

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*:
análise de variações individuais**

Isadora Sousa de Oliveira

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*:
análise de variações individuais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Isadora Sousa de Oliveira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Candiani Arantes

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 27/10/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

ERRATA

OLIVEIRA, I. S. **Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*: análise de variações individuais**. 2016. 126f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Folha Linha
41 21

Onde se lê:

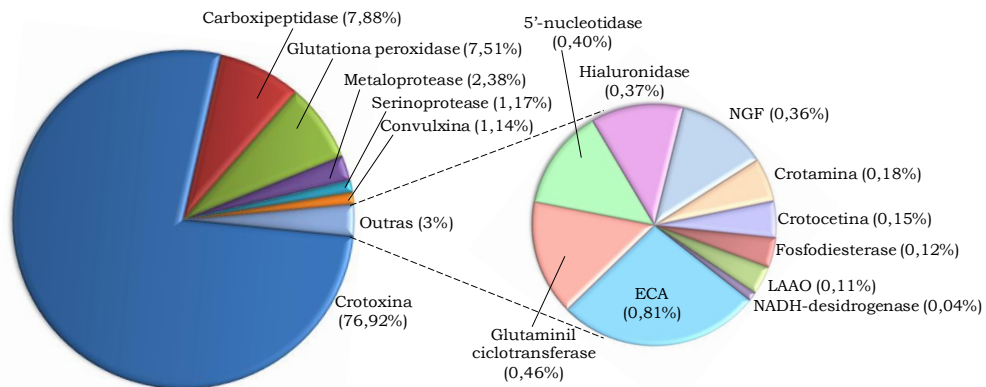


Figura 5. Perfil proteômico quantitativo do pool de peçonhas de *C. d. collilineatus*. Os gráficos apresentam a abundância relativa de cada família proteica obtidas através da técnica de LC-MS ou *Shotgun Proteomic* do pool das 22 peçonhas de *C. d. collilineatus*. NGF: Fator de crescimento neural; LAAO: L-aminoácido oxidase; ECA: Enzima conversora de angiotensina.

Leia-se:

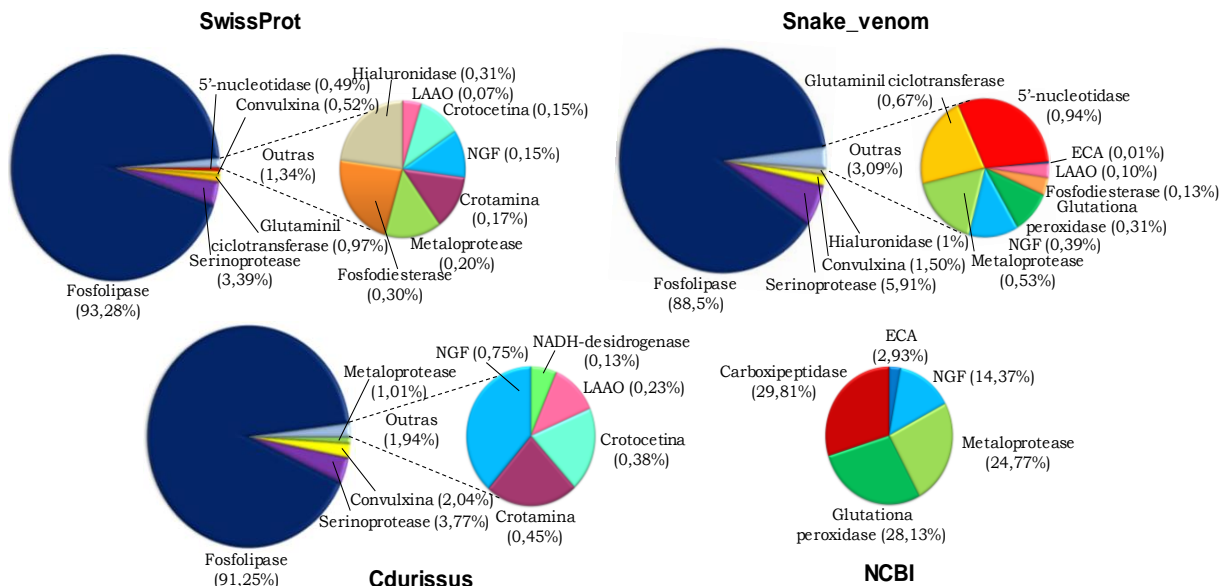


Figura 5. Perfil proteômico quantitativo do pool de peçonhas de *C. d. collilineatus*. Os gráficos apresentam a abundância relativa de cada família proteica obtidas através da técnica de LC-MS ou *Shotgun Proteomic* do pool das 22 peçonhas de *C. d. collilineatus*, através de *spectra counting* e o algoritmo de emPAI em cada um dos bancos de dados utilizados, SwissProt, Snake_venom, Cdurissus e NCBI. Os bancos de dados Snake_venom e Cdurissus foram gerados a partir do UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) de seqüências proteicas encontradas em peçonhas de outras serpentes e de *Crotalus durissus*, respectivamente. NGF: Fator de crescimento neural; LAAO: L-aminoácido oxidase; ECA: Enzima conversora de angiotensina.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Isadora Sousa de Oliveira

Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*:
análise de variações individuais, 2016.

126 p. : il., fig., graf., tab.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani

1. *Crotalus durissus collilineatus*. 2. Peçonha de serpentes. 3. Proteoma.
4. Venômica. 5. Variações individuais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isadora Sousa de Oliveira

Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*: análise de variações individuais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho é dedicado para meus queridos pais,
Ademir e Célia,
pelo exemplo, amor, carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me conceder grandes oportunidades e colocar pessoas em meu caminho que me ajudaram de alguma forma.

A minha amada família, meus queridos pais, Ademir e Célia, pelo amor imenso e incondicional, educação, compreensão e paciência que formaram meu caráter e, à minha irmã, Evelise, pelo companheirismo e paciência infindáveis. Vocês são o alicerce da minha vida! Amo vocês!

Ao meu querido Rafael. Meu companheiro em todos os momentos, meu amigo, meu amor. Dono de uma enorme paciência. Obrigada por estar comigo quando eu mais precisei. Espero poder retribuir tudo o que faz por mim. Te amo!

Aos meus amados familiares que tanto contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

À minha orientadora, Prof^a Eliane Candiani Arantes, por ter me dado a oportunidade de sua orientação. Durante esses 3 anos que estive no Laboratório de Toxinas Animais, a senhora me ensinou todos os dias que não devemos perder o otimismo e a fé de que tudo pode dar certo um dia. Sou grata por todas as oportunidades que a senhora me ofereceu e por toda bondade e paciência que tem. Não só uma orientadora, a senhora também é uma grande mãe. Uma mãe para todos seus alunos. Muito obrigada!

À Prof^a. Suelly Vilela pela colaboração, concessão das peçonhas utilizadas neste trabalho e, também, por estar sempre disposta em ajudar.

Aos técnicos do Laboratório de Toxinologia, Sante Carone, pela colaboração, e Luiz Fernando Tussi, por toda ajuda.

Ao Prof. José Cesar Rosa pela colaboração e ensinamentos sobre espectrometria de massas, e também a especialista Clarice Izumi, a pós-doutoranda Helen Julie, a técnica Cirlei Vanni e demais membros do Centro de Química de Proteínas.

À Prof^a. Lúcia Helena Faccioli, Prof^a. Fabiani Gai Frantz, a pós-doutoranda Karina Zoccal e a técnica Caroline Fontanari pela colaboração com os ensaios de imunologia.

À Prof^a. Manuela Berto Pucca pela colaboração, por todo o saber compartilhado e amizade.

À Dr^a. Johara Boldrini França que sempre esteve disposta em ajudar, além de colaboradora deste trabalho, também é autora de trabalhos que me serviram de inspiração.

À Dr^a. Karla de Castro Figueiredo Bordon, colaboradora deste trabalho, que sempre ajuda a todos do laboratório quando precisam. Karla, você sempre esteve disposta a me ajudar desde o primeiro dia que entrei no Laboratório e sou muito grata por isso. Obrigada!

À querida técnica e amiga Iara Aimê Cardoso, presente na maioria dos experimentos realizados neste trabalho, sempre me ajudando com muito otimismo e paciência. Obrigada Iara! Você foi essencial para a realização deste trabalho!

À Prof^a. Palmira Cupo e a Unidade de Farmácia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto por ter fornecido o soro anticrotálico utilizado neste estudo.

