicos do veneno por todo o organismo da vítima, acelerando assim o processo de distribuição das toxinas pelo corpo (Dan, 2018).

Além destes, o envenenamento por *B. jararaca* está associado a alterações das células vermelhas no sangue, o que inclui defeitos na morfologia, como aparecimento de esquizócitos e hemólise. Uma das hipóteses para explicar o aumento de hemoglobina livre no plasma combinado com o aparecimento de poiquilocitose em esfregaços de sangue de animais envenenados por *B. jararaca* é a passagem das células vermelhas por redes de fibrina depositadas na microvasculatura, como consequência dos componentes ativadores da cascata de coagulação presentes no veneno (Senise et al., 2015). Por outro lado, os efeitos de PLA2 são bem descritos como causadores deste tipo de alteração morfológica em hemácias (Walton et al., 1997).

Essas alterações podem gerar impacto negativo em órgãos distantes do sítio de inoculação do veneno. Como exemplo, a deposição de fibrina nos capilares glomerulares está envolvida com a lesão renal aguda e necrose tubular, uma das causas mais frequentes de morte em pacientes picados por *B. jararaca* (Braz. J. Nephrol, 2009). A alteração hemodinâmica configura-se como outro efeito sistêmico decorrente da picada de serpentes do gênero *Bothrops*, caracterizada pela depleção de fibrinogênio e outros fatores da cascata de coagulação (Cardoso et al., 1993). Entre as consequências do envenenamento por picada de serpente viperídea, destacam-se danos locais ao tecido, como hemorragia e mionecrose,

que podem resultar em danos permanentes e sequelas em diversos órgãos (Bertholim et al., 2021; Rozanova, 2021).

1.3 O baço no envenenamento

O baço é um órgão linfóide secundário altamente vascularizado, que desempenha papéis fundamentais na remoção e reciclagem de eritrócitos da corrente sanguínea, além da ativação da resposta imunológica frente a antígenos devido a abundância de células fagocíticas e produtoras de anticorpos (Junqueira e Carneiro, 2017). A composição deste órgão inclui polpa branca e vermelha, cujas função e morfologia são separadas pela zona marginal, na qual macrófagos altamente fagocíticos que envolvem a artéria central auxiliam na detecção, apresentação de antígenos e reconhecimento de moléculas de adesão de hemácias envelhecidas (Muselius et al., 2023).

A polpa vermelha esplênica consiste em fendas endoteliais estreitas constituídas por uma rede frouxa de células e fibras reticulares (compostas de colágeno), além de outras células como macrófagos, linfócitos B e T, monócitos, granulócitos e plasmócitos. Desta forma, eritrócitos envelhecidos ou morfologicamente deficientes são incapazes de passar devido à rigidez ou expressão de moléculas de adesão como CD44 e Lu/BCAM, o que leva ao sequestro neste órgão (Klei et al., 2018; Junqueira e Carneiro, 2017). Além disso, esta porção do órgão atua como depósito de eritrócitos, plaquetas e ferro, na forma de hemossiderina.

A polpa branca cerca as arteríolas centrais que irrigam o órgão, formando cordões de linfócitos T e B e fibras reticulares concêntricas (Kapizova, 2023). Nesta porção, as células T naive são ativadas em resposta ao antígeno apresentado e ativam células B, resultando na produção de anticorpos específicos. O reconhecimento de infecção ou dano ao hospedeiro no baço ativa receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) em células fagocíticas, que por sua vez induzem sinais de ativação para mais células apresentadoras de antígenos (APCs), aumentando a depuração de antígenos em fagócitos e a resposta imunológica adaptativa (Lewis, 2019).

A patogênese dos efeitos sistêmicos do envenenamento por *B. jararaca* é complexa, e o estudo do proteoma de pessoas e modelos animais têm contribuído com a compreensão dos mecanismos envolvidos (Luna, 2011). Nesse contexto, foi observado que indivíduos picados por *Bothrops jararaca* apresentaram níveis aumentados de IL-6 e IL-8 e semelhança com trauma agudo induzido por resposta aguda típica (Barraviera, 1995). Luna et al. 2010 mostraram que a expressão de IFN- γ , TNF- α e IL-4 aumenta significativamente em linfócitos TCD4⁺ de indivíduos saudáveis quando incubados com veneno de *Bothrops* em relação a células na ausência do veneno. Paralelamente, observou-se aumento da produção de IFN- γ

e IL-6 em esplenócitos murinos incubados com venenos de *Bothrops*, sendo esta última interleucina um fator essencial na hematopoiese e diferenciação de células B em produtoras de anticorpos (Luna, 2010; Rezaee et al., 2010). Estudos realizados no Instituto Butantan revelaram que indivíduos picados por *B. jararaca* apresentaram respostas imunológicas individuais frente ao veneno, isto é, caracterizada pela produção de anticorpos para frações do veneno em diferentes proporções. Este estudo aponta o aumento da população de anticorpos do tipo IgM seguido por anticorpos do tipo IgG cujas concentrações aumentaram ao longo de 80 dias após a picada de maneira proporcional à redução dos anticorpos do tipo IgM. Além disso, observou-se que, em pacientes picados pela segunda vez, o tempo para aparecimento de anticorpos IgG foi reduzido de 18 para 3 dias após a picada (Domingos et al., 1990).

Esses resultados indicam que o veneno dessa serpente induz uma resposta celular do tipo Th1 que ativa células B, macrófagos e células dendríticas envolvidas na fagocitose. Isso é especialmente importante em processos de inflamação e no envenenamento, tanto pela limpeza do tecido necrótico no local da picada quanto pela apresentação de antígenos e ativação da resposta humoral (Luna et al., 2011).

Os eritrócitos têm vida útil de cerca de 120 dias e, quando envelhecidos, são destruídos no baço no processo denominado hemocaterese. Dentre outras causas, a hemólise é um evento que dispara a fagocitose de eritrócitos por macrófagos da polpa vermelha do baço (Klei et al., 2020). Aliado a isso, há evidência de que o envenenamento por serpentes produz um perfil pró-inflamatório em cultura primária de esplenócitos murinos, evidenciado pelo aumento da síntese de IFN- γ e citocinas pró-inflamatórias (Luna et al., 2011). Embora raro, casos de rotura esplênica foram registrados mesmo após administração de antiveneno, sugerindo a sobrecarga neste órgão como consequência dos efeitos hemotóxicos do veneno (Kin et al., 2021, Valenta et al., 2021). Análises histopatológicas do baço após esplenectomia em caso de acidentes ofídicos indicaram hemorragia subcapsular, congestão e hemorragia da polpa vermelha, acompanhado dos sintomas clínicos de distensão abdominal, hipotensão e aumento de glóbulos brancos, o que reflete a ação sistêmica do veneno em órgãos distantes do local de inoculação (Senthilkumaran et al., 2021).

Como descrito, diversos efeitos patológicos observados em casos de envenenamento por serpentes viperídeas são decorrentes de eventos de proteólise (Zelanis, 2015). A ação de compostos enzimáticos como hialuronidases, metaloproteases, serinoproteases, antitrombinas, PLA₂, fosfodiesterases e L-aminoácido oxidases são responsáveis pela exposição do epitélio a fatores de coagulação, afrouxamento de tecidos permitindo a entrada do veneno, digestão da lâmina basal, inibição da coagulação e hidrólise da trombina, produção de ácido araquidônico e mediadores inflamatórios, entre outros (Bickler, 2020).

Devido aos efeitos das toxinas liberadas em acidentes de envenenamento por serpentes da família Viperidae, os sintomas clássicos são caracterizados por alterações proeminentes no local da picada, incluindo dor, edema, bolhas, hemorragia e necrose, que podem resultar em sequelas permanentes, como disfunção ou perda do tecido afetado (Gutiérrez, 1995; Warrell, 1995). Os efeitos sistêmicos do veneno de viperídeo incluem hipotensão, choque circulatório, coagulação intravascular disseminada, sangramento gengival e hipotensão hipovolêmica, que podem contribuir para o desenvolvimento de insuficiência renal aguda e evoluir para morte (Gutiérrez et al., 2006; Williams et al. 2019). A administração parenteral de antivenenos de animais hiperimunizados constitui a terapia de primeira escolha (W.H.O., 2010; Warrell, 2010; Gutiérrez, 2012).

1.4 Uso de antivenenos como terapia

A variação de constituintes dos venenos torna particularmente desafiador desenvolver um antiveneno universal que possa ser usado para tratar picadas de serpentes em todo o mundo. No Brasil, o antiveneno utilizado para terapia de acidentes botrópicos é produzido principalmente no Instituto Butantan, por hiperimunização de cavalos com uma mistura de venenos de *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. alternatus* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%). A quantidade de antiveneno administrada em cada paciente está relacionada com o nível de gravidade do caso, que é classificado como leve, moderado e grave, de acordo com as manifestações clínicas (BRASIL, 2017).

Os efeitos locais e sistêmicos do envenenamento se desenvolvem rapidamente após a inoculação, tornando a neutralização por antivenenos difícil se realizada tardiamente devido às limitações de acesso a cuidados médicos ou à insuficiência de antivenenos. Além disso, a gravidade dos efeitos locais depende da quantidade inoculada do veneno de *B. jararaca*, podendo resultar em sequelas físicas e psicológicas permanentes (Rosenfeld, 1971; Cardoso et al., 1993, Jorge et al., 1999, Ribeiro et al., 2001; Gutiérrez et al., 1998).

A administração intravenosa de antiveneno antibotrópico neutraliza os efeitos sistêmicos devido à especificidade para as principais toxinas do veneno, mas não reverte de forma eficiente os sintomas locais (Battellino et al., 2003) pois os mediadores do processo inflamatório agem rapidamente após o acidente e o soro não atua em mediadores endógenos que já foram liberados ou em danos já estabelecidos nos tecidos lesados (Souza, 2023). Dados do SINAN mostram que a demora no atendimento após um acidente ofídico é um dos fatores que contribui para aumentar o coeficiente de letalidade desses acidentes, pois quanto maior a demora para o atendimento adequado, maior a probabilidade de complicações locais e sistêmicas (Figura 3) (SINAN, 2022; Souza, 2021).

Apesar de os soros antiofídicos salvarem milhares de vidas todos os anos, possuem uma série de limitações técnicas que restringem sua utilidade clínica. Os antivenenos apresentam eficácia restrita às espécies utilizadas para imunização dos animais hiperimunizados, têm baixa eficácia de dose (apenas 10 – 20% dos anticorpos antiveneno são tipicamente específicos para os imunógenos da toxina) e, por serem proteínas heterólogas, exibem altas incidências de efeitos adversos (Harrison, 2017; Ainsworth 2018; de Silva, 2016).

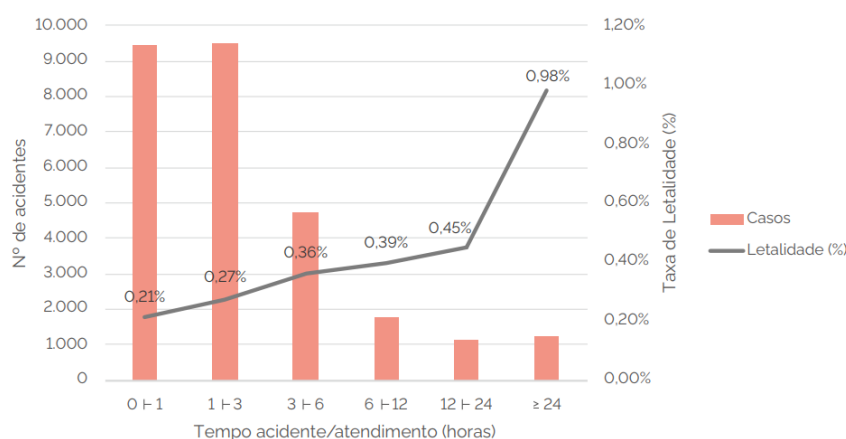


Figura 3. Relação entre número de acidentes, tempo entre acidente e atendimento e taxa de letalidade. Adaptado de Boletim Epidemiológico (2024).

1.5 O estudo das proteínas como ciência Ômica

Proteínas são macromoléculas formadas por cadeias de aminoácidos ligadas entre si por ligações peptídicas. Estas são essenciais nos organismos vivos e são a base dos processos biológicos por desempenharem funções estruturais, enzimáticas, de transporte, sinalização, imunológica, entre outras (Dayhoff, 1962). O conteúdo total de proteínas de um organismo ou célula é denominado proteoma. Nesse contexto, a proteômica é a caracterização do proteoma, incluindo expressão, estrutura, funções, interações e modificações de proteínas que compõem o organismo ou célula de interesse. Tendo em vista que proteínas são as unidades funcionais das células e sua regulação viabiliza os diferentes processos biológicos, a proteômica se destaca no campo das ciências por possibilitar a identificação e quantificação de proteínas que podem revelar-se potenciais marcadores para diagnóstico ou prognóstico em diversas doenças. Além disso, o estudo do proteoma pode possibilitar o entendimento de intrincadas vias metabólicas e a investigação de potenciais alvos terapêuticos para determinadas doenças no cenário da medicina de precisão, contribuindo para o desenvolvimento de terapias mais direcionadas (Aslam, 2016). Como exemplo, a resposta celular frente a estímulos diferentes em determinados intervalos de

tempo pode ser determinada pelo proteoma celular nas diferentes condições avaliadas, o que permite discriminar entre diferentes estados biológicos com base na diferença da abundância diferencial de proteínas (Messner, 2023).