À querida amiga Isabela, companheira não só de laboratório e apelido, mas de muitas outras situações. Compartilhamos muitos momentos profissionais e pessoais, tanto bons quanto ruins. Obrigada por estar sempre presente com seu enorme carinho e compreensão. Você é muito especial!

Aos queridos amigos, Rafaela, Luiza, Patrícia, Renan e Elis, que estão sempre comigo, me incentivam e torcem por mim, e independente da situação, distância e tempo, nossa amizade é sempre igual. Obrigada por serem quem são. Amo todos vocês!

Aos amigos Ernesto, Gisele e Fernando pelo saber compartilhado, por toda disposição e bom humor quando sempre precisei. Vocês são muito queridos! Muito obrigada!

Aos demais companheiros e amigos do Laboratório de Toxinas Animais, Francielle, Felipe, Camila, Priscila, Elisa e Fernanda, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, cada um com seu jeito tão especial. Obrigada a todos vocês por todos os momentos que passamos juntos.

A todos os demais amigos que a pós-graduação me deu, Ana Paulelli, Andréia, Airton, Paula, João, Marina e Cecília, que sempre me ajudaram em muitas dificuldades com muito otimismo e também compartilhamos muitos momentos de risadas.

A CAPES, FAPESP, CNPq, ao projeto Temático (nº do processo: 2011/23236-4) e ao NAP-TOXAN-USP pelo apoio financeiro que foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

OLIVEIRA, I. S. **Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*: análise de variações individuais**. 2016. 126f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As peçonhas ofídicas apresentam uma grande diversidade de componentes proteicos e estes podem variar dependendo de diversos fatores, como espécie, hábitos alimentares e comportamentais, ontogenia e até mudanças sazonais. Este alto grau de variabilidade pode levar a mudanças na fisiopatologia do envenenamento ofídico. No Brasil, as serpentes da espécie *Crotalus durissus* são capazes de habitar várias regiões do país e sua peçonha está sujeita a variabilidade, levando a uma grande dificuldade no tratamento do envenenamento, que é realizado por infusão do soro antiofídico. O estudo proteômico permite conhecer os componentes expressos pela glândula de peçonha. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos realizar uma análise comparativa das diferenças intraespecíficas na composição proteica das peçonhas de 22 espécimes de *Crotalus durissus collilineatus* através de técnicas ômicas, avaliar a capacidade neutralizante do soro antiofídico produzido pelo Instituto Butantan contra essas peçonhas, avaliar a atividade hialuronidásica de cada peçonha e comparar as alterações bioquímicas e imunológicas de camundongos após o envenenamento crotálico experimental. Para isto, as peçonhas de 22 serpentes da espécie *C. d. collilineatus*, da região de Catalão – GO, foram fracionadas em uma coluna de fase reversa C-18 acoplada a um sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e métodos de espectrometria de massas. Inicialmente, foi observado que as peçonhas destas 22 serpentes variaram entre as cores branca e amarela. Os perfis cromatográficos foram semelhantes, entretanto, apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas significativas de alguns componentes, por exemplo, apenas duas das peçonhas apresentaram a proteína crotamina. Outros componentes previamente relatados em outros estudos também foram identificados, como, o complexo da crotoxina, serinoproteases, metaloproteases e convulxina. Pela primeira vez foi possível evidenciar por técnicas proteômicas alguns componentes para a subespécie *C. d. collilineatus*, como: fator de crescimento neural, enzima conversora de angiotensina, fosfodiesterase, 5'-nucleotidase, carboxipeptidase, glutaminil ciclase, glutationa peroxidase, NADH desidrogenase e fosfolipase B. Através do método de ELISA, constatou-se que o soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan foi capaz de reconhecer todas as peçonhas utilizadas, embora algumas frações isoladas não tenham sido reconhecidas com tanta eficácia. A atividade hialuronidásica também foi avaliada, evidenciando que as peçonhas de algumas serpentes não apresentaram atividade detectável desta enzima. Por fim, o envenenamento crotálico experimental em camundongos Balb/c revelou que peçonhas diferentes são capazes de produzir alterações bioquímicas e imunológicas distintas. Assim, as vítimas do envenenamento podem necessitar de tratamentos diferenciados. Este trabalho mostrou que existem variações intraespecíficas importantes nas peçonhas de *C. d. collilineatus*, sendo que algumas podem ser mais miotóxicas que outras, evidenciadas por induzirem grandes aumentos dos níveis de creatina quinase. Além disso, este estudo proteômico revelou a presença de novos componentes proteicos na peçonha de *C. d. collilineatus*, contribuindo significativamente para o conhecimento de sua composição. Adicionalmente, estes dados indicam que quanto mais diversificado for o *pool* de peçonhas utilizado para a imunização de cavalos, melhor será o soro anticrotálico produzido, de forma que o único tratamento para este acidente seja ainda mais eficaz.

Palavras-chave: *Crotalus durissus collilineatus*, peçonha de serpente, proteoma, venômica, variações individuais.

ABSTRACT

OLIVEIRA, I. S. **Proteome of *Crotalus durissus collilineatus* venoms: analysis of individual variations.** 2016. 126f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Snake venoms present a wide variety of protein components and these can vary depending on several factors such as species, eating and behavioral habits, ontogeny and even seasonal changes. This high degree of variability can lead to changes in the pathophysiology of snake bite envenoming. In Brazil, snakes of the species *Crotalus durissus* are capable of inhabiting various regions of the country and its venom is subject to variability, leading to a high difficulty in treating envenoming, which is performed by the infusion of an antivenom. Proteomic studies allow the knowledge of the components expressed by the venom gland. Thus, this study aimed to perform a comparative analysis of intraspecific differences in the protein composition of the venoms of 22 specimens of *Crotalus durissus collilineatus* through omics techniques, to evaluate the neutralizing capacity of antivenom produced by Instituto Butantan against these venoms, to evaluate the hyaluronidase activity of each venom and to compare the biochemical and immunological changes of mice after experimental crotalic envenoming. In this way, the snake venoms of the 22 species of *C. d. collilineatus*, from Catalão – GO region, were fractionated on a reverse phase column C-18 coupled to a fast protein liquid chromatography system and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry methods. Initially, it was observed that the venoms of these 22 snakes varied between white and yellow colors. The chromatographic profiles were similar, however, presenting significant qualitative and quantitative differences of some components, for example, only two venoms showed the protein crotamine. Other components previously reported in other studies were also identified, such as crotoxin, serine proteases, metalloproteases and convulxin. For the first time, it was possible to demonstrate, by proteomic techniques, some components not found thus far in the subspecies *C. d. collilineatus*, such as nerve growth factor, angiotensin converting enzyme, phosphodiesterase, 5'-nucleotidase, carboxypeptidase, glutaminyl cyclase, glutathione peroxidase, NADH dehydrogenase, and phospholipase B. By ELISA method, it was found that the crotalic serum produced by the Instituto Butantan was able to recognize all the venoms used, although some isolated fractions have not been recognized effectively. The hyaluronidase activity was also evaluated, showing that the venom of some snakes do not presented detectable activity of this enzyme. The experimental crotalic envenoming in Balb/c mice revealed that different venoms are able to produce different biochemical and immunological changes. Thus, the victims of envenoming may need different treatments. This study demonstrated that there are significant intraspecific variations in the venom of *C. d. collilineatus*, and some of them may be more myotoxic than others, evidenced by an increasing of creatine kinase levels. Furthermore, the proteomic study revealed the presence of new protein components in the venom of *C. d. collilineatus*, significantly contributing to the knowledge of its composition. In addition, these data indicate that the more diverse the *pool* of the venoms used for the immunization of horses, better will be the anticrotalic serum produced, so that the only treatment for this accident will be even more effective.

Key-words: *Crotalus durissus collilineatus*, snake venoms, proteome, venom, individual variations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Serpente da família Viperidae	4
Figura 2. Projeto “Snake Venomics”	11
Figura 3. Peçonhas dessecadas à vácuo extraídas de 22 espécimes de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	29
Figura 4. Perfil eletroforético das peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> (50 µg) em gel desnaturante de poliacrilamida a 12,5%	31
Figura 5. Perfil proteômico quantitativo do <i>pool</i> de peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> ...	41
Figura 6. Perfil cromatográfico do fracionamento do <i>pool</i> de peçonhas de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	43
Figura 7. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 1 (A) e 2 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	44
Figura 8. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 3 (A) e 4 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	45
Figura 9. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 5 (A) e 6 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	46
Figura 10. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 7 (A) e 8 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	47
Figura 11. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 9 (A) e 10 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	48
Figura 12. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 11 (A) e 12 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	49
Figura 13. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 13 (A) e 14 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	50
Figura 14. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 15 (A) e 16 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	51
Figura 15. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 17 (A) e 18 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	52
Figura 16. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 19 (A) e 20 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	53
Figura 17. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 21 (A) e 22 (B) de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> em coluna de fase reversa C-18	54
Figura 18. Perfil eletroforético das frações obtidas do <i>pool</i> das 22 peçonhas de <i>C. d.</i>	

<i>collilineatus</i>	57
Figura 19. Análise do reconhecimento das peçonhas e das frações eluídas pelo soro anticrotálico comercial através do método de ELISA	87
Figura 20. Determinação da atividade hialuronidásica nas peçonhas de <i>C. d.</i> <i>collilineatus</i>	89
Figura 21. Avaliação bioquímica laboratorial do envenenamento crotálico.	93
Figura 22. Avaliação de citocinas no envenenamento crotálico.	96
Figura 23. Avaliação de óxido nítrico no envenenamento crotálico	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acidentes ofídicos no Brasil entre os anos de 2011 e 2015	8
Tabela 2. Peçonhas ofídicas do gênero <i>Crotalus</i> as quais foram submetidas a análises transcriptômicas e proteômicas	12
Tabela 3. Peso dos 22 indivíduos da subespécie <i>C. d. collilineatus</i> após a coleta das peçonhas	17
Tabela 4. Sinais clássicos de envenenamento pelo gênero <i>Crotalus</i> apresentados pelos animais envenenados	24
Tabela 5. Identificação de proteínas encontradas no <i>pool</i> de peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> a partir da técnica de LC-MS	34
Tabela 6. Recuperação proteica (%) das frações eluídas no processo de purificação (RP-FPLC) das peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i>	56
Tabela 7. Massas moleculares aproximadas das bandas proteicas reveladas para cada uma das frações aplicadas em SDS-PAGE	58
Tabela 8. Identificação de proteínas nas frações obtidas por RP-FPLC das peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcNa	Acetato de sódio
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
AV	Antiveneno
BCTA	Brometo de cetiltrimetilamônio
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
<i>C. atrox</i>	<i>Crotalus atrox</i>
<i>C. durissus</i>	<i>Crotalus durissus</i>
<i>C. d. cascavella</i>	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
<i>C. d. collilineatus</i>	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>
<i>C. d. marajoensis</i>	<i>Crotalus durissus marajoensis</i>
<i>C. d. ruruima</i>	<i>Crotalus durissus ruruima</i>
<i>C. d. terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<i>C. d. trigonicus</i>	<i>Crotalus durissus trigonicus</i>
<i>C. vegrandis</i>	<i>Crotalus vegrandis</i>
<i>C. viridis helleri</i>	<i>Crotalus viridis helleri</i>
CHCA	Ácido 4-hidroxi-cinâmico (<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
CK	Creatinoquinase
CRISP	Proteína secretória rica em cisteína (<i>Cysteine-Rich Secretory Protein</i>)
DL ₅₀	Dose letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Ionização por Eletrospray (<i>Eletrospray Ionization</i>)
FAD	Dinucleotídeo de flavina-adenina (<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>)

FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN	Mononucleotídeo de flavina (<i>Flavin Mononucleotide</i>)
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FPLC	Cromatografia líquida rápida de proteínas (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
<i>G</i>	Gravidade
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IgG	Imunoglobulina G
IL – 1	Interleucina 1
IL – 2	Interleucina 2
IL – 4	Interleucina 4
IL – 5	Interleucina 5
IL – 6	Interleucina 6
IL – 7	Interleucina 7
IL – 10	Interleucina 10
IL - 12p70	Interleucina 12p70
IL – 13	Interleucina 13
IL - 17 ^a	Interleucina 17 ^a
IFN	Interferon
LAAO	L-aminoácido oxidase
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
LDH	Lactato desidrogenase
m/V	Massa/volume
MALDI	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGF	Fator de crescimento neural (<i>Nerve Growth Factor</i>)

Nm	Nanometro(s)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NO ²⁻	Nitrito
NO ³⁻	Nitrato
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina (<i>o-phenylenediamine</i>)
<i>P</i>	Nível de significância
Pi	Ponto isoelétrico
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PTC	Feniltiocarbamoil
QTOF	<i>Quadrupole – time of flight</i>
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (<i>Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com tampão contendo dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SINAN	Sistema Informações de Agravos de Notificação
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TOF	<i>Time Of Flight</i>
UK	Reino Unido (<i>United Kingdom</i>)
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
USA	Estados Unidos da América (<i>United States of America</i>)
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Toxinas naturais e aplicações.	2
1.2. Serpentes peçonhentas no mundo e no Brasil.	3
1.3. A peçonha crotálica e seus componentes	5
1.4. Acidentes ofídicos e a produção do soro antiofídico.	7
1.5. Proteômica, venômica e venômica de <i>C. d. collilineatus</i>	10
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Peçonhas ofídicas.	17
3.2. Análise do <i>pool</i> de peçonha bruta por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC – MS)	18
3.2.1. Digestão trípica do <i>pool</i> de peçonhas	18
3.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) do <i>pool</i> de peçonhas	18
3.2.3. Espectrometria de massas do <i>pool</i> de peçonhas	19
3.2.4. Análise <i>in silico</i> das sequências de aminoácidos dos peptídeos	19
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das peçonhas brutas	19
3.4. Fracionamento das peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i>	20
3.5. Estimativa da concentração proteica das frações obtidas	20
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das frações obtidas por FPLC .	20
3.7. Identificação de proteínas	21
3.7.1. Sequenciamento amino-terminal	21
3.7.2. Análise das frações obtidas em FPLC por espectrometria de massas	21
3.7.3. Análise <i>in silico</i> das sequências de aminoácidos dos peptídeos obtidos	22
3.8. Reconhecimento dos componentes ofídicos e das peçonhas pelo soro anticrotálico comercial	22
3.9. Determinação da atividade hialuronidásica por turbidimetria	23
3.10. Ensaio <i>in vivo</i>	23
3.10.1. Animais	24
3.10.2. Padronização da dose de peçonha de <i>C. d. collilineatus</i> para a indução do envenenamento experimental	24
3.10.3. Envenenamento dos animais por inoculação das peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> .	25
3.10.4. Avaliação bioquímica laboratorial do soro de animais envenenados pela peçonha de <i>C. d. collilineatus</i>	25
3.10.5. Avaliação de citocinas e óxido nítrico no soro de animais envenenados pela peçonha de <i>C. d. collilineatus</i>	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Análise das variações individuais	28
4.1.1. Inspeção visual das peçonhas	28
4.1.2. SDS-PAGE	30

4.1.3. Variações individuais por análise proteômica	32
4.2. Reconhecimento das peçonhas e dos componentes ofídicos pelo soro anticrotálico comercial	85
4.3. Determinação da atividade enzimática de hialuronidase nas peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i>	88
4.4. Ensaios <i>in vivo</i>	90
4.4.1. Padronização da dose	91
4.4.2. Análise bioquímica laboratorial do envenenamento crotálico	91
4.4.3. Avaliação de citocinas e óxido nítrico no envenenamento crotálico	93
5. CONCLUSÕES	99
6. REFERÊNCIAS	101
ANEXOS	124
ANEXO A. Certificado de Regularidade do serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) para utilização de diferentes venenos animais emitido pelo IBAMA	125
ANEXO B. Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)	126

1. Introdução

1.1. Toxinas naturais e aplicações

Desde o início da história da humanidade, os venenos de animais ou plantas têm sido amplamente utilizados. Eles eram usados na caça, em guerras e, também, para assassinatos. Portanto, desde a pré-história, plantas, bem como serpentes e outros animais, têm sido classificados como perigosos ou não (GALLO, 2008).