As principais tecnologias disponíveis para este fim giram em torno da alta capacidade de identificar e quantificar milhares de proteínas em pequenos volumes de amostra de maneira sensível, específica e acurada. Entre as tecnologias utilizadas no campo da proteômica figuram aquelas baseadas em anticorpos (Olink), aptâmeros (SomaScan) e espectros de massas. O ensaio SomaScan usa sequências de nucleotídeos quimicamente modificadas denominados aptâmeros para transformar um sinal de proteína em um sinal de nucleotídeo. Os aptâmeros são oligonucleotídeos curtos de fita simples, que se dobram em estruturas moleculares diversas e intrincadas que se ligam com alta afinidade e especificidade a proteínas, peptídeos e pequenas moléculas. O sinal gerado por cada ligação altamente específica é quantificado usando fluorescência relativa em microarrays, cujo uso compreende determinações em amostras biológicas complexas como de plasma e soro pela capacidade de mensurar a abundância relativa de cerca de 6.400 proteínas por ensaio (SomaLogic, 2021; Gold, 2010).

Olink é uma tecnologia baseada em imunoenaios por meio da ligação de dois anticorpos a um ou mais antígenos pré-selecionados. No ensaio por extensão de proximidade (proximity extension assay – PEA) cada par de anticorpos é conjugado a uma única sequência de oligonucleotídeos de fita simples e complementares. Assim, com a ligação do par correto de anticorpos à proteína alvo e subsequente hibridização dos oligonucleotídeos por proximidade ocorre o enriquecimento de duas sondas de DNA fita simples exclusivas para criar um código de barras de fita dupla exclusivo para cada antígeno. A sequência correspondente é amplificada por uma DNA polimerase e os amplicons são mensurados por qPCR. Esta tecnologia permite analisar e quantificar de forma absoluta ou relativa 2.925 proteínas em painéis menores (Olink Proteomics, 2021; Wik *et al.*, 2021; Eldjarn, 2023).

A proteômica baseada em espectrometria de massa (MS) pode ser usada para identificação e quantificação de milhares de proteínas em amostras biológicas. Em especial, para amostras complexas, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) se tornou a técnica mais amplamente utilizada para separação dos peptídeos e redução da complexidade das amostras analisadas por MS conforme eluem da coluna cromatográfica (Dettmer, 2007; Zubair, 2022). O avanço dos instrumentos e métodos de aquisição de dados de espectrometria exigem técnicas de design experimental, preparação de amostras, instrumentação, bancos de dados bem anotados e análise de dados, o que torna a proteômica baseada em espectrometria de massas um campo dinâmico em constante atualização e aprendizado (Aebersold, Mann, 2016; Messner, 2023; Schubert, 2017).

1.6 Proteômica baseada em Espectrometria de Massas

A proteômica baseada em MS não é uma técnica única, mas composta de ferramentas que podem diferir de acordo com a complexidade da amostra e a pergunta a ser respondida experimentalmente. Um espectrômetro de massas mede a massa (m) de uma molécula em relação a sua carga (z) em um campo eletromagnético. Para isso, proteínas ou peptídeos são ionizados e migram por um campo eletromagnético de correntes contínua (CC) e alternada (CA) até o analisador de massas. Os analisadores do tipo *ion trap* são tipicamente compostos de quatro eletrodos em forma de haste, denominados analisadores quadrupolo, aos quais CC e CA são aplicados para produzir campos elétricos que confinam íons no espaço sem colidir com os eletrodos. O isolamento dos íons é o passo que precede a fragmentação. A forma mais comum de fragmentação, e que foi utilizada neste trabalho, é a dissociação colisional de alta energia (HCD), na qual os íons são acelerados contra a atmosfera de um gás inerte (hélio, nitrogênio ou argônio) e colidem produzindo fragmentos que compõem os espectros de MS2 (Figura 4). (Savaryn, 2016; Han, 2008)

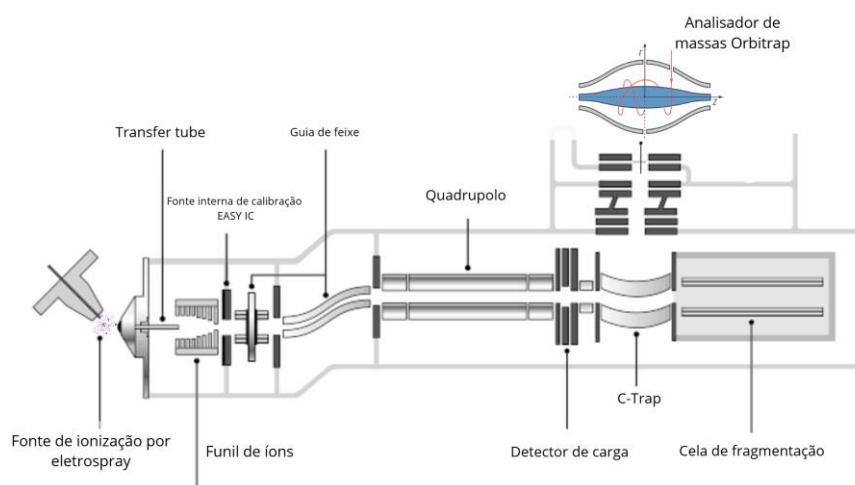


Figura 4. Exemplo de fluxograma de um espectrômetro de massas equipado com um filtro de massas do tipo quadrupolo e um analisador de massas do tipo Orbitrap. Os peptídeos são ionizados por eletrospray e transferidos pelo tubo de transferência para uma câmara de vácuo. O guia de feixe de íons remove eventuais íons neutros que não sofrem influência do campo eletromagnético, garantindo que somente moléculas ionizadas cheguem ao filtro de massas (quadrupolo), onde os íons dentro de uma faixa de massa específica, exibindo oscilações de amplitude constante, podem ser isolados por quatro hastes paralelas. A equação de Mathieu pode ser utilizada para determinar o movimento tolerado antes que os íons deixem de ser confinados. Estes são acumulados num compartimento chamado C-Trap e fragmentados na cela de fragmentação HCD, em que os íons sofrem aceleração para uma alta energia cinética na região de vácuo e colidem com moléculas de gás inerte. Uma parte da energia cinética é convertida ou internalizada pela colisão, o que resulta na quebra de

ligações químicas, assim o íon é reduzido a fragmentos menores. Os fragmentos são então analisados no Orbitrap por meio da frequência do íon durante o movimento oscilatório como efeito do campo eletromagnético. A oscilação do sinal é transformada em componentes espectrais por meio da Transformação de Fourier (Marshall, 1998; Savaryn, 2016; Steen, 2004). Figura adaptada de Robitaille, 2025.

Entre as abordagens proteômicas bem estabelecidas, duas principais podem ser distinguidas de acordo com a forma em que a separação de proteínas e a análise de massas são realizadas. A primeira, chamada abordagem *bottom-up*, é baseada na digestão das proteínas pela ação de uma protease, usualmente tripsina, antes da separação e análise no espectrômetro. A segunda estratégia geral é chamada abordagem *top-down*, que é baseada na separação e MS, ambas realizadas no nível da proteína intacta (Andreas e Alexander Becker, 2017).

Na proteômica *bottom-up* duas estratégias de aquisição de dados são amplamente utilizadas. Estas são a aquisição dependente de dados (DDA) e a aquisição independente de dados (DIA), que diferem principalmente na maneira de selecionar íons precursores para fragmentação e subsequente aquisição de espectros MS2. Resumidamente, um experimento utilizando DDA normalmente compreende a seleção, acumulação e fragmentação com base na intensidade de íons precursores selecionados no espectro de MS1. Em contraste, o princípio do modo DIA de varredura completa é isolar íons em toda a faixa de m/z definida dentro da qual todos os íons precursores são fragmentados e scaneados em espectros de MS2, eliminando a necessidade de seleção de precursores em tempo real. Comparado à estratégia do tipo DDA, o modo DIA gera espectros MS2 mais complexos (quimerismo) exigindo, portanto, ferramentas de informática especializadas para análise de dados (Lou, Ronghui et al., 2024; Zhang, 2013).

O maior desafio dos métodos baseados em DIA é a deconvolução computacional dos espectros obtidos resultantes da co-fragmentação de íons precursores (Zhang, 2020). Nesse sentido, diversos softwares tem sido desenvolvido para interpretar os espectros de DIA gerados experimentalmente utilizando bibliotecas espectrais empíricas ou preditas por algoritmos de aprendizado de máquina. A busca baseada em bibliotecas espectrais representa a estratégia mais amplamente empregada, que incorpora informações *a priori* no início da análise de dados obtidos em modo DIA. As informações *a priori* podem abranger vários parâmetros, como padrões de fragmentação de peptídeos, valores de tempo de retenção padronizados para precursores e fragmentos dos peptídeos, abundância dos fragmentos, entre outros. As ferramentas de análise para experimentos que utilizam DIA como estratégia de aquisição (OpenSWATH, Skyline, DIA-NN, Spectronaut, MaxDIA,

EncyclopeDIA) utilizam técnicas de aprendizado de máquina para deconvoluir espectros (Zhang, 2020).

A biblioteca de espectros teóricos também pode ser gerada *in silico*, ou seja, predita computacionalmente, em softwares como DIA-NN (Data Independent Acquisition by Neural Network). Neste, é possível fornecer um arquivo fasta contendo as sequências canônicas do proteoma alvo do estudo, atendendo ao princípio da parcimônia a fim de evitar sobrecarga computacional para resolução dos espectros. Seleciona-se a enzima utilizada em bancada para digestão das proteínas durante o processamento das amostras, número de erros de clivagem, FDR (*False Discovery Rate*), número de resíduos de aminoácidos, entre outros parâmetros. O *output* é um arquivo com colunas *Protein ID*, *Normalized quantity*, entre outras, utilizadas para o tratamento estatístico dos dados (Demichev, 2020).

Uma das principais limitações da busca baseada em bibliotecas espectrais para DIA é que apenas peptídeos presentes nesta biblioteca podem ser identificados. Assim, um mapa de proteoma abrangente e confiável é essencial para avanços na área de proteômica, servindo como pré-requisito para o desenvolvimento de técnicas de espectrometria de massas direcionadas e estratégias de aquisição independente de dados (DIA), visto que estas dependem de informações de bibliotecas espectrais de alta qualidade pré-existent.

A proteômica baseada em espectrometria de massas também se destaca na investigação de modificações pós-traducionais, que desempenham papéis cruciais na regulação celular e na sinalização. Essas modificações resultam em mudanças características na massa das moléculas, permitindo sua localização com precisão de um único aminoácido por meio de espectros de íons de fragmentação de peptídeos (Aslam, 2016). Além de sua aplicação em questões específicas, a proteômica tem o potencial de transformar cada experimento em um estudo de descoberta global tendo em vista o volume de dados gerados.

Embora várias ferramentas para auxiliar na análise de dados obtidos em modo DIA tenham se mostrado bem-sucedidas, diversos problemas ainda precisam ser resolvidos, incluindo a incapacidade de identificar peptídeos de baixa abundância e não canônicos ou modificados, a estimativa precisa de FDR de peptídeos e proteínas, entre outros. Nesse sentido, as ferramentas de busca sem biblioteca podem ter ainda mais aplicações, como o potencial de detectar novas proteoformas, incluindo peptídeos não canônicos, como aqueles quimicamente modificados e variantes de splicing (Zhang, 2020).

A identificação assertiva de substratos e vias de ação de diversas toxinas clinicamente importantes permitem a adoção de uma abordagem informada para geração de novas terapias direcionadas para picadas de serpentes (Slagboom, 2020). Neste trabalho, pretendeu-se estudar os efeitos do envenenamento por *B. jararaca* sobre o baço de

camundongos que receberam ou não a administração de antiveneno por meio de abordagens de proteômica quantitativa.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o perfil de abundância diferencial das proteínas teciduais do baço após a injeção de veneno de *B. jararaca* e o efeito do antiveneno antibotrópico em modelo murino por meio de técnicas de espectrometria de massas. Especificamente, buscamos

- I. Investigar o perfil proteico do baço de animais após envenenamento e o efeito do soro antibotrópico neste contexto;
- II. Discriminar entre os diferentes grupos de intervenção por meio de técnicas de análises supervisionada (PLS-DA) e não supervisionada (PCA);
- III. Identificar potenciais marcadores dos efeitos observados no baço.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem das amostras

As etapas envolvendo experimentação *in vivo* foram executadas sob aprovação do comitê de ética em pesquisa animal do Instituto Butantan (CEUA 9991131219). Um total de vinte camundongos (Swiss) machos receberam injeção de 1,6 mg/kg de veneno de *Bothrops jararaca* ou injeção de 150 mM de solução salina (NaCl) no músculo gastrocnêmio num volume de 50 µL. Após 1 h, os camundongos receberam a administração do soro antibotrópico pentavalente produzido pelo Instituto Butantan ou nova administração de solução salina na veia caudal. Após 3 h ou 24 h da primeira injeção, o baço foi coletado e criopreservado para posterior análise histológica e proteômica, constituindo assim 6 grupos de tratamento: salina + salina (SS), salina + antiveneno (SA), veneno + salina 24 h (VS24), veneno + salina 3 h (VS3), veneno + antiveneno 3 h (VA3) e veneno + antiveneno 24 h (VA24), como esquematizado na Figura 5.