Toxinas naturais, de origem animal ou vegetal, têm sido alvo de pesquisas desde épocas mais remotas, devido ao grande interesse em descobrir os mecanismos pelos quais esses componentes levam a efeitos tóxicos quando interagem com organismos vivos. Com o passar dos anos, esses compostos foram utilizados com diversas finalidades, como armas indígenas (secreção da pele de rãs em flechas) e ferramentas moleculares para estudos de diversos sistemas biológicos, tornando-se importantes alvos de pesquisa, mesmo quando produziam efeitos maléficos. O estudo de suas estruturas e a compreensão de seus mecanismos de ação permitiram o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos das vítimas de envenenamentos, bem como a identificação de substâncias capazes de antagonizá-las (CERNI, 2012).

O interesse do homem por serpentes existe desde a antiguidade, visto que sempre tiveram que conviver. Estes animais exerceram enorme fascínio sobre a humanidade desde os tempos dos babilônios, estando sempre relacionados às atividades médicas, fazendo parte de uma gama de símbolos relacionados à saúde, como é o caso do símbolo da Medicina. Este é constituído por um caduceu alado com duas serpentes enroladas. As serpentes, neste caso, são símbolos de sagacidade e rejuvenescimento, devido às constantes trocas de pele, além de serem consideradas símbolos do bem e do mal, representando a saúde e a doença, respectivamente (PRATES, 2002; NASCIMENTO; DE OLIVEIRA RAMOS; LICHTENSTEIN, 2006).

O motivo do fascínio e medo que as serpentes causam nos seres humanos encontra-se em sua peçonha. No passado, muitos acreditavam que as consequências da picada de serpentes peçonhentas eram forças além da natureza, imaginando que divindades vingativas estavam incorporadas às serpentes. Devido à violência dos efeitos causados pela picada ofídica, serpentes e suas peçonhas foram envolvidas por superstições e mitos (RUSSELL, 2001).

Embora produzam malefícios ao homem, venenos e peçonhas animais são importantes ferramentas de estudo, sendo capazes de se ligarem a diversos receptores com grande afinidade e especificidade. Peçonhas de serpentes, escorpiões, centopéias, conus e venenos de

sapos vêm se destacando em inúmeras aplicações farmacológicas (BALDO et al., 2015; HAKIM; YANG; LAI, 2015; ORTIZ et al., 2015; CHAN et al., 2016; MIR et al., 2016).

As peçonhas de serpentes são misturas complexas, constituídas por componentes enzimáticos, lipídeos, proteínas de alta e baixa massa molecular, aminoácidos livres, esteroides, histamina, além de outros componentes que têm a capacidade de interagir com enzimas, membranas celulares, proteínas de membranas, receptores e canais iônicos de diversos organismos (MÉNEZ; STÖCKLIN; MEBS, 2006).

Toxinas animais também são usadas como fármacos. Da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* foram isolados peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), o que levou ao desenvolvimento de um dos medicamentos mais prescritos para o tratamento de hipertensão, o Captopril (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970). O Tirofiban e o Eptifibatide são duas drogas antiplaquetárias disponíveis no mercado, que foram baseadas em desintegrinas de peçonhas ofídicas (KOH; KINI, 2012). A fibrolase é uma metaloprotease isolada de *Agkistrodon contortrix contortrix*, utilizada como uma droga fibrinolítica (BAJWA et al., 1982; RANDOLPH et al., 1992).

1.2. Serpentes peçonhentas no mundo e no Brasil

As serpentes pertencem à classe Reptilia, ordem Squamata (Opell, 1811) e subordem Serpentes (Linnaeus, 1758) (CALDWELL et al., 2015), a qual compreende mais de 3.400 espécies conhecidas (HSIANG et al., 2015). Habitando diversas partes do globo terrestre, as serpentes peçonhentas de importância médica pertencem a 4 famílias (WARRELL, 2012):

- Atractaspidinae – víboras buraqueiras;
- Colubridae – cobras arbóreas com presas posteriores;
- Elapidae – cobras, najas, cobras corais, mambas, serpentes australianas e marítimas;
- Viperidae – víboras asiáticas, cascavéis americanas e víboras do velho mundo.

A designação de “peçonhentos” refere-se a animais que produzem toxinas em glândulas especializadas e possuem aparatos capazes de inoculá-las em outro organismo (BERNARDE, 2009). Nas serpentes estes aparatos são constituídos por dois dentes modificados, que inoculam a peçonha na presa, associados a duas glândulas de peçonha, as quais produzem e armazenam as toxinas. Este sistema é utilizado pelas serpentes para se defenderem de outros animais, bem como para matar e digerir presas (KARDONG, 1982; MELGAREJO; CARDOSO, 2003).

No Brasil, foram catalogadas até o momento 10 famílias, 75 gêneros, compreendendo 392 espécies (COSTA; BÉRNILS, 2015), sendo que destas, apenas três famílias são consideradas peçonhentas, a Elapidae, Colubridae e Viperidae. Estas famílias incluem um total de 62 espécies, cuja mordida causa acidentes que necessitam de tratamento médico (CAMPBELL; LAMAR, 1989; LIRA-DA-SILVA et al., 2009; BERNARDE, 2014).

Serpentes da família Viperidae podem ser facilmente identificadas por possuírem uma cabeça triangular recoberta por pequenas escamas de aspecto semelhante às escamas do restante de seu corpo (Fig. 1) (MELGAREJO; CARDOSO, 2003).



Figura 1. Serpente da família Viperidae. A espécie *Crotalus durissus collilineatus* (Arquivo do Laboratório de Toxinas Animais – LTA).

Essas serpentes possuem um aparelho inoculador solenóglifo, ou seja, cada maxila possui apenas um dente funcional, sendo este, por sua vez, agudo, grande e oco (MELGAREJO; CARDOSO, 2003). Associadas a este aparato inoculador, encontram-se as glândulas de peçonha, que se localizam na região pós-orbital. Quando estas glândulas são comprimidas por músculos acessórios, a peçonha é injetada na presa (JACKSON, 2007; FRY et al., 2008; VONK et al., 2008).

Incluídas na família Viperidae, estão as subfamílias Viperinae e Crotalinae (WÜSTER et al., 2008). A subfamília Crotalinae apresenta a fosseta loreal, um órgão termorreceptor, que se localiza entre o olho e a narina da serpente, sendo capaz de detectar pequenas flutuações de

radiação termal, detectando assim a presença e a direção de presas endotérmicas (BULLOCK; COWLES, 1952; BAKKEN; KROCHMAL, 2007).

Esta subfamília é composta por diversos gêneros, dentre eles, *Bothrops* e *Bothrocophias*, anteriormente denominado apenas *Bothrops* (FENWICK; EVANS; PARKINSON, 2009), *Crotalus* (WÜSTER; BERNILS, 2011) e *Lachesis* (FERNANDES; FRANCO; FERNANDES, 2004). Esses gêneros podem ser diferenciados pela cauda: o gênero *Bothrops* possui uma cauda simples, sem modificações, apenas com escamas subcaudais em pares; o gênero *Crotalus*, apresenta uma estrutura denominada chocalho ou guizo, na terminação da cauda, que produz um ruído quando a serpente se encontra pronta para o ataque ou irritada; e o gênero *Lachesis* tem as últimas escamas subcaudais eriçadas e modificadas, que terminam num espinho (MELGAREJO; CARDOSO, 2003). *Bothrops* e *Bothrocophias* são gêneros que podem ser diferenciados por sua filogenia, entretanto, estudos anteriores demonstraram que este tipo de diferenciação não está muito claro, levando a incertezas na nomenclatura de espécies de importância médica (CARRASCO et al., 2016).

As serpentes do gênero *Crotalus* são, popularmente, conhecidas como cascavéis, maracambóia, cobra-de-quatro-ventas (VALLE; BRITES, 2012) e boicininga, ou serpente tininte, na língua indígena (AMARALL, 1973). Esse gênero também é caracterizado por ser predador ativo, o qual se alimenta de pequenos mamíferos (LEMA; ARAUJO; AZEVEDO, 1983), pássaros e lagartos (MACARTNEY, 1989).

No Brasil, as serpentes do gênero *Crotalus* são representadas apenas pela espécie *Crotalus durissus*, sendo subdividida em 5 subespécies: *C. d. collilineatus*, que é encontrada no centro-oeste, Minas Gerais e São Paulo (norte); *C. d. terrificus*, na região sul meridional e oriental, em zonas altas e secas; *C. d. marajoensis*, na região da Ilha de Marajó; *C. d. ruruima*, encontrada no norte do país; e *C. d. cascavella*, em regiões da caatinga do nordeste do país (CAMPBELL; LAMAR, 1989; PINHO; PEREIRA, 2001).

Existe ainda uma sexta subespécie reconhecida por alguns autores, *C. d. trigonicus*, que são encontradas em algumas regiões do estado de Roraima (CAMILLO, 1998; AUTO, 1999). Entretanto, as alterações climáticas, sucessões vegetais, bem como atividades humanas, podem levar a mudanças na distribuição/abundância destas espécies em diversas regiões (MENDELSON III; JENNINGS, 1992).

1.3. A peçonha crotálica e seus componentes

As peçonhas das serpentes do gênero *Crotalus* são consideradas mais tóxicas do que as do gênero *Bothrops*, pois apresentam maiores números de casos letais no Brasil. Os acidentes botrópicos, por sua vez, ocorrem com maior frequência (aproximadamente 10 vezes maior) que os crotálicos. Estes gêneros são os responsáveis pelos casos mais graves de envenenamento no país (BRAZIL, 1911; BELLUOMINI, 1984; FERREIRA JÚNIOR, 2003).

As peçonhas crotálicas são compostas majoritariamente por proteínas (90% a 95%) (DA SILVA ARAÚJO et al., 2016), carboidratos, cátions metálicos, aminas biogênicas, nucleosídeos e uma pequena fração lipídica e de aminoácidos livres (CAPRONI, 2009). Os componentes proteicos podem ser divididos em componentes enzimáticos, como serinoproteinases, metaloproteinases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases A₂ e não enzimáticos como as desintegrinas, fatores de crescimento endotelial e neural, miotoxinas e peptídeos natriuréticos (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007).

Entre os componentes proteicos da peçonha crotálica, destaca-se a crotoxina, primeira toxina isolada e cristalizada por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938) (GRALÉN; SVEDBERG, 1938). Ela corresponde entre 65% a 68% da peçonha crotálica (DA SILVA; BIER, 1982), sendo o componente mais tóxico da peçonha (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971). A crotoxina é composta por duas subunidades, uma básica (fosfolipase A₂) e outra ácida (crotapotina), esta sem atividade enzimática, mas capaz de inibir a atividade enzimática e aumentar a letalidade da fosfolipase A₂. Esta fosfolipase apresenta, especialmente, ações miotóxicas e neurotóxicas, sendo capaz de inibir a liberação de neurotransmissores na placa motora. Porém, esta ação só é realizada se a fosfolipase A₂ estiver complexada com a crotapotina, pois esta atua como chaperona, prevenindo ligações inespecíficas da fosfolipase A₂, certificando que esta atue na junção pré-sináptica (CHANG; SU, 1981; BON et al., 1988; CHOUMET et al., 1993; CLISSA, 1997).

A crotamina, isolada pela primeira vez por Gonçalves e Vieira (1950), é uma proteína com ação miotóxica, que atua nas membranas das fibras musculares, despolarizando as células (OGUIURA; BONI-MITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005). Essa toxina pode estar presente ou não em serpentes brasileiras, dependendo da região que habitam (SCHENBERG, 1959).

A giroxina, toxina que também faz parte da composição da peçonha crotálica, é uma enzima trombina-símile (ALEXANDER et al., 1988), capaz de agir sobre proteínas plasmáticas, levando a distúrbios hematológicos (SERRANO; MAROUN, 2005). Essa toxina causa uma lesão no labirinto e induz o animal envenenado a girar em torno do seu próprio eixo (BACILA, 1961; BARRABIN et al., 1978; SEKI; VIDAL; BARRIO, 1980).

A convulxina é um heterodímero de cadeias α e β (MARLAS, 1985), isolado pela primeira vez por Prado-Franceschi e Vital-Brazil (1981). Essa toxina é um potente ativador da agregação plaquetária (VARGAFTING et al., 1980; FRANCISCHETTI et al., 1997).

Além desses quatro componentes, existem muitos outros pouco estudados, devido às suas baixas quantidades nas peçonhas crotálicas, tais como metaloproteases (JIA et al., 1996), L-aminoácido oxidases (DU; CLEMETSON, 2002), hialuronidase (BORDON et al., 2012), lectinas tipo – C (OGAWA et al., 2005), serinoproteases (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2015), desintegrinas (CALVETE et al., 2005) e peptídeos potencializadores de bradicinina (HIGUCHI et al., 2006).

Atualmente já foram descritos componentes com atividades terapêuticas, como a crotalfina, peptídeo capaz de promover analgesia (KONNO et al., 2008) e enzimas trombina-símile, utilizadas como “selante de fibrina” para a sutura de feridas (BARROS et al., 2009).

Além de contribuírem para o acidente crotálico, estes componentes proteicos foram essenciais para a evolução das serpentes, imobilizando, paralisando, matando e digerindo animais maiores que as serpentes, fazendo com que este evento predatório deixasse de ser mecânico, passando a ser químico (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007).

Todos estes componentes estão suscetíveis a variação qualitativa e quantitativa, sujeitando as peçonhas a alterações em suas propriedades e atividades biológicas características. Por consequência, pode haver alterações na toxicidade, a qual é representada pelas manifestações clínicas ocasionadas pela composição da peçonha, potência e toxicocinética de cada toxina (DA SILVA ARAÚJO et al., 2016).

1.4. Acidentes ofídicos e a produção do soro antiofídico

Os acidentes ofídicos em regiões tropicais são considerados um grave problema de saúde pública, devido à sua frequência e à relação morbidade/mortalidade, entrando no rol de condições negligenciadas pertencentes à lista do Departamento de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em janeiro de 2007 (PINHO; PEREIRA, 2001; WHO, 2007; CRUZ et al., 2009; GUTIÉRREZ; PEREAÑEZ, 2016). Esse problema afeta principalmente trabalhadores rurais, com destaque para os homens, e crianças de países pobres e em desenvolvimento da América Latina e Oceania, bem como do continente africano e asiático (WHO, 2007).

Com relação à epidemiologia do ofidismo, verifica-se que existe uma subnotificação dos acidentes em todas as partes do globo terrestre. Isto ocorre porque, muitas vezes, os

pacientes não procuram atendimento médico, ou são atendidos e transferidos, não sendo registrados pelo sistema de saúde. Além disso, existe a falha de notificação (CUPO, 2015).

Pouco conhecidas, porém impactantes, são as sequelas anatômicas e funcionais causadas pelo acidente ofídico, que, apesar de não ser conhecido o número de ocorrências, é maior que os casos de óbito. Aproximadamente, mil pacientes por ano são vítimas deste problema, com gravidade ainda desconhecida (GUTIÉRREZ et al., 2010; CHIPPAUX, 2015).

A partir dos dados epidemiológicos obtidos através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), entre os anos de 2011 e 2015 é perceptível a oscilação entre os números de acidentes ofídicos, variando entre 18 mil e 30 mil casos notificados por ano até o momento (os dados entre os anos de 2013 e 2015 ainda estão sujeitos à revisão), além dos números de acidentes que não foram notificados. Os acidentes crotálicos oscilaram entre 1.400 a 2.500 casos notificados por ano (Tab. 1).

Tabela 1. Acidentes ofídicos no Brasil entre os anos de 2011 e 2015.

Ano	<i>Bothrops</i>	<i>Crotalus</i>	<i>Lachesis</i>	<i>Micrurus</i>	Não-peçonhentas	Não identificadas	Total
2010	21.584	2.378	1.031	210	1.185	3.275	29.663
2011	21.791	2.487	1.002	227	1.247	3.338	30.092
2012	21.062	2.295	894	246	1.296	3.513	29.306
2013*	20.530	1.934	939	252	1.376	3.363	28.394
2014*	19.404	1.911	835	213	1.403	3.404	27.170
2015*	13.373	1.422	524	139	897	2.210	18.565

Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificação

*Dados sujeitos à revisão

No Brasil, a notificação compulsória dos acidentes ofídicos levou à criação de um sistema de troca de informações epidemiológicas e soros antiofídicos entre as Secretarias Estaduais de Saúde e o Ministério da Saúde. Desta forma, houve um melhor dimensionamento do ofidismo na população brasileira, possibilitando, assim, o aprimoramento no controle desse tipo de acidente (CARDOSO; WEN, 2003).