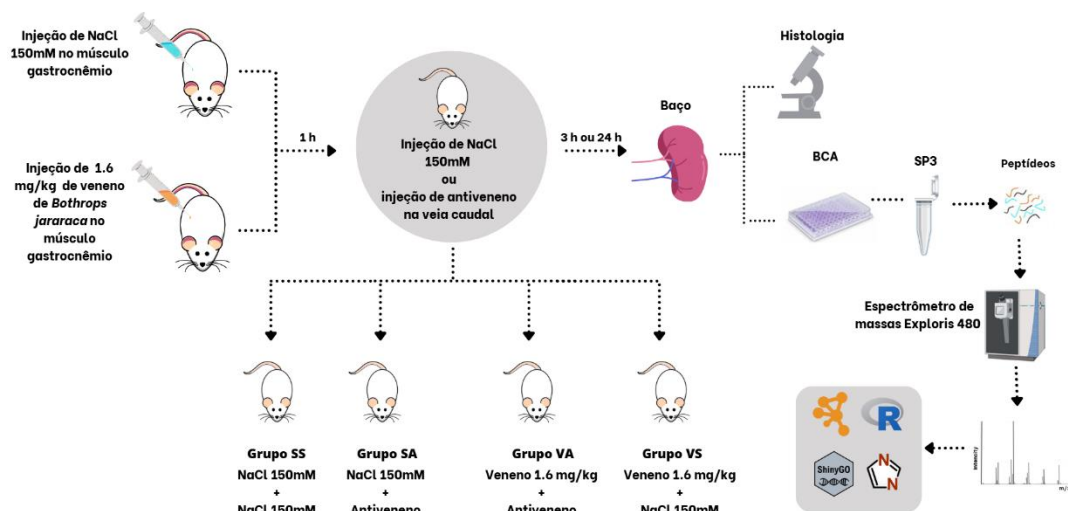


Figura 5. Modelo experimental do projeto. Vinte camundongos foram submetidos aos tratamentos descritos e o baço foi coletado após 3 h ou 24 h para análise histológica e proteômica. As proteínas foram digeridas e analisadas por LC-MS/MS para mapear o proteoma de modo quantitativo.

3.2 Lise do tecido e preparo do extrato proteico

Fragmentos de tecido esplênico foram imersos em tampão de lise (100 mM HEPES, pH 8.0, 2% SDS, 50 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMSF) em microtubos do kit Precellys Lysing Hard Tissue CK28-R. Para lise mecânica, o instrumento Precellys foi ajustado para 2 ciclos a 5.500 g, 30 s com 40 s de pausa. Homogenatos foram centrifugados a 10.000 g, 4 °C, 10 min, e o sobrenadante transferido para novos tubos. A estimativa do conteúdo proteico foi realizada pelo ensaio de quantificação indireta pela reação com ácido bicinconínico (BCA) utilizando o kit de reação Pierce™ BCA Protein Assay. A albumina foi utilizada como padrão em concentrações conhecidas para realização da curva de calibração e a absorbância foi lida a 562 nm no espectrofotômetro FLUOStar Ômega (BMG Labtech Inc). Um volume suficiente para 50 μg de proteínas foi utilizado para as etapas subsequentes do processamento.

3.3 Single-Pot, Solid-Phase enhanced Sample Preparation (SP3):

Uma proporção de 1:1 de esferas magnéticas hidrofóbicas:hidrofílicas (Sera-Mag SpeedBeads) foi preparada e lavada com água 3 vezes. As proteínas foram reduzidas e alquiladas com 5 mM de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) e 20 mM de 2-cloroacetamida (CAA) por 30 min à 45 °C, 1.500 rpm protegidas da luz. As amostras foram incubadas com as esferas magnéticas numa proporção 10:1 (beads:proteínas). Etanol absoluto foi adicionado para uma concentração final de 50% para induzir a ligação das proteínas às *beads*, que foram

incubadas na estante magnética por 5 minutos para remoção do etanol. As esferas foram lavadas com etanol 80% 3 vezes. Após esses passos, foi adicionado 50 µL de bicarbonato de amônio 50 mM contendo tripsina (1:100 enzima:substrato). Os peptídeos resultantes foram analisados por LC-MS/MS operando em modo DIA.

3.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Os peptídeos foram injetados no sistema Vanquish Neo equipado com um pré-coluna PepMap Neo Trap cartridge (300 µm x 5 mm, C18) e uma coluna analítica PepMap Neo (75 µm x 150 mm, C18 de 2 µm, 100 Å). Um gradiente de 90 min partindo de 5% a 30% de solvente B (80% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico) em solvente A (0,1% ácido fórmico em água) à 300 nL/min por 70 min, 30% a 40% de solvente B à 300 nL/min por 7 min, 40% a 99% solvente B a 300 nL/min por 12 min. O sistema de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher) foi operado em modo DIA, selecionando os precursores com janelas de isolamento de 10 m/z, num intervalo de massas de 350 a 950 m/z, com 30.000 de resolução, máximo tempo de injeção de 50 ms e AGC target de 1.000%. Para análise por LC-MS/MS foi utilizado um filtro de mobilidade iônica (FAIMS) duas voltagens de compensação selecionadas como -45 V e -60 V. O estado de carga padrão foi selecionado para +3 e a fragmentação foi realizada utilizando duas energias normalizadas de colisão selecionadas como 32% e 36%.

3.5 Análise dos dados

Arquivos raw (Thermo) foram convertidos para mzML usando o software MSConvert com os filtros de seleção de pico e centroide ativados. Os arquivos mzML foram analisados no software DIA-NN 1.9.2 (Demichev, 2020) com o banco revisado de *Mus musculus* disponível na base de dados UniProt contendo apenas sequências canônicas, contaminantes e decoys para produzir uma biblioteca de espectros preditos. Como modificações variáveis foram selecionadas acetilação do N-terminal (+42.0106) e excisão da metionina inicial, enquanto a carbamidometilação da cisteína (+57.0214) foi selecionada como modificação fixa. O número máximo permitido de modificações variáveis foi 1. Especificidade para tripsina foi selecionada, admitindo-se até 1 erro de clivagem, tamanho de peptídeo entre 7 a 35 resíduos de aminoácidos, intervalo de massas do precursor de 350 a 950 m/z e FDR de 1%. A tolerância de massas para o precursor e para os fragmentos foi admitida até 10 ppm e 20 ppm, respectivamente. O algoritmo de quantificação QuantUMS no modo de alta acurácia foi utilizado.

O arquivo report.parquet gerado pelo DIA-NN foi lido usando a biblioteca arrow para linguagem R. Para avaliar se era possível discriminar entre as diferentes condições testadas,

empregou-se a técnica de análise supervisionada *Partial Least Square Discriminant Analysis* (PLS-DA) disponível no pacote mixOmics para linguagem R e para avaliar o perfil de abundância diferencial entre as amostras, os dados foram normalizados e o modelo linear construído utilizando o pacote limma para linguagem R com o método de regressão robusta. A análise de enriquecimento de vias de sinalização foi realizada utilizando a ferramenta GeneOntology. O conjunto de todas as proteínas identificadas foi utilizado como background e o conjunto de proteínas com abundância diferencial significativa foi utilizado como foreground.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histopatológica do baço não permitiu identificar a presença de esquizócitos ou congestionamento das polpas dos órgãos em nenhum grupo de estudo (Figura 6). Além disso não há infiltração inflamatória próximo às arteríolas centrais ou sinais desorganização das polpas.

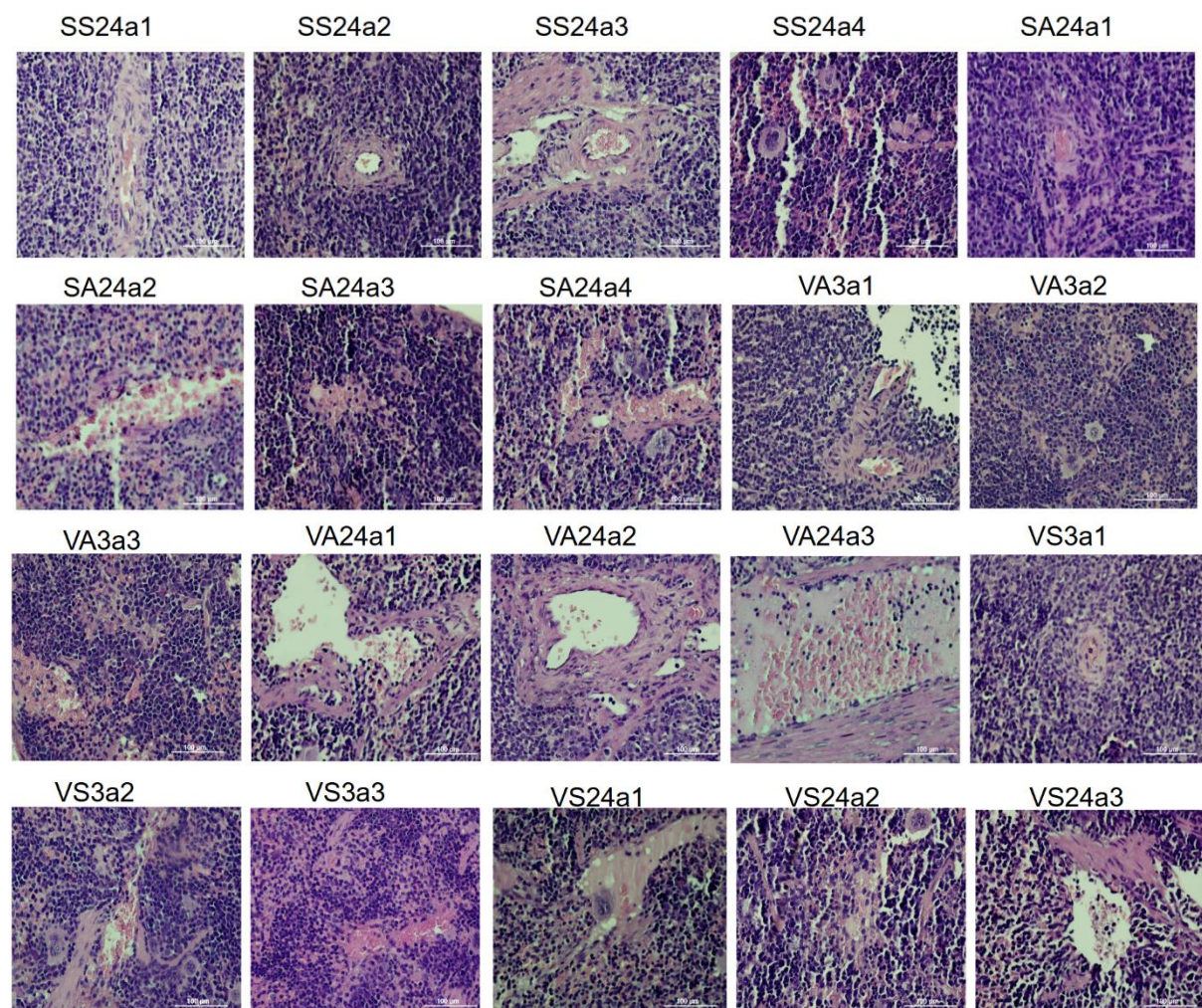


Figura 6. Cortes histológicos representativos de cada amostra biológica. Coloração H&E, 400x. Barra de escala em 100µm.

Para a análise proteômica, o processamento dos arquivos foi realizado conforme descrito na sessão materiais e métodos e os dados foram analisados utilizando a linguagem R. A reconstrução dos cromatogramas de íons permitiu a comparação entre replicatas biológicas em termos de sinal e picos que geram identificações, bem como a identificação de amostras com características de *outlier*. A amostra VA3a3 foi identificada com sinal mais baixo e menos picos (Figura 7 Painel A), o que resultou, posteriormente, no menor número de identificações nesta amostra (4.920 proteínas identificadas) e maior esparsidade (13%). Para as análises de LC-MS/MS utilizamos um filtro de mobilidade de íons (FAIMS) para enriquecer populações de íons com estados de carga +2 e +3, o que pode ser observado na maior densidade de íons com duas ou três cargas (Figura 7 Painel B).

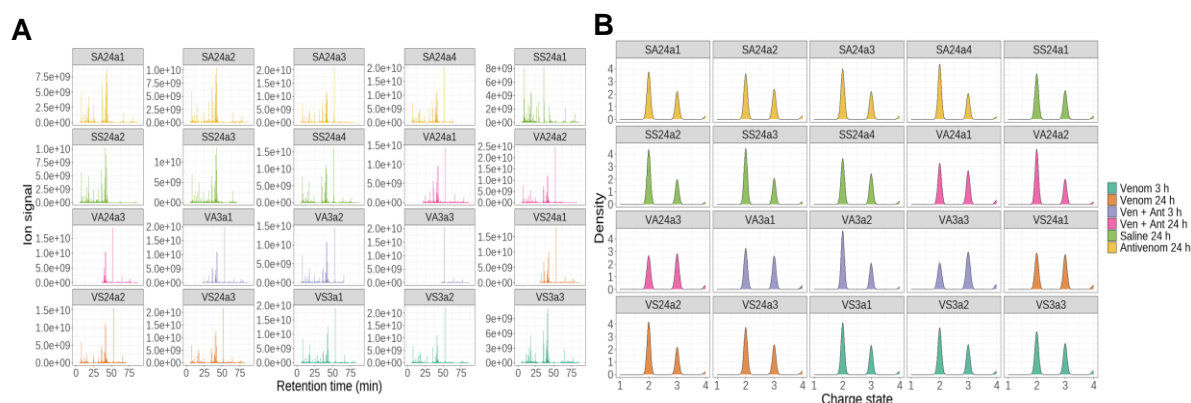


Figura 7. (A) Reconstrução dos cromatogramas de íons para cada amostra. O eixo-X mostra o tempo de retenção em minutos e o eixo-Y mostra a intensidade do sinal dos precursores. **(B)** Densidade de íons precursores distribuídos por estados de carga.