O envenenamento crotálico tem uma ação neurotóxica devido, principalmente, à presença de neurotoxinas como a crotalina, atingindo o sistema nervoso central e periférico. Sua ação é semelhante à do curare, induzindo uma paralisia devido à inibição da liberação de acetilcolina na fenda sináptica (TOKARNIA et al., 2014). Entre os efeitos do envenenamento, destacam-se a ptose palpebral, parestesia de músculos faciais (face miastênica) e paralisia gradual dos músculos respiratórios (AZEVEDO-MARQUES, CUPO; HERING, 2003).

A crotalina, bem como a crotamina, causam os efeitos miotóxicos, levando a uma lesão tecidual sistêmica de músculos esqueléticos. Consequentemente, o processo de

rabdomiólise é desencadeado, seguido de mioglobínúria (TOKARNIA et al., 2014). Uma lesão tubular renal pode surgir devido à mioglobínúria, o que pode ocasionar insuficiência renal aguda (IRA) e consequente oligúria ou anúria, sendo uma das principais causas de óbito do paciente, assim como o choque cardiovascular (WHO, 2007; TOKARNIA et al., 2014).

Além disso, a vítima apresenta um quadro de dor difusa e valores aumentados de lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), aldolase e creatinoquinase (CK) (AZEVEDO-MARQUES, CUPO; HERING, 2003).

Semelhante à ação da trombina, a peçonha crotálica consome os fatores da coagulação, em especial, o fibrinogênio, levando a um quadro de hipofibrinogenemia, o que torna o sangue incoagulável (THOMAZINI; BARRAVIERA; BARRAVIERA, 1994; SAÚDE, 1998; TOKARNIA et al., 2014).

O único tratamento existente para o acidente ofídico é o soro antiofídico, ou seja, imunoglobulinas hiperimunes obtidas a partir de animais imunizados com a peçonha específica (WHO, 2010). Mais de um século depois de sua introdução na clínica dos envenenamentos por Albert Calmette, em 1895, este tipo de tratamento é essencial, porém sempre é necessário que o paciente seja reavaliado e, também, limitações dos pacientes devem ser consideradas. Por exemplo: pacientes com problemas cardíacos, respiratórios e que apresentem o quadro de insuficiência renal devem ser tratados com o soro e técnicas de emergência devem ser utilizadas (WARRELL, 2010).

Desde 1986, com a implantação do Programa Nacional de Controle de Acidentes Ofídicos pelo Ministério da Saúde no Brasil, ampliado para outros animais peçonhentos em 1988, a produção do soro antiofídico foi padronizada. Atualmente, é realizada apenas por três instituições: Instituto Vital-Brazil, Instituto Butantan e Fundação Ezequiel Dias, as quais distribuem o soro gratuitamente para instituições de saúde (WEN et al., 2015).

A produção do soro antiofídico inicia-se com a extração das peçonhas ofídicas, na qual uma mistura de peçonhas de diferentes subespécies do mesmo gênero é preparada e denominada antígeno. Este antígeno é inoculado em cavalos, seguido de uma sangria exploratória, em que é realizada a titulação de anticorpos específicos, sangria de produção e plasmaferese. O plasma é colhido e fracionado para extração e purificação de imunoglobulinas ativas. Dependendo da técnica de fracionamento, podem ser obtidas três diferentes preparações de imunoglobulinas (PARRA et al., 2009; GUTIÉRREZ; LEÓN; BURNOUF, 2011):

- Fab monovalente – plasma digerido com papaína e fracionado com sulfato de amônio (AL-ABDULLA et al., 2003);

- Fragmentos de F(ab')₂ – plasma digerido com pepsina e fracionado com sulfato de amônio ou ácido caprílico (RAW et al., 1991; GRANDGEORGE et al., 1996);
- IgG inteira – plasma fracionado com sulfato de amônio e ácido caprílico (BOLAÑOS, 1977; ROJAS; JIMÉNEZ; GUTIÉRREZ, 1994).

Após algum destes processos, os antivenenos (AV) são mantidos líquidos ou podem ser liofilizados, o que garante sua estabilidade (WHO, 2010).

Atualmente existem cinco tipos de AV produzidos no Brasil: *Bothrops* AV, *Crotalus* AV, *Micrurus* AV, *Bothrops-Crotalus* AV e *Bothrops-Lachesis* AV, sendo o *Crotalus* AV produzido por peçonhas de *C. d. terrificus* (50%) e *C. d. collilineatus* (50%) (WEN et al., 2015).

Antigamente, para essa produção, os aspectos bioquímicos e imunoquímicos das toxinas do envenenamento não eram levados em consideração. Apesar dos avanços em relação à eficácia e segurança, a produção do soro não foi significativamente modificada, faltam medidas para que haja melhorias no desenvolvimento e fabricação, a fim de atender esses, e outros parâmetros de qualidade (GUTIÉRREZ; LEÓN; BURNOUF, 2011).

Os componentes de uma peçonha ofídica sofrem variações de acordo com a espécie, gênero, idade, habitat, hábitos alimentares, comportamentais, além de variarem conforme mudanças climáticas. Devido a estas variações, é difícil selecionar as peçonhas que vão compor o antígeno a ser usado na produção do soro antiofídico (WILLEMSE, 1978; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; FERREIRA et al., 1992; LOURENÇO et al., 2013). Desta forma, estudos de variações intraespecíficas tornam-se necessários para uma melhor compreensão dos quadros de envenenamento, além de auxiliar no desenvolvimento de um soro antiofídico mais eficaz.

1.5. Proteômica, venômica e venômica de *C. d. collilineatus*

A partir de diferentes metodologias para elucidar mecanismos bioquímicos e fisiológicos de determinadas patologias, foi criada a proteômica. Esta abordagem permite realizar comparações quantitativas e qualitativas de componentes proteicos expressos por células, tecidos ou órgãos, identificando-os individualmente, para que possam ser caracterizados e relacionados aos estados fisiológicos ou patológicos do organismo estudado em determinadas condições (NOVOA-HERRÁN; SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2011; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2012).

Wasiinger e colaboradores (1995) introduziram o conceito de proteoma e, a partir disso, a análise proteômica foi sendo caracterizada, a qual faz uso, principalmente, de técnicas de eletroforese bidimensional (2D) e espectrometria de massas, fundamentais na caracterização de marcadores biológicos, identificação de moléculas e descoberta de vias metabólicas de etapas celulares (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2012). Com o advento de técnicas proteômicas, Calvete e colaboradores (2007) iniciaram o projeto “*Snake Venomics*”, realizando estudos proteômicos de peçonhas de serpentes da família Viperidae (Fig. 2) e, a partir deste projeto, abordagens sobre a proteômica e o transcriptoma das glândulas de peçonha de mais de 120 *taxa* foram realizados (GAO et al., 2014).

O protocolo proposto no projeto “*Snake Venomics*” para o estudo proteômico inicia com o fracionamento das peçonhas ofídicas através de cromatografia líquida de alta pressão, utilizando uma coluna de fase reversa C-18 (RP-HPLC), seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida com tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sequenciamento aminoterminal ou N-terminal, determinação de massas moleculares por espectrometria de massas e determinação do conteúdo de cisteínas (S-S ou SH). Assim, é feita a caracterização inicial do conteúdo proteico de cada fração da peçonha. As frações que apresentarem uma única banda eletroforética, massa molecular e sequência aminoterminal podem dar início a caracterização do proteoma da peçonha. Entretanto, frações que apresentam N-terminal bloqueado ou conteúdo eletroforético heterogêneo, têm as bandas de interesse extraídas do gel e estas são reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina. Os peptídeos gerados serão analisados por espectrometria de massas, a fim de obter a identidade de cada proteína. Desta forma, é possível obter a identidade de proteínas que representam mais de 0,05% da peçonha e, assim, determinar a composição dessa peçonha (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007).