Além disso, o pré-processamento dos dados contou com uma etapa de filtro de acurácia, que consistiu na remoção de precursores com características quantitativas de baixa qualidade (Figura 8). Os coeficientes de variação (CV) extraídos das abundâncias de proteínas para todas as condições testadas tiveram a mediana a baixo de 20%, com exceção do grupo de animais que recebeu injeção de Veneno + Antiveneno 3 h (Figura 9 Painel A). Os coeficientes de variação são uma medida da precisão quantitativa em proteômica. De modo geral, quando um número maior que 75% das proteínas têm CVs menores que 20% assume-se boa precisão. Isso indica que os dados dentro de cada grupo são homogêneos, garantindo maior poder de inferência estatística sobre os dados obtidos em termos de comparação entre os grupos de intervenção.

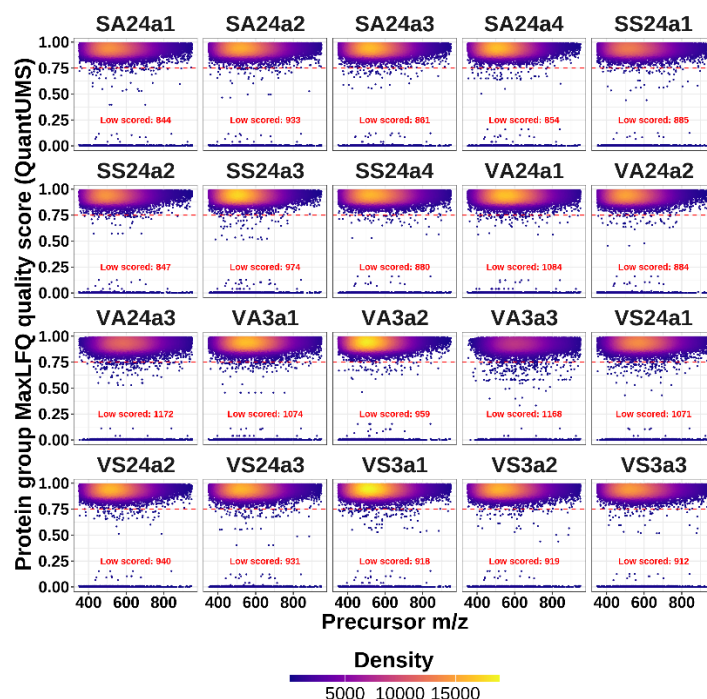


Figura 8. A linha tracejada marca o limite de 0,75 no Protein Groups MaxLFQ QuantUMS score aplicada aos peptídeos. A anotação em vermelho identifica o número de peptídeos com pontuação baixa removidos de cada amostra. O gradiente de cor é proporcional à densidade dos peptídeos.

Para definir a estratégia adequada para o tratamento dos dados, avaliamos o perfil de esparsidade na matriz de abundância de proteínas. Esta análise permite identificar quais proteínas foram identificadas na maior parte das amostras. A matriz completa de abundância de proteínas após o corte de acurácia apresentou 14,7% de esparsidade e 85,3% de completude (Painel B). Para preservar a heterogeneidade biológica decidiu-se reduzir a esparsidade para 10% por proteína. Assim, proteínas que não foram identificadas em, pelo menos, 90% das amostras foram removidas da matriz de abundância (Painel C). Após a redução dos valores faltantes do *dataset*, a matriz de abundância teve a esparsidade reduzida para 1,7% (Painel D). Os coeficientes de correlação de Person calculados entre as amostras foram $> 0,95$ (Painel E), antecipando distribuições homogêneas das abundâncias de proteínas. A análise foi capaz de identificar 8.036 proteínas únicas e, em média, 5.600 proteínas por amostra (Painel F). Este resultado representa alta cobertura do proteoma de baço murino sob as condições testadas.

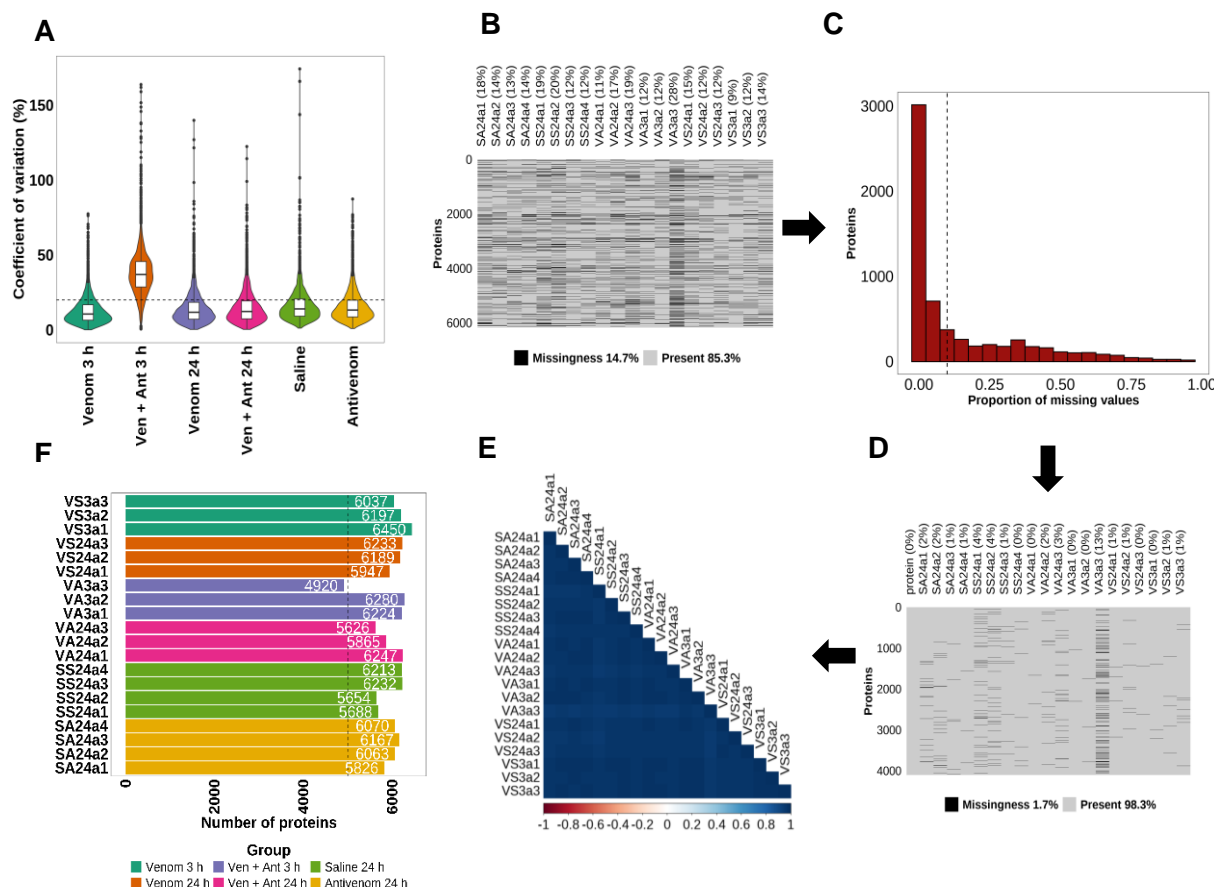


Figura 9. (A) Distribuição dos coeficientes de variação (CV) para as abundâncias de proteínas em cada grupo experimental. Eixo-Y representa o CV em % e eixo-X representa os grupos experimentais, a linha tracejada marca 20% CV. (B) Matriz de esparsidade das proteínas identificadas (eixo-Y) nas diferentes amostras (eixo X) antes da redução de esparsidade. (C) Distribuição de missing values por proteína na matriz de abundância. A linha tracejada marca o corte escolhido para redução de esparsidade (10%). (D) Matriz de esparsidade das proteínas após remoção de proteínas com mais de 10% de missing values. (E) Matriz de correlação entre as amostras. A escala de cor é proporcional ao coeficiente de correlação de Pearson. (F) Número de proteínas identificadas por amostra. A linha tracejada marca 5.000 proteínas, como referência.

Após a redução da esparsidade, os valores ausentes para a abundância de proteínas foram imputados usando o método de particionamento recursivo implementado na biblioteca *rpart* (*recursive partitioning and regression trees*) para a linguagem R. O método é baseado em árvores de decisão para classificar os grupos e imputar valores razoáveis de acordo com outras amostras do mesmo grupo (Strobl et al., 2009). Após a imputação, as abundâncias foram normalizadas pelo desvio absoluto da mediana.

A normalização é necessária para minimizar variações sistemáticas, permitindo comparações de abundância entre amostras biológicas com maior confiança. Existem diversos métodos de normalização, entre eles a normalização por Quantis, um método que pode ser excessivamente agressivo na remoção de variações biológicas reais; a normalização cyclic loess, assume que a maioria das proteínas não muda significativamente de expressão entre as condições estudadas, porém é menos agressiva que a anterior e a normalização por desvio absoluto mediano (*median absolute deviation* – MAD) que não é facilmente influenciada por outliers ou valores extremos (Bolstad et al., 2003; Balman et al., 2004). Nesse sentido, comparando-se as distribuições de intensidades não normalizadas com cada método de normalização descrito (Figura 10), optou-se pelo uso do método MAD, que aparentemente acomoda melhor a heterogeneidade entre as amostras. As distribuições de abundâncias normalizadas após o controle de qualidade são mostradas na Figura 10. Embora a amostra VA3a3 tenha sido menos homogênea, mesmo após a normalização, optamos por mantê-la na análise para levar em consideração a variabilidade biológica que pode estar contida nesta amostra.

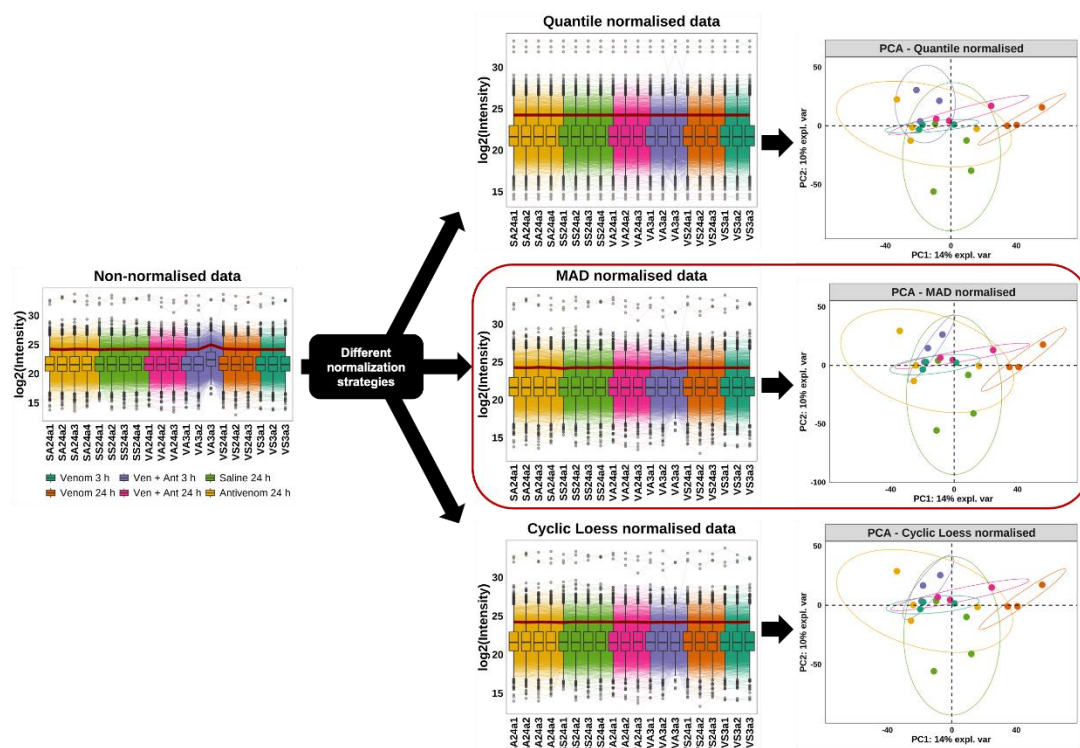


Figura 10. Diferentes métodos de normalização: Quantile, MAD e Cyclic Loess. As normalizações foram realizadas a fim de apontar um método de normalização dos dados que melhor acomodasse a heterogeneidade entre as amostras. No eixo X encontram-se as amostras e no eixo Y o log2 da intensidade de sinal. De modo geral, os métodos apresentaram resultados de PCAs semelhantes, assegurando que a discriminação entre os grupos observados não seja um artefato do método de normalização.

A análise de componentes principais (PCA) é um método estatístico não supervisionado usado para reduzir a dimensionalidade dos dados permitindo identificar padrões e agrupar amostras. A exploração inicial dos dados na PCA não permitiu discriminar entre os grupos de intervenção e a redução de dimensionalidade nos dois primeiros componentes permitiu explicar apenas 24% da variância (Figura 11 painel A). Por outro lado, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), uma análise supervisionada, permitiu discriminar o grupo de animais após 24 h da injeção de veneno no músculo gastrocnêmio com base no perfil de abundância de proteínas no baço (Figura 11 painel B). Os demais grupos não foram discriminados de maneira efetiva. Combinando os dois primeiros componentes da PLS-DA foi possível explicar 23% da variância total. Juntos, esses resultados sugerem que as alterações no proteoma do baço como consequência do envenenamento são mais evidentes após 24 h da injeção de veneno de *B. jararaca* no músculo gastrocnêmio. Assim, optamos por aprofundar as análises centradas nos efeitos do envenenamento sobre o baço de animais 24 h após a injeção do veneno de *B. jararaca*.

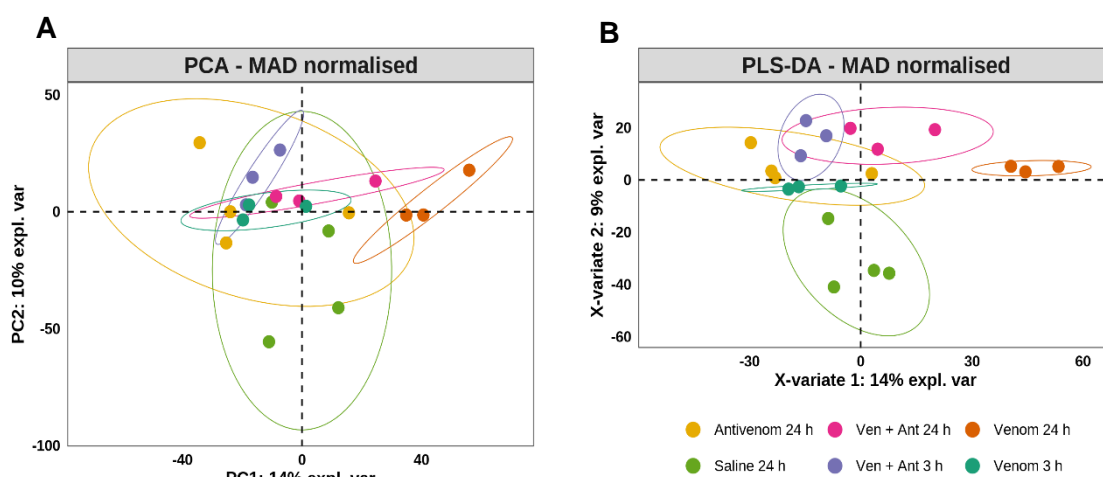


Figura 11. (A) PCA (*Principal Component Analysis*). As elipses representam os intervalos de confiança 95%. **(B)** PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) das amostras coloridas por condição. Cada ponto representa uma amostra biológica, colorida de acordo com os grupos de tratamento.

Embora existam diversas ferramentas estatísticas para modelagem de dados de abundância diferencial, optou-se por utilizar limma no presente estudo, dado o ganho em sensibilidade para detectar diferenças de abundância. O modelo limma foi inicialmente desenvolvido para análise de expressão gênica em experimentos de microarrays pela capacidade de empregar modelos lineares para quantificar e comparar a expressão gênica entre diferentes condições (Smyth et al., 2023). Com esta ferramenta foi possível criar um

modelo linear para fazer comparações entre os grupos de tratamento do estudo em termos de abundância de proteínas (Figura 12). Animais que receberam injeção de veneno de *B. jararaca* apresentaram maior número de proteínas com abundância significativamente aumentada (51 proteínas) após 24 h da injeção em relação ao grupo que recebeu apenas injeção de NaCl 150 mM. Por outro lado, animais que receberam injeção de veneno seguida da administração de antiveneno pentavalente apresentaram 18 proteínas com abundância diferencial aumentada após 24 h. A administração do antiveneno nos grupos injetados com veneno reduziu o número de proteínas com abundância diferencial em geral, com um impacto maior sobre o número de proteínas com abundância diminuída 24 h após injeção do veneno. O mesmo não foi observado nos grupos após 3 h do envenenamento, uma vez que a injeção de antiveneno elevou o número de proteínas com abundância aumentada ou reduzida significativamente em relação ao controle.

Racionalizamos que uma avaliação do efeito do antiveneno poderia ser realizada comparando os grupos de animais injetados com veneno de *B. jararaca* que receberam administração de antiveneno ou NaCl 150 mM 1 h depois (grupo veneno 24h vs veneno + antiveneno 24 h). As proteínas com abundância aumentada (35 proteínas) caracterizam o efeito do veneno, independente da administração de antiveneno neste contexto. Além disso, verificou-se que o efeito do veneno sobre o tecido esplênico é maior após 24 h de envenenamento, uma vez que após 3 h da injeção de veneno foi encontrado número menor de proteínas com abundância diferencial significativa (Figura 12).

Os volcano plots apresentam proteínas com $\log_2(\text{fold change})$ aumentado no grupo de animais que receberam injeção de antiveneno seguida de salina. Algumas proteínas encontradas com tamanho de efeito aumentado neste grupo possuem atividade imuno moduladora como Prg3, cuja atividade está relacionada com a produção de superóxido pelos neutrófilos e a liberação de IL-8, além da liberação de histamina e leucotrieno por basófilos (UniProt, 2025). A proteína com abundância reduzida de maior $\log_2\text{FC}$ neste grupo foi Ddx59, uma helicase envolvida no metabolismo de RNA (You, 2017).

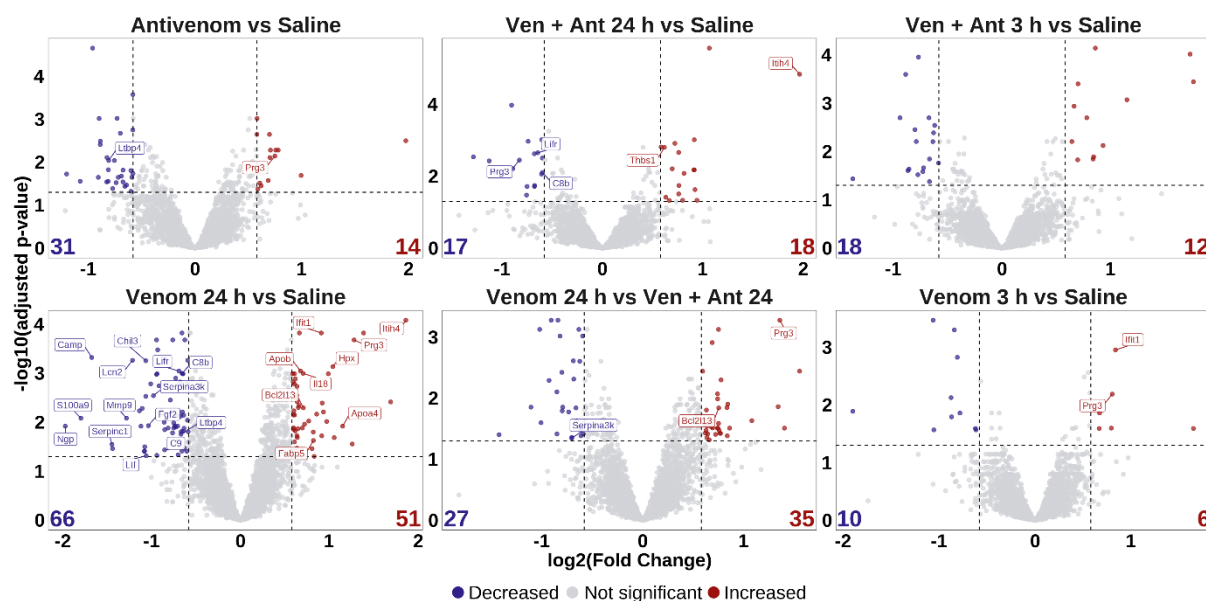


Figura 12. Paine de volcano plots mostrando a abundância diferencial de proteínas em cada grupo de tratamento em relação ao grupo controle (salina). Eixo-Y representa $-\log_{10}$ do p-valor ajustado para múltiplas comparações, Eixo-X mostra \log_2 do *fold change* (FC). Proteínas marcadas em vermelho e azul têm abundância diferencial significativamente aumentada ou diminuída, respectivamente. Em cinza estão as proteínas cujas diferenças não foram estatisticamente significantes com base nos critérios estabelecidos. O número total de proteínas diferencialmente aumentadas ou diminuídas está indicado na base de cada volcano plot. As linhas tracejadas marcam os cortes para $\log_2(\text{FC}) > |0.58|$ e p-valor ajustado < 0.05

A análise da correlação de proteínas com *fold change* aumentado nos grupos envenenados de 24 h revelou proteínas comuns em ambas (6 proteínas) e significativamente aumentadas em cada condição. Nossos dados mostram que mesmo sob administração do antiveneno, existe aumento de abundância de proteínas comuns nos dois grupos, tal como a *Itih4*, que apresenta maior tamanho de efeito entre as proteínas aumentadas em ambos tratamentos (Figura 13 Paine A), cuja função mais recente descrita é a inibição de proteases por meio da formação de complexos não covalentes. A conformação assumida pelo complexo *Itih4* e a protease impede fisicamente que o alvo faça clivagem de substratos maiores, sugerindo que *Itih4* pode atuar como um inibidor de múltiplas proteases (Pihl, 2021). Além disso, *Itih4* também está relacionada com a proliferação celular e migração durante a resposta inflamatória de fase aguda (Ma et al, 2021).

A subunidades do colágeno tipo IV (*Col4a2*) é uma das proteínas que desempenha função de sustentar a membrana basal de células e cujo aumento pode estar relacionado com o remodelamento devido a lesão causada por proteases como metaloproteases do veneno neste contexto (Wuergezhen et al, 2023). Além destas, proteínas pertencentes à

superfamília do citocromo P450, como Cyp1b1 e Cpd, metabolizam e desintoxicam moléculas endógenas e exógenas, embora sua atividade não se limite à desintoxicação (Rimoin et al., 2013). A proteína sulfidril oxidase (Qsox1) é uma enzima da família tiol-dissulfeto oxidorreductase que catalisa a formação de ligações dissulfeto entre proteínas, especialmente aquelas secretadas, cuja ligação é necessária para dobramento, função e estabilidade (Chakravarthi et al., 2007). Esses achados sugerem que a resposta ao envenenamento no baço de animais após 24 h da injeção do veneno envolve múltiplos processos biológicos, possivelmente refletindo consequências de lesão e mecanismos de reparo tecidual.

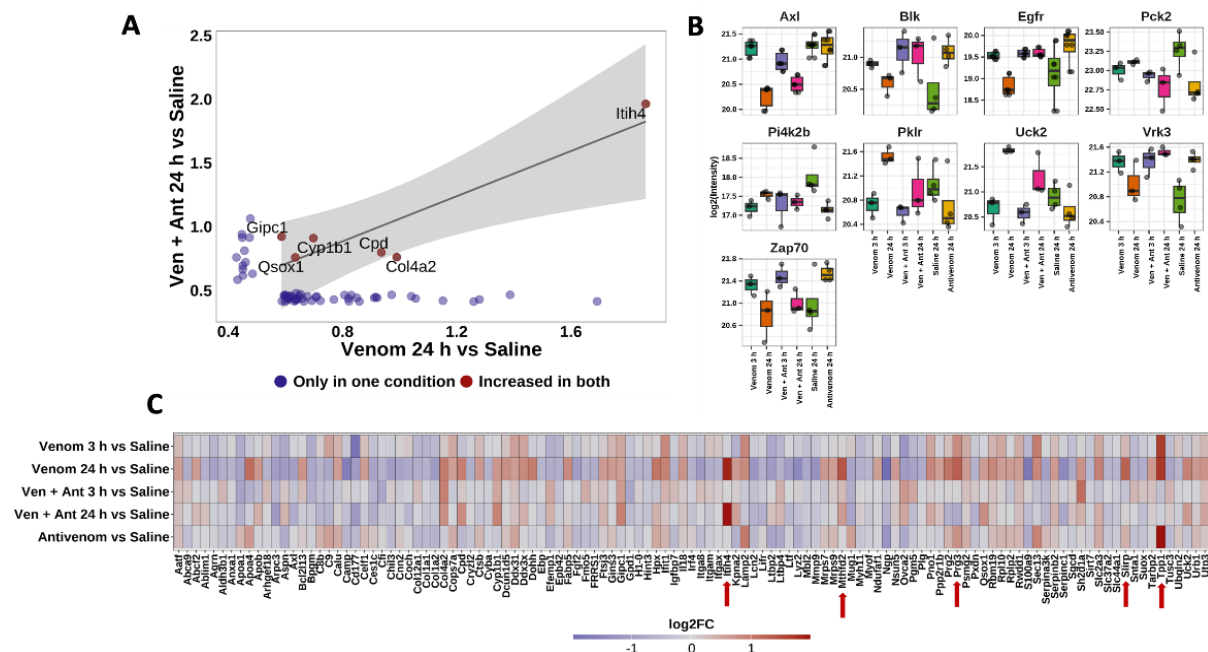


Figura 13. (A) Correlação entre os valores de \log_2FC para proteínas com abundância significativamente aumentada nos grupos “Veneno 24 h vs NaCl” e “Ven + Ant 24 h vs NaCl”. Em vermelho, proteínas que correlacionam positivamente em abundância; em azul proteínas que aumentam em abundância apenas em um dos grupos. **(B)** Boxplots mostrando as proteínas quinases com abundância diferencial significativamente aumentada ou diminuída por grupo. **(C)** Heatmap destacando proteínas com abundância diferencial significativamente aumentada ou diminuída após 24 h da injeção do veneno de *B. jararaca* em relação aos demais grupos. As 117 proteínas estão dispostas no eixo X e os grupos experimentais no eixo Y. A escala divergente de cores representa o \log_2FC de proteínas aumentadas (vermelho) ou diminuídas (azul).