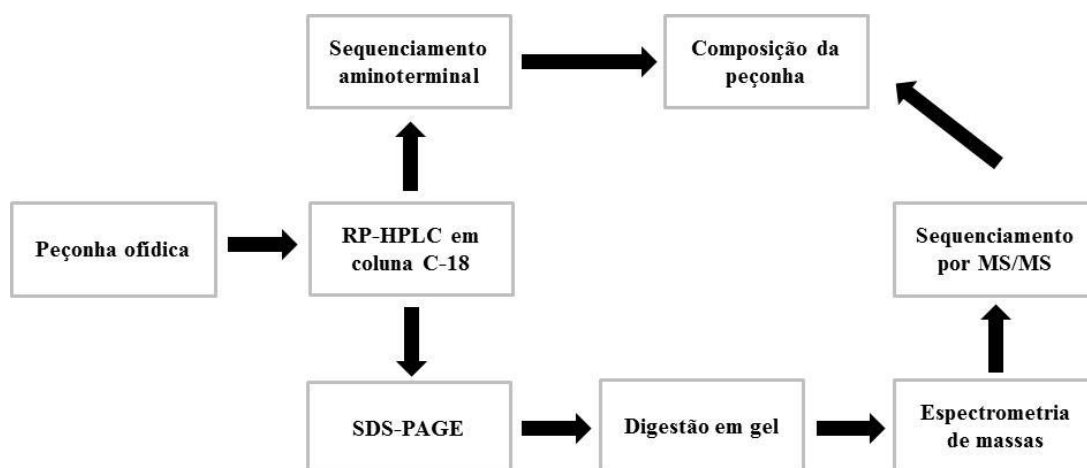


Figura 2. Projeto “*Snake Venomics*”. Esquema simplificado da abordagem proteômica de peçonhas ofídicas (CALVETE; JUAREZ; SANZ, 2007; LOMONTE et al., 2014).

Com a introdução dessa técnica, algumas vantagens em relação ao estudo de peçonhas ofídicas foram reveladas, por exemplo, além de determinar os componentes presentes na peçonha, a abundância semi-quantitativa dos mesmos também pode ser estimada (LOMONTE et al., 2014). Outra vantagem é a determinação da capacidade do soro antiofídico em reconhecer e neutralizar os componentes proteicos existentes na peçonha, denominada “Antivenômica”, a qual combina a técnica proteômica com técnicas de imunologia (CALVETE et al., 2009b).

A venômica das peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* já foi determinada por diversos autores de forma indireta através do transcriptoma da glândula de peçonha, associado à bioinformática ou diretamente, utilizando técnicas proteômicas propriamente ditas (Tab. 2) (CALVETE, 2013b).

Tabela 2. Peçonhas ofídicas do gênero *Crotalus* as quais foram submetidas a análises transcriptômicas e proteômicas (adaptada de Calvete (2013b), com atualizações).

Espécie	Transcriptoma	Proteoma
<i>Crotalus adamanteus</i>	ROKYTA et al., 2011 ROKYTA et al., 2012	MARGRES et al., 2014
<i>Crotalus atrox</i>		FOX et al., 2006 CALVETE et al., 2009a
<i>Crotalus durissus cascavella</i>		BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009	BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010
<i>Crotalus durissus cumanensis</i>		CALVETE et al., 2009c
<i>Crotalus durissus durissus</i>		CALVETE et al., 2009c
<i>Crotalus durissus ruruima</i>		CALVETE et al., 2009c
<i>Crotalus durissus terrificus</i>		CALVETE et al., 2009c GEORGIEVA et al., 2010
<i>Crotalus horridus</i>	ROKYTA; WRAY; MARGRES, 2013	ROKYTA et al., 2015
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>		MASSEY et al., 2012
<i>Crotalus simus</i>	DURBAN et al., 2011	CALVETE et al., 2009c
<i>Crotalus tigris</i>		CALVETE et al., 2012
<i>Crotalus vegrandis</i>	VIALA et al., 2015	VIALA et al., 2015
<i>Crotalus viridis viridis</i>		SAVIOLA et al., 2015

Em relação à venômica de *C. d. collilineatus*, Boldrini-França e colaboradores (2009) realizaram o transcriptoma da glândula de peçonha, demonstrando que a crotoxina representa 88% do total de transcritos desta peçonha. Nesse trabalho, foram identificadas toxinas que também são expressas na peçonha de *C. d. terrificus*, como o fator de crescimento neural

(NGF), bem como toxinas desconhecidas para a espécie *C. durissus*, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a cardiotoxina.

Boldrini-França e colaboradores (2010) também determinaram o proteoma destas peçonhas, bem como o da subespécie *C. d. cascavella*, com o intuito de comparar o perfil proteico expresso por estas subespécies. Esse estudo demonstrou que a peçonha de *C. d. collilineatus* apresenta crotamina em sua composição, enquanto a de *C. d. cascavella* apresentou altas concentrações de uma fosfolipase A₂ miotóxica. As peçonhas destas subespécies se assemelham à da subespécie *C. d. terrificus*, sendo que as diferenças encontradas podem ser devido à localização geográfica onde estas três subespécies são encontradas.

O estudo proteômico também permite a comparação entre indivíduos pertencentes a uma mesma espécie. No caso de serpentes, através do conhecimento da peçonha individual, o soro antiofídico poderá ser produzido com maior especificidade, aumentando sua eficácia frente ao envenenamento (MENDOZA et al., 2009; GUTIÉRREZ, 2011).

Desta forma, estudos mais aprofundados sobre a composição das peçonhas ofídicas puderam ser realizados. Entretanto, as variações individuais entre peçonhas de serpentes da mesma espécie são raramente documentadas, apesar da ciência de muitos pesquisadores sobre a ocorrência destas. Essas variações individuais podem ser um fator de impacto nos estudos de peçonhas ofídicas (KOPPER et al., 2015).

Frente aos poucos estudos proteômicos realizados com peçonhas de *C. d. collilineatus*, serpente que habita a região sudeste do país, a ocorrência de variações individuais que podem inferir na eficácia do soro antiofídico, único antídoto utilizado na terapia do envenenamento, a proposta deste trabalho foi analisar comparativamente o proteoma dessa subespécie, utilizando a peçonha de 22 indivíduos, bem como verificar as diferenças bioquímicas e imunológicas que poderiam ocorrer diante do envenenamento por estes indivíduos. Comparações qualitativas e quantitativas de componentes proteicos da peçonha são importantes para a compreensão do envenenamento, bem como para a escolha de serpentes utilizadas para a produção do soro utilizado na terapêutica (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003).

2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram a análise das diferenças intraespecíficas na composição proteica das peçonhas de 22 espécimes de *Crotalus durissus collilineatus*, a avaliação da especificidade do soro antiofídico produzido no Brasil contra essas peçonhas e comparação dos diferentes efeitos bioquímicos e imunológicos após o envenenamento crotálico experimental.

Para isto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Caracterização do proteoma das peçonhas de 22 espécimes adultos de serpentes *C. d. collilineatus* e análise das variações intraespecíficas na composição de toxinas das mesmas;
- Avaliação o reconhecimento das peçonhas e seus componentes pelo soro anticrotálico comercial produzido no Brasil;
- Avaliação da atividade hialuronidásica de cada peçonha;
- Comparação dos efeitos bioquímicos e imunológicos produzidos pela peçonha de cinco espécimes de *C. d. collilineatus* durante o envenenamento experimental (camundongos Balb/c).

3. Material e Métodos

3.1. Peçonhas ofídicas

Para a realização deste trabalho, as peçonhas de 22 serpentes da subespécie *Crotalus durissus collilineatus* foram doadas pelo serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Estas serpentes foram coletadas na região de Catalão – GO e mantidas no serpentário. A extração das peçonhas foi realizada por funcionários especializados do Biotério da FMRP/USP através de compressão das glândulas de peçonha. As peçonhas foram dessecadas a vácuo a temperatura ambiente durante 6 horas e armazenadas a -20 °C até o momento do uso. Um *pool* destas peçonhas foi preparado a partir de uma mistura de quantidades iguais de cada peçonha (1 mg). O Anexo A apresenta o Certificado de Regularidade do Biotério Central emitido pelo IBAMA.

Dentre os indivíduos analisados todos eram adultos e encontravam-se ambos os gêneros, macho e fêmea, que pesavam entre, aproximadamente, 400 g e 1.200 g (Tab. 3).

Tabela 3. Peso dos 22 indivíduos da subespécie *C. d. collilineatus* após a coleta das peçonhas.