A fim de investigar as vias de sinalização envolvidas na resposta ao veneno de *B. jararaca*, identificamos proteínas quinases com abundância diferencial significativa em todas as condições de estudo (Figura 13 Painel B). Proteínas do tipo quinase catalisam a fosforilação de proteínas, ou seja, a transferência do grupo gama-fosforil do ATP para resíduos de tirosina, serina e treonina em substratos proteicos, o que as torna essenciais na transdução de sinais e ativação de cascatas celulares (Shen et al., 2005; Hosfield, 2008).

Diversos estudos demonstram que o Egfr estimula a ativação do receptor de tirosina quinase Axl por meio de uma heterointeração, no entanto, os mecanismos subjacentes a esta interação ainda não são bem estabelecidos (Vouri et al., 2016). Nos grupos de intervenção descritos neste trabalho, ambas quinases encontram-se com abundância reduzida significativamente nos animais após 24 h da administração de veneno e aumentada nos animais após 3 h do envenenamento. Axl desempenha um papel imuno regulatório, de proliferação celular e sobrevivência, migração celular, e regulação de citocinas inflamatórias. Estudos de camundongos *knockout* Axl revelam que a eficiência de fagocitose de macrófagos e células dendríticas é drasticamente reduzida e Axl pode funcionar como receptor importante no reconhecimento e fagocitose de células mortas. (Lu et al, 2001, Heather et al, 2007, Vouri et al, 2016). Especificamente, a via do Egfr envolve diversos mediadores que levam ao aumento da sobrevivência celular, proliferação, invasão e inibição da apoptose (Nishimura, 2015).

Após 24 h da injeção do veneno, a proteína uridina-citidina quinase (Uck2) aumenta significativamente em abundância. Esta quinase é uma das proteínas mais importantes na via de recuperação de pirimidinas e está relacionada com a proliferação celular. Uck2 interage com Egfr impedindo sua ubiquitinação e subsequente degradação, resultando em maior estabilidade de Egfr e ativação sustentada da via Egf-akt (Cai et al., 2020). Além destas, a piruvato quinase Pklr aparece aumentada em animais após 24 h do envenenamento. Esta enzima catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato com a síntese de ATP e, portanto, desempenha um papel fundamental na formação de precursores metabólicos e na glicólise (Valentine et al., 2002).

Após 24 h da injeção do veneno, as proteínas identificadas com maior magnitude de aumento estão relacionadas com vias de proliferação celular, como Mthfd2 e Prg3, inflamação, como Itih4 (independente de antiveneno), além de vias moduladoras de transcrição gênica como Slirp e proteção dos telômeros, como Tpp1 (Yao, 2016). A proteína com maior magnitude de aumento após 24 h da injeção de veneno é a Itih4, independente da administração do antiveneno (Figura 13 Painel C).

Embora a função de Mthfd2 em condições fisiológicas não seja bem compreendida, a atividade de Mthfd2 parece ser importante em vários processos altamente proliferativos, como embriogênese, hematopoiese, angiogênese e resposta imune (Pardo-Lorente, 2024). Além disso, o Mthfd2 parece contribuir para a função do sistema imunológico. Estudos Ron-

Harel et al. (2016) observaram regulação positiva de Mthfd2 em vias mitocondriais para síntese e armazenamento de fontes de energia como suporte à proliferação e sobrevivência na ativação das células T de defesa. Além disso, o Mthfd2 demonstrou ser induzido em células T ativadas para promover a liberação de citocinas inflamatórias além de suprimir as células T reguladoras anti-inflamatórias (Sugiura, 2022).

Na Figura 14 destacamos potenciais alvos de estudo acerca dos efeitos do envenenamento a nível tecidual esplênico que desempenham funções em vias biológicas com foco em inflamação, imunidade, coagulação, resposta ao estresse, transporte e metabolismo de lipídeos, haja vista que são as vias de destaque de proteínas com abundância diferencial nos grupos de tratamento. Entre as proteínas associadas com inflamação, a proteína Irf4 é encontrada principalmente em células imunes e participa de cascatas regulatórias importantes na imunidade adaptativa, como a maturação de células B e plasmáticas (Lorenz, 2019). Além deste, Ifit1 é identificado, dentre outras funções, como um modulador de genes pró-inflamatórios (John, 2018), cuja abundância foi reduzida em animais tratados com antiveneno após 3 h e 24 h. Além destes, as serpinas Serpina3k e Serpinc1 tiveram abundância diminuída após 24 h. Esta família de proteínas atua em diversos contextos fisiológicos, destacando-se no equilíbrio de trombose e trombólise, inflamação e inibição de proteases (Bouton et al., 2023).

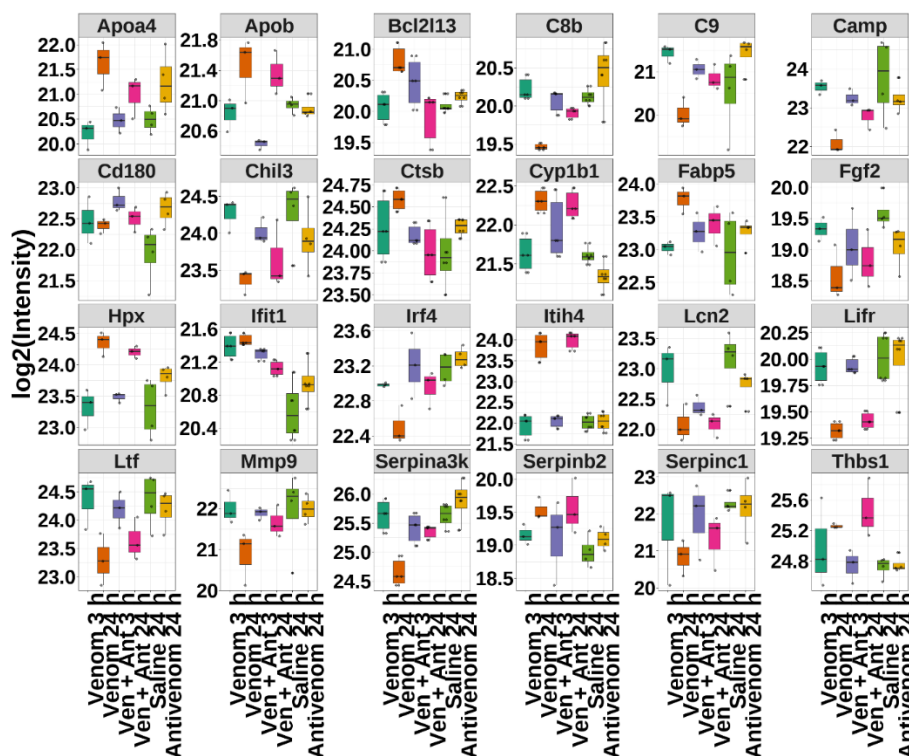


Figura 14. Proteínas encontradas com abundância diferencial significativa entre os grupos experimentais identificadas no *dataset* como alvos de estudo futuros. As intensidades foram distribuídas em boxplots. No eixo Y \log_2 da intensidade das proteínas e no eixo X os grupos experimentais.

Por fim, a análise de enriquecimento de vias realizada no GeneOntology permitiu verificar se as proteínas com abundância diferencial em cada grupo, em comparação ao controle, compartilham características funcionais. Foram avaliadas as categorias de *Componente Celular (Cellular Component)*, *Processo Biológico (Biological Process)* e *Função Molecular (Molecular Function)* nos grupos após 24 horas da injeção do veneno de *B. jararaca*. Nos animais que receberam injeção de veneno e solução salina, observou-se que, após 24 horas, as proteínas com aumento de abundância estavam enriquecidas no componente extracelular (Figura 15, Painel A), sugerindo aumento da secreção de proteínas e/ou vazamento de proteínas intracelulares devido à morte celular. Por outro lado, as proteínas com abundância reduzida estavam associadas a processos biológicos relacionados à resposta a estímulos externos, além de apresentarem depleção nas vias de componente extracelular, matriz de colágeno e constituintes estruturais. Esses achados reforçam a hipótese de que ocorre uma degradação das proteínas da matriz extracelular 24 horas após o envenenamento (Figura 15, Painel B).

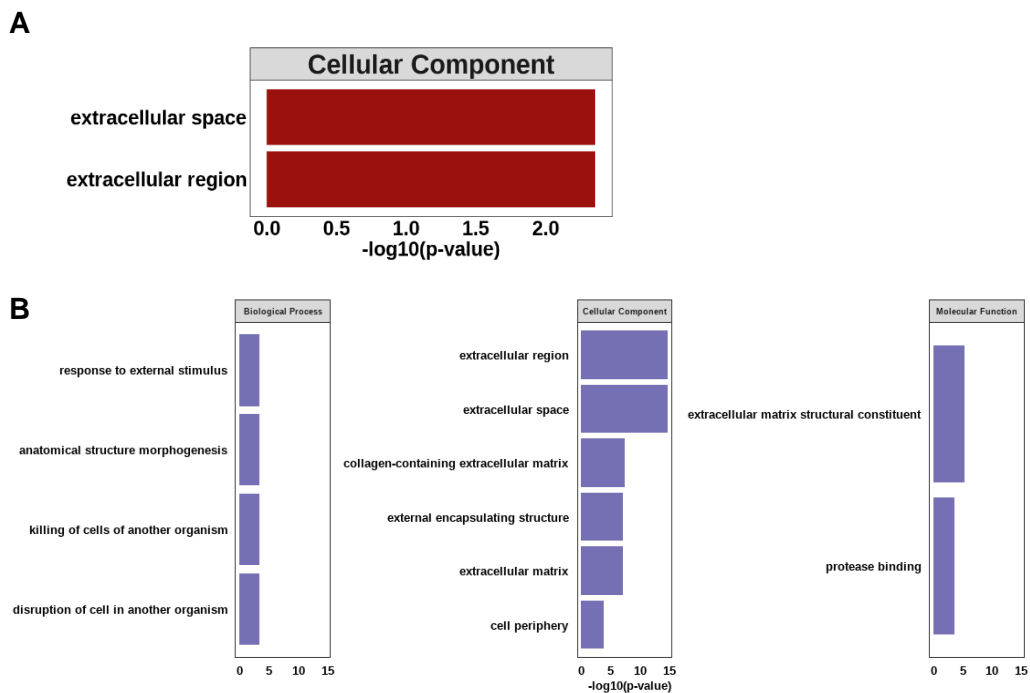


Figura 15. Análise de enriquecimento de vias do grupo Veneno + Salina 24 h. **(A)** Proteínas encontradas com abundância aumentada em relação ao grupo controle enriquecem o fator Componente Celular. **(B)** Proteínas encontradas com abundância reduzida em relação ao

grupo controle enriquecem os fatores Processos Biológicos, Componente Celular e Função Molecular. O eixo Y mostra $-\log_{10}$ do p-valor e o eixo X mostra as vias específicas enriquecidas em cada fator.

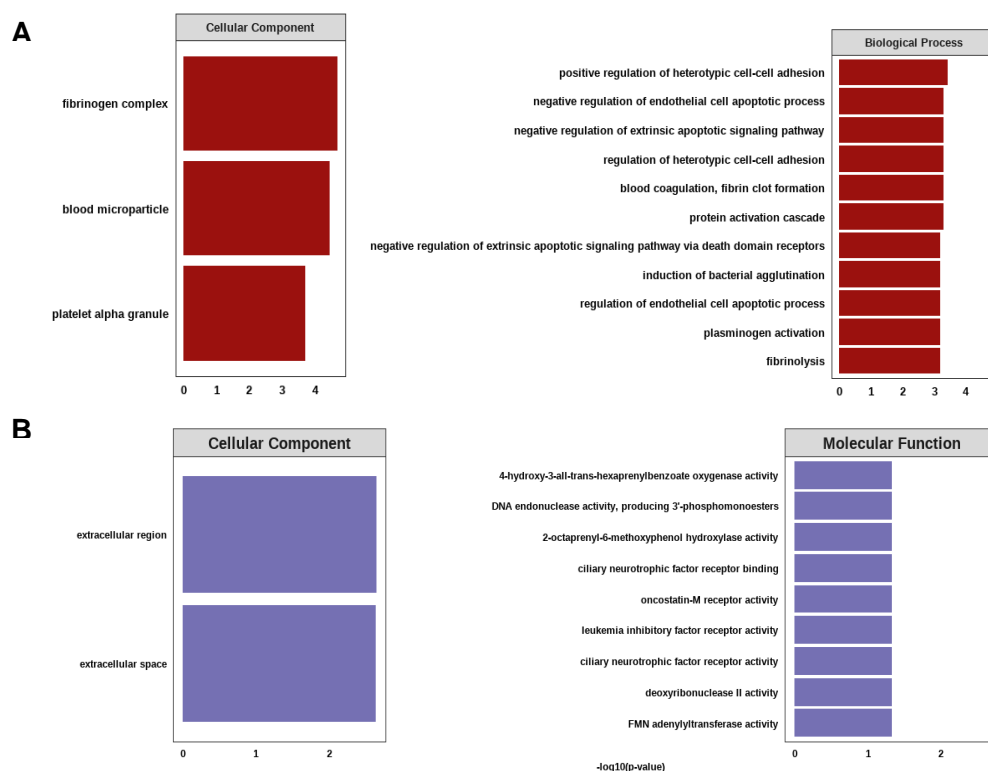


Figura 16. Análise de enriquecimento de vias do grupo Veneno + Antiveneno 24 h. **(A)** Proteínas encontradas com abundância aumentada em relação ao grupo controle enriquecem o fator Componente Celular e Processos Biológicos. **(B)** Proteínas encontradas com abundância reduzida em relação ao grupo controle enriquecem os fatores Componente Celular e Função Molecular.

Paralelamente, a análise de proteínas com abundância significativa em animais que receberam veneno e antiveneno, após 24 h, apontaram o enriquecimento dos componentes celulares complexo de fibrinogênio, micropartículas sanguíneas e grânulos alfa das plaquetas (Figura 16, Painel A). Os processos biológicos enriquecidos estão relacionados à proliferação celular, adesão célula-célula, formação de coágulos. Simultaneamente também foram enriquecidas as vias de fibrinólise e ativação de plasminogênio, cuja ativação em plasmina é responsável por clivar a fibrina em locais específicos para dissolver coágulos (Weisel, 2005). Já na análise de proteínas com abundância diminuída em relação aos animais controle há enriquecimento de proteínas que compartilham o compartimento extracelular como característica, ao passo que as funções moleculares enriquecidas nas proteínas com abundância reduzida incluem atividade oxigenase e hidroxilase, que participam

principalmente de vias de detoxificação e síntese, respectivamente (Figura 16, Painel B). Nesse cenário, com base nas análises de enriquecimento, na ausência do antiveneno o envenenamento leva a um processo de degradação da matriz extracelular, ao passo que quando o antiveneno é administrado ocorre a ativação de vias relacionadas à coagulação e à fibrinólise, apontando para uma tentativa de estabilizar e reparar os danos decorrentes do envenenamento.

5. CONCLUSÃO

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* representa um importante problema de saúde pública, especialmente em regiões tropicais como o Brasil, onde a *Bothrops jararaca* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos. O presente estudo buscou investigar as alterações proteômicas no baço de camundongos submetidos à injeção de veneno de *B. jararaca*, com ou sem administração de antiveneno, avaliadas após 3 e 24 horas da exposição.

Utilizando abordagem de espectrometria de massas em modo Data-Independent Acquisition (DIA), foram identificadas 8.036 proteínas únicas, o que representa uma ampla cobertura do proteoma esplênico murino. A análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante supervisionada (PLS-DA) demonstraram que apenas os grupos avaliados após 24 horas do envenenamento apresentaram discriminação clara em relação aos outros grupos experimentais, o que reforça a hipótese de que os efeitos sistêmicos do veneno são mais pronunciados após 24 h da injeção, caracterizados por um aumento significativo na abundância de proteínas envolvidas em processos inflamatórios, estresse oxidativo, remodelamento tecidual e proliferação celular.

A administração de antiveneno teve efeito na redução do número total de proteínas diferencialmente abundantes, sugerindo uma atenuação parcial dos efeitos do veneno no baço. No entanto, mesmo após o tratamento, algumas proteínas associadas à inflamação, como *Itih4* e *Mthfd2*, mantiveram-se com abundância aumentada, indicando que o antiveneno, embora eficaz em neutralizar toxinas circulantes, não é capaz de reverter completamente as alterações teciduais já iniciadas, especialmente aquelas mediadas por vias de inflamação e resposta imune. A identificação de proteínas quinases, citocinas e outras enzimas reguladoras também indica que múltiplas vias de sinalização são ativadas como resposta ao envenenamento, incluindo a via *Egfr-akt* e a ativação de receptores envolvidos em proliferação celular, metabolismo e apoptose.

A partir dos dados obtidos deste estudo conclui-se que o baço é um órgão responsivo frente à complexa mistura de toxinas que compõem o veneno de *B. jararaca*, evidenciado

pela resposta proteômica como consequência da intervenção especialmente em vias inflamatórias, de ativação imunológica e reparo tecidual.

Dessa forma, esperou-se contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no envenenamento sistêmico por *B. jararaca* a fim de interpretar os mecanismos fisiopatológicos e destacar a importância de integrar abordagens ômicas ao estudo de acidentes ofídicos. Os achados aqui apresentados oferecem uma base para futuras investigações sobre biomarcadores de lesão tecidual e potenciais alvos terapêuticos, com o objetivo de aprimorar os tratamentos disponíveis, reduzir as complicações decorrentes do envenenamento e melhorar a qualidade de vida das pessoas afetadas pelos acidentes ofídicos.

6. ASPECTOS ÉTICOS

Todos os materiais de origem animal são oriundos de experimentos previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto Butantan (CEUA IB 9991131219).

7. REFERÊNCIAS

1. Aebersold, R., & Mann, M. (2016). **Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function.** *Nature*, 537(7620), 347-355.
2. Ainsworth S, Slagboom J, Alomran N, Pla D, Alhamdi Y, King SI, et al. **A neutralização paraespecífica da coagulopatia induzida por veneno de cobra por antivenenos.** *Commun Biol.* 2018;1:34. Epub 2018/10/03. pmid:30271920; PubMed Central PMCID: PMC6123674.
3. Albuquerque PLMM, N. Jacinto C, Silva Junior GB, Lima JB, Veras M do SB, Daher EF. **Acute kidney injury caused by Crotalus and Bothrops snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment.** *Rev Inst Med Trop São Paulo.* setembro de 2013;55(5):295-301.
4. Alves EC, de Almeida Gonçalves Sachett J, Sampaio VS, Sousa JDB, Oliveira SS, Nascimento EF et al. **Predicting acute renal failure in Bothrops snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon.** 2018. Disponível em: [https:// journals.plos.org](https://journals.plos.org).
5. Andreas Tholey, Alexander Becker, **Top-down proteomics for the analysis of proteolytic events - Methods, applications and perspectives, Biochimica et**

- Biophysica Acta (BBA)** - Molecular Cell Research, Volume 1864, Issue 11, Part B, 2017, Pages 2191-2199, ISSN 0167-4889.
6. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2016). **Proteomics: Technologies and Their Applications. Journal of Chromatographic Science**, 55(2), 182–196. doi:10.1093/chromsci/bmw167.
 7. Aslam, Bilal et al. **Proteomics: technologies and their applications.** Journal of chromatographic science, p. 1-15, 2016.
 8. B.M. Bolstad, R.A. Irizarry, M. Åstrand, T.P. Speed, **A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias**, *Bioinformatics*, Volume 19, Issue 2, January 2003, Pages 185–193.
 9. Barraviera B, Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA, Meira DA. **Reações de fase aguda incluindo citocinas em pacientes picados por cobras *Bothrops* e *Crotalus* no Brasil.** *Toxinas J Venom Anim.* 1995;1(1):11-22.
 10. Bochner RS, Struchiner CJ. **Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão.** *Cad Saúde Pública.* 2003; 19(1):7-1.
 11. Boletim Epidemiológico- Ministério da Saúde, Volume 55, 8 de outubro de 2024. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-15.pdf/view>.
 12. Braga, Marcus Davis Machado et al. **Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom.** *Toxicon*, v. 51, n. 2, p. 199-207, 2008.
 13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. **Acidente ofídico.** Em: de Medeiros AC, organizador. *Guia de Vigilância em Saúde.* Brasília: Editora MS; 2021. p. 1019-24.
 14. Cai J, Sun X, Guo H, et al. **Non-metabolic role of UCK2 links EGFR-AKT pathway activation to metastasis enhancement in hepatocellular carcinoma.** *Oncogenesis.* 2020;9(12):103. Published 2020 Dec 4.
 15. Cardoso DFP. **Produção de soro antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular.** In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V, editors.
 16. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier/FAPESP; 2003.
 17. Chakravarthi S, Jessop CE, Willer M, Stirling CJ, Bulleid NJ. **Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1.** *Biochem*

- J. 2007 Jun 15;404(3):403-11. doi: 10.1042/BJ20061510. PMID: 17331072; PMCID: PMC1896280.
18. Chippaux, Jean-Philippe. **Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!**. Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases, v. 23, p. 38, 2017.
 19. Cidade, DA., Simão, TA., Dávila, AM., Wagner, G., Junqueira-de-Azevedo, IL., Ho, PL., Bon, C., Zingali, RB., Albano, RM. (2006) **Bothrops jararaca venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern**. Toxicon. 48, 437-61.
 20. Comitê de Peritos da OMS sobre Padronização Biológica, sexagésimo sétimo relatório (série de relatórios técnicos da OMS; n.º 1004) Organização Mundial da Saúde, Genebra, 2017.
 21. Cotran R.S., Kumar V. & Collins T. 2000. **Robbins' Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
 22. Dayhoff, M.O., & Ledley, R.S. **Comproteins: a computer program to aid primary protein structure determination**. AFIPS, 1962.
 23. de Silva HA, Ryan NM, de Silva HJ. **Reações adversas ao antiveneno de cobra e sua prevenção e tratamento**. Br J Clin Pharmacol. 2016;81(3):446–52. Epub 2015/08/11. pmid:26256124; PubMed Central PMCID: PMC4767202.
 24. Demichev, V. , Messner, CB , Vernardis, SI , Lilley, KS , & Ralser, M. (2020). **DIA-NN: Redes neurais e correção de interferência permitem cobertura profunda de proteoma em alto rendimento**. Nature Methods.
 25. Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). **Mass spectrometry-based metabolomics**. *Mass spectrometry reviews*, 26(1), 51-78.
 26. Elaine Moio da Cunha; Otávio Augusto Martins. **Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros Bothrops e Crotalus- uma revisão**. Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC) – ISSN 2237-3462 - Volume 02 – Número 02 – 2012.
 27. Eldjarn, Grimur Hjorleifsson et al. **Large-scale plasma proteomics comparisons through genetics and disease associations**. Nature, v. 622, n. 7982, p. 348-358, 2023.
 28. Farsky SH, Gonçalves LR, Gutiérrez JM, Correa AP, Rucavado A, Gasque P, Tambourgi DV. **Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. Mediators Inflamm**. 2000;9(5):213-21. doi: 10.1080/09629350020025728. PMID: 11200361; PMCID: PMC1781770.

29. Farsky SH, Walber J, Costa-Cruz M, Cury Y, Teixeira CF. **Leukocyte response induced by Bothrops jararaca crude venom: in vivo and in vitro studies.** *Toxicon*. 1997 Feb;35(2):185-93. doi: 10.1016/s0041-0101(96)00135-3. Erratum in: *Toxicon*. 2004 Nov;44(6):687. Curry, Yara PMID: 9080575.
30. Karla Ballman; Diane Grill; Ann Oberg; Terry Therneau. **Faster cyclic loess: normalizing DNA arrays via linear models.** Mayo Foundation. November 2004
31. Ferreira, Cláudia Natália et al. **O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações.** *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, v. 32, p. 416-421, 2010.
32. Fox, Jay W, Serrano SM. **Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity.** *FEBS J*. 2008 Jun;275(12):3016-30. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x. Epub 2008 May 8. PMID: 18479462.
33. Fox, Jay W.; Serrano, Solange MT. **Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures.** *Proteomics*, v. 8, n. 4, p. 909-920, 2008.
34. França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. **Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier; 2009. p. 81-95.
35. Gold, Larry et al. **Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery.** *Nature Precedings*, p. 1-1, 2010.
36. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. **Snakebite envenoming.** *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Sep 14;3:17063. doi: 10.1038/nrdp.2017.63. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Oct 05;3:17079. doi: 10.1038/nrdp.2017.79. PMID: 28905944.
37. Gutierrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T. e Diaz, C. **Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage.** *Toxicon*, 2005. 45, 997-1011.
38. Han, X., Aslanian, A., Yates, JR, **Espectrometria de massa para proteômica.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008, 12, 483 – 490.
39. Harrison RA, Oluoch GO, Ainsworth S, Alsolaiss J, Bolton F, Arias AS, et al. **Testes pré-clínicos de eficácia antiveneno revelam deficiências potencialmente perturbadoras da capacidade de tratamento de picadas de cobra na África Oriental.** *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(10):e0005969. Epub 2017/10/19. pmid:29045429; PubMed Central PMCID: PMC5646754.
40. Heather M. Seitz, Todd D. Camenisch, Greg Lemke, H. Shelton Earp, Glenn K. Matsushima; **Macrófagos e células dendríticas utilizam diferentes receptores**

- Axl/Mertk/Tyro3 na eliminação de células apoptóticas.** J Immunol 1 de maio de 2007; 178 (9): 5635–5642.
41. Hosfield, D. J.; MOL, C. D. **Targeting inactive kinases: Structure as a foundation for cancer drug discovery.** Cancer Drug Design and Discovery, p. 229-252, 2008.
 42. John SP, Sun J, Carlson RJ, Cao B, Bradfield CJ, Song J, Smelkinson M, Fraser IDC. **IFIT1 Exerts Opposing Regulatory Effects on the Inflammatory and Interferon Gene Programs in LPS-Activated Human Macrophages.** Cell Rep. 2018 Oct 2;25(1):95-106.e6.
 43. John W. Weisel, Fibrinogen and Fibrin. **Advances in Protein Chemistry**, Academic Press, Volume 70, 2005, Pages 247-299.
 44. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Histologia Básica – texto e atlas.** 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
 45. Kapizova Dilafruz Rahmonjonovna. **Spleen histostructure, function and formation: Medical science.** Ethiopian International Journal of Multidisciplinary Research, [S. l.], v. 10, n.08, p. 86–93, 2023. Disponível em: <https://www.eijmr.org/index.php/eijmr/article/view/43>. Acesso em: 23 jan. 2025.
 46. Leonel, Thyago Bispo. **Papel do sistema complemento na inflamação induzida pelo veneno da serpente Bothrops jararaca.** 2022. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2022.
 47. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. **Structure and function of the immune system in the spleen.** Sci Immunol. 2019 Mar 1;4(33):eaau6085. doi: 10.1126/sciimmunol.aau6085. PMID: 30824527; PMCID: PMC6495537.
 48. Lorenz, Georg et al. **O fator regulador 4 do IFN controla a inflamação pós-isquêmica e previne a doença renal crônica.** Frontiers in Immunology , v. 10, p. 2162, 2019.
 49. Lou, Ronghui; SHUI, Wenqing. **Acquisition and analysis of DIA-based proteomic data: A comprehensive survey in 2023.** Molecular & Cellular Proteomics, v. 23, n. 2, 2024.
 50. Lu, Qingxian; LEMKE, Greg. **Regulação homeostática do sistema imunológico por receptores tirosina quinases da família Tyro 3.** Science, v. 293, n. 5528, p. 306-311, 2001.
 51. Luchini LSG, Pidde G, Squaiella-Baptistão CC, Tambourgi DV. **Complement System Inhibition Modulates the Pro-Inflammatory Effects of a Snake Venom Metalloproteinase.** Front Immunol. 2019 May 22;10:1137. doi: 10.3389/fimmu.2019.01137. Erratum in: Front Immunol. 2019 Jul 03;10:1539. doi: 10.3389/fimmu.2019.01539. PMID: 31231362; PMCID: PMC6558526.

52. Luna KP, Xavier EM, Pascoal VP, Martins-Filho AO, Pereira VR. **Humoral immune response of patients bitten by the snake Bothrops erythromelas** Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(6):731-2.
53. Luna, K., Silva, M. d., & Pereira, V. (2011). **Clinical and immunological aspects of envenomations by Bothrops snakes. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 17(2), 130.
54. Luna, Karla PO et al. Bothrops erythromelas snake venom induces a proinflammatory response in mice splenocytes. International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research, p. 9-18, 2011.
55. Ma, Yating et al. **ITIH4, as an inflammation biomarker, mainly increases in bacterial bloodstream infection.** Cytokine, v. 138, p. 155377, 2021.
56. Machado, Claudio et al. **Acidentes ofídicos no Brasil: da assistência no município do Rio de Janeiro ao controle da saúde animal em instituto produtor de soro antiofídico.** 2018. Tese de Doutorado.
57. **Manual do usuário do Olink Explore 1536.** Disponível em <https://www.olink.com/content/uploads/2021/12/olink-explore-1536-expansion-user-manual-1.pdf> (Olink Proteomics, 2021).
58. Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., Jackson, G. S., **Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer.** Mass Spectrom. Rev. 1998, 17, 1–35.
59. Marta O. Domingos, J.L. Cardoso, Ana M. Moura da Silva, I. Mota, Melgarejo AR. **Serpentes peçonhentas do Brasil. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** Cardoso JLC, França FO de S, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr., Eds. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 42-70.
60. Messner, C. B., Demichev, V., Wang, Z., Hartl, J., Kustatscher, G., Mülleder, M., & Ralser, M. (2023). **Mass spectrometry-based high-throughput proteomics and its role in biomedical studies and systems biology.** Proteomics, 23(7-8), 2200013.
61. Minghui R, Malecela MN, Cooke E, Abela-Ridder B. WHO's **Snakebite Envenoming Strategy for prevention and control.** Lancet Glob Health. 2019 Jul;7(7):e837-e838.
62. Ministério da saúde (BR). Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância em saúde.**2017.
63. Morita T. **C-type lectin-related proteins from snake venoms.** Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord. 2004;4:357-73.
64. Nathalia Silva de Souza. **Venenos e toxinas de serpentes do gênero Bothrops com ação na resposta inflamatória: implicações no tratamento de reações locais.** Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan. São Paulo, 2023.

65. Nishimura, Yukio et al. **A ativação de AKT estimulada por EGF é mediada pela reciclagem de EGFR por meio de uma via endocítica precoce em uma linhagem de células de câncer de pulmão humano resistente a gefitinib.** International journal of oncology, v. 46, n. 4, p. 1721-1729, 2015.
66. Ohsaka, A., **Fractionation of Habu snake venom by chromatography on cm-cellulose with special reference to biological activities.** Jpn. J. Med. Sci. Biol. 1960, 13, 199–205.
67. Pardo-Lorente, N., Sdelci, S. **MTHFD2 em células saudáveis e cancerosas: funções canônicas e não canônicas.** npj Metab Health Dis 2, 3 (2024).
68. Pihl, Rasmus et al. **ITIH4 acts as a protease inhibitor by a novel inhibitory mechanism.** Science advances, v. 7, n. 2, p. eaba7381, 2021.
69. Rezaee F, Rellick SL, Piedimonte G, et al. **Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway.** PLoS ONE. 2010;5(3):e9690.
70. Rimoin, D.L. & Pyeritz, R.E. & Korf, B. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. 2013.
71. Robitaille, Aaron M. et al. **Improved identification, quantification accuracy, and workflow efficiency using a modified quadrupole Orbitrap mass spectrometer and tandem mass tags (TMT) approach.** Thermo Fisher Scientific. Disponível em: <https://www.thermofisher.com>. Acesso em: 11 maio 2025.
72. Ron-Harel N, Santos D, Ghergurovich JM, Sage PT, Reddy A, Lovitch SB, Dephoure N, Satterstrom FK, Sheffer M, Spinelli JB, Gygi S, Rabinowitz JD, Sharpe AH, Haigis MC. **Mitochondrial Biogenesis and Proteome Remodeling Promote One-Carbon Metabolism for T Cell Activation.** Cell Metab. 2016 Jul 12;24(1):104-17. doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.007. PMID: 27411012; PMCID: PMC5330619.
73. Rozanova, Svitlana et al. **Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview. Quantitative methods in proteomics,** p. 85-116, 2021.
74. Santos MFL, Paulo F, Rocha N. **Acute kidney injury in Bothrops sp. and Crotalus sp. envenomation: critical review of the literature.** 2009;31(2):128-35.
75. Savaryn, John P.; Toby, Timothy K.; Kelleher, Neil L. **A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics.** Proteomics, v. 16, n. 18, p. 2435-2443, 2016.
76. Schubert, OT , Röst, HL , Collins, BC , Rosenberger, G. , & Aebersold, R. (2017). **Proteômica quantitativa: desafios e oportunidades em pesquisa básica e aplicada.** Nature Protocols , 12 , 1289 – 1294.
77. Serrano, S.M.T., Shannon, J.D., Wang, D., Camargo, A.C.M. e Fox, J.W. (2005) **A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel**


- electrophoresis:** An approach to understanding venom proteomics. *Proteomics*. 5, 501-510.
78. Serrano, Solange MT et al. **A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake Bothrops jararaca: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor.** *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 367, n. 1, p. 26-32, 1999.
 79. Shen K, Hines AC, Schwarzer D, Pickin KA, Cole PA. **Protein kinase structure and function analysis with chemical tools.** *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 30;1754(1-2):65-78. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.08.020. Epub 2005 Sep 13. PMID: 16213197.
 80. SINAN Sistema de Informação de Agravos de Notificação <https://portalsinan.saude.gov.br/>.
 81. Slagboom, Julien et al. **High throughput screening and identification of coagulopathic snake venom proteins and peptides using nanofractionation and proteomics approaches.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 14, n. 4, p. e0007802, 2020.
 82. Slagboom, Julien et al. **High throughput screening and identification of coagulopathic snake venom proteins and peptides using nanofractionation and proteomics approaches.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 14, n. 4, p. e0007802, 2020.
 83. Smyth, G. K., Ritchie, M., Thorne, N., Wettenhall, J., Shi, W., & Hu, Y. (2023). **Linear Models for Microarray and RNA-Seq Data: User's Guide.** Bioinformatics Division, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research. Última revisão em 22 de abril de 2023.
 84. SomaLogic. SomaScan® Assay v4.1. (SomaLogic, 2021).
 85. Souza LA, Silva AD, Chavaglia SRR, Dutra CM, Ferreira LA. **Profile of snakebite victims reported in a public teaching hospital: a cross-sectional study.** *Rev Esc Enferm USP*. 2021;55:e03721. doi: <https://doi.org/10.1590/S1980-220X2020007003721>.
 86. Souza, Nathália Silva de. **Venenos e toxinas de serpentes do gênero Bothrops com ação na resposta inflamatória: implicações no tratamento de reações locais.** 2023. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.
 87. Steen, H., Mann, M. **The abc's (and xyz's) of peptide sequencing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 699–711 (2004).
 88. Strobl C, Malley J, Tutz G. **An introduction to recursive partitioning: rationale, application, and characteristics of classification and regression trees, bagging,**

- and random forests.** Psychol Methods. 2009 Dec;14(4):323-48. doi: 10.1037/a0016973. PMID: 19968396; PMCID: PMC2927982.
89. Sugiura, Ayaka, et al. **"MTHFD2 é um ponto de verificação metabólico que controla o destino e a função das células T efectoras e reguladoras."** Immunity 55.1 (2022): 65-81.
 90. Tasoulis, T.; Isbister, G.K. **A Review and Database of Snake Venom Proteomes.** Toxins 2017, 9, 290. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>.
 91. UNIPROT. **PRG3 proteoglycan 3 [Homo sapiens].** Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9BYW3>. Acesso em: 19 maio 2025.
 92. Domingos MO, Cardoso JL, da Silva AM, Mota I. **The humoral immune responses of patients bitten by the snake Bothrops jararaca (jararaca).** Toxicon. 1990;28(6):723-6. doi: 10.1016/0041-0101(90)90262-6. PMID: 2402767. Valentini, G., Chiarelli, L. R., Fortin, R., Speranza, M. L., Galizzi, A., & Mattevi, A. (2002). The allosteric regulation of pyruvate kinase. Journal of Biological Chemistry, 277(8), 6441–6448. Volume 1754, Issues 1–2, 2005, Pages 65-78.
 93. Vouri M, Croucher DR, Kennedy SP, An Q, Pilkington GJ, Hafizi S. **Axl-EGFR receptor tyrosine kinase hetero-interaction provides EGFR with access to pro-invasive signalling in cancer cells.** Oncogenesis. 2016 Oct 24;5(10):e266. doi: 10.1038/oncsis.2016.66. PMID: 27775700; PMCID: PMC5117851.
 94. Warrell DA. **Snake bite.** Lancet. 2010 Jan 2;375(9708):77-88. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61754-2. Erratum in: Lancet. 2010 Feb 20;375(9715):640. PMID: 20109866.
 95. Wik, L. et al. **Ensaio de extensão de proximidade em combinação com sequenciamento de próxima geração para análise de proteoma de alto rendimento.** Mol. Cell. Proteomics 20, 100168 (2021).
 96. World health organization. **Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control.** Geneva: WHO, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515641>. Acesso em: 16 maio 2025.
 97. World Health Organization. **Snakebite envenoming.** 2023. Disponível em: <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.
 98. Wuergezhen, D., Gindroz, E., Morita, R., Hashimoto, K., Abe, T., Kiyonari, H., & Fujiwara, H. (2023). **Col4a2-eGFP mouse model reveals the molecular and functional dynamics of basement membrane remodelling in hair follicle morphogenesis.** bioRxiv.
 99. Yamashita, Karine Miki. **Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente Bothrops jararaca.** 2013. Dissertação (Mestrado em Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia)

- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/D.5.2013.tde-20052013-144341. Acesso em: 2025-01-15.
100. Yao L, Guo X. **Advance in research on the function of telomeric shelterin component TPP1 and its relationship with characteristics of tumors.** Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2016 Aug;33(4):573-7.
101. You, J., Wang, X., Wang, J. *et al.* **DDX59 promove a replicação do DNA em adenocarcinoma de pulmão.** *Cell Death Discover.* 3, 16095 (2017).
102. Zhang, Yaoyang *et al.* **Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics.** Chemical reviews, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013.
103. Zubair, Muhammad *et al.* **Proteomics approaches: A review regarding an importance of proteome analyses in understanding the pathogens and diseases.** Frontiers in Veterinary Science, v. 9, p. 1079359, 2022.

Victoria Dalatorre 21/05/2025

Data e assinatura da aluna

Documento assinado digitalmente
 **ALISON FELIPE ALENCAR CHAVES**
Data: 21/05/2025 11:41:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Data e assinatura do orientador

8. APÊNDICE

Apêndice A- Tabela estatística

A tabela adaptada utilizada para as análises estatísticas deste trabalho - contendo informações como genes, contrastes, significância, nomes e famílias das proteínas que compõem o *dataset* – encontra-se disponível no link a seguir:

https://drive.google.com/file/d/1JtuTlvKQCQBdlw2_ram1iHoMEmjG9eN-/view?usp=sharing