Número do indivíduo	Número do chip	Peso (g)	Gênero
1	438	1.227,5	Macho
2	422	852,3	Macho
3	449	1.094,2	Macho
4	447	1.221,8	Fêmea
5	434	769,3	Macho
6	440	1.116,3	Macho
7	439	965,8	Macho
8	421	930,1	Macho
9	424	1.274,7	Macho
10	427	901	Macho
11	428	1.038,1	Fêmea
12	429	1.066,1	Macho
13	430	968,9	Macho
14	431	1.222,6	Fêmea
15	435	1.029,8	Macho
16	436	1.067,6	Fêmea
17	441	1.057,9	Fêmea
18	442	693,8	Fêmea
19	443	844,3	Fêmea
20	444	990,8	Macho
21	446	492,2	Fêmea
22	448	940,6	Macho

3.2. Análise do *pool* de peçonha bruta por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC – MS)

3.2.1. Digestão triptica do *pool* de peçonhas

Para a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – LC – MS*), foram secos 3 mg de peçonha bruta (*pool*) em centrífuga rotatória a vácuo (Speed-Vac, Savant). À amostra do *pool* de peçonhas, foram adicionados 20 µL de uma solução de acetonitrila (ACN) 50% (V/V) e bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 0,1 M, 2,5 µL de NH_4HCO_3 1 M e 2,5 µL de hidróxido de amônio 100%. Em seguida, foram adicionados 5 µL de ditioneitol (DTT) 45 mM e as amostras foram incubadas a 57 °C, por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 5 µL de iodoacetamida 100 mM e as amostras foram deixadas em repouso, no escuro, a temperatura ambiente, por 3 horas. Após esse período, o volume final foi diluído quatro vezes com NH_4HCO_3 0,1 M. Os peptídeos e proteínas das amostras foram então digeridos com 10 µL de tripsina (Promega, USA - 0,2 µg/µL) a 37 °C, por 24 horas. Ao final deste processo, foi adicionado hidróxido de amônio até a solução atingir o pH desejado (pH > 7) e, em seguida, foram adicionados mais 10 µL de tripsina (Promega, USA - 0,2 µg/µL). Esta solução foi incubada a 37 °C, por 24 horas. Posteriormente, a reação de digestão foi interrompida pela adição de 2 µL de ácido fórmico 100 % (V/V) e centrifugada a 8.500 x g, por 5 minutos.

3.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) do *pool* de peçonhas

Uma alíquota (150 µL) da amostra digerida com tripsina foi misturada com 100 µL de formiato de amônio 5 mM, pH 3,2 e ACN 20% (V/V) e injetada automaticamente em uma coluna de troca catiônica (Polysulfoethyl A, 100 mm x 4,6 mm, 5 µm, 200 Å – PolyLC, USA) acoplada ao sistema de HPLC LKB-LCC 2252 (Pharmacia). A eluição foi realizada com gradiente linear, sob vazão de 1 mL/min, tendo como solução A, formiato de amônio 5 mM e ACN 20% (V/V), pH 3,2, e solução B, formiato de amônio 500 mM e ACN 20% (V/V), pH 3,2. O gradiente foi realizado por 10 minutos em 0% de B e por 60 minutos de 0% a 60% de B, coletando 1 mL/tubo. A absorbância foi monitorada automaticamente em 280 nm.

3.2.3. Espectrometria de massas do *pool* de peçonhas

As frações eluídas foram secas em centrífuga rotatória a vácuo (Speed-Vac, Savant), ressuspendidas em 25 μ L de ACN 5% (V/V) e ácido fórmico 0,1% (V/V) e centrifugadas. As amostras (20 μ L) foram aplicadas nos *vials* do espectrômetro de massas, que contém uma coluna de fase reversa para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography* – UPLC) com Ionização por Eletrospray (*Eletrospray Ionization* – ESI), acoplado ao analisador híbrido do tipo QTOF (*Quadrupole – time of flight*) (API-US, Waters, Manchester, UK).

3.2.4. Análise *in silico* das sequências de aminoácidos dos peptídeos

Os espectros obtidos foram interpretados pela versão licenciada do algoritmo Mascot (<http://www.matrixscience.com/>), utilizando os dados depositados em bancos de dados *online* (NCBI e SwissProt) e bancos de dados criados pelo Prof. Dr. José César Rosa (Centro de Química de Proteínas – FMRP/USP), gerados a partir do UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) de sequências proteicas encontradas em peçonhas de *Crotalus durissus* e de outras serpentes. A tolerância de massas dos espectros MS/MS foi ajustada para $\pm 0,8$ Da e cisteínas carbamidometiladas foram selecionadas como modificações fixas e metioninas oxidadas como modificações variáveis. Os resultados que apresentaram $p < 0,05$ foram significativos.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das peçonhas brutas

As peçonhas brutas dessecadas (incluindo o *pool* de peçonhas) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%, com tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguindo o método proposto por Laemmli (1970), em condições desnaturantes, na presença de SDS. Cada peçonha bruta (50 μ g) foi dispersa em água deionizada e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (V/V), em meio neutro e meio ácido, respectivamente, sendo esta última a condição inicial do processo cromatográfico que será discutido posteriormente. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-350 e descorados com solução descorante de ácido acético 10% (V/V). Foram utilizados os marcadores de massa molecular de 97,0 kDa – 14,4 kDa (17-0446-01, GE Healthcare) e de 26,60 kDa – 1,06 kDa (M3546-1VL, Sigma).

3.4. Fracionamento das peçonhas de *C. d. collilineatus*

Inicialmente, 22 mg de cada peçonha bruta dessecada (incluindo o *pool*) foram ressuspensos em 1100 μL de TFA 0,1% (V/V) e 11 μL de ácido fórmico (V/V), centrifugados a 13.000 x g por 10 minutos, a 4 °C.

O fracionamento da peçonha foi realizado seguindo o método proposto por Calvete e colaboradores (2007), em uma coluna de fase reversa C-18 semipreparativa (250 x 10 mm de dimensões e partículas de 5 μm , 300 Å, Phenomenex, USA) conectada ao sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (*Fast Protein Liquid Chromatography* – FPLC, Äkta Purifier UPC 900 – GE Healthcare – Suécia). A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) em TFA 0,1% (V/V), como solução B, sob vazão de 5 mL/min, realizando medidas de absorvância em 214 nm.

As frações eluídas foram coletadas, congeladas e liofilizadas para análises posteriores.

3.5. Estimativa da concentração proteica das frações obtidas

As frações obtidas na cromatografia de fase reversa com colunas C-18 semipreparativa foram ressuspensas em água deionizada e a concentração de proteínas foi estimada utilizando espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), e leitura da absorvância no comprimento de onda de 280 nm.

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das frações obtidas por FPLC

Cada fração (2 μg) eluída da cromatografia de fase reversa foi submetida à análise eletroforética Tricina-SDS-PAGE (16,5%), como descrito por Shagger e Von Jagow (1987). A mesma quantidade de cada fração foi submetida a SDS-PAGE (12,5%), como descrito no item 3.3. Ambas as eletroforeses foram realizadas em condições desnaturantes e reduzidas, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, respectivamente. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-350 e descorados com solução descorante de ácido acético 10% (V/V). Foram utilizados os marcadores de massa molecular de 97,0 kDa – 14,4 kDa (17-0446-01, GE Healthcare) e de 26,60 kDa – 1,06 kDa (M3546-1VL, Sigma). As massas

aproximadas foram determinadas através do software Image Lab, versão 5.2.1, utilizando o fotodocumentador Gel Doc XR (BioRad).

3.7. Identificação de proteínas

3.7.1. Sequenciamento amino-terminal

As frações que apresentaram banda eletroforética única foram submetidas a sequenciamento amino-terminal, de acordo com o método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), em um sequenciador automático de proteínas (PPSQ-33A, Shimadzu), conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram submetidas à análise *in silico*, comparadas com sequências já conhecidas em banco de dados (BLAST), em busca de similaridades.

3.7.2. Análise das frações obtidas em FPLC por espectrometria de massas

Para as análises por espectrometria de massas, as frações obtidas por FPLC foram secas em centrífuga rotatória a vácuo (Speed-Vac, Savant), subsequentemente dispersas em 10 μL de água deionizada e fervidas por 5 minutos. A essas amostras, foram adicionados 20 μL de ACN 50% (V/V) e NH_4HCO_3 0,1 M e 5 μL de DTT 45 mM e as mesmas foram incubadas por 15 minutos a 56 °C. Em seguida, foram adicionados 5 μL de iodoacetamida 100 mM nas amostras, as quais foram incubadas em agitador, no escuro, a temperatura ambiente por 3 horas. Após este período, o volume final foi diluído quatro vezes com NH_4HCO_3 0,1 M. A este volume, foram adicionamos 2,5 μL de tripsina (Promega, USA - 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e, em seguida, esta solução foi incubada por 24 horas a 37 °C, para a digestão das proteínas e peptídeos da amostra. Esta reação foi interrompida com a adição de 5 μL de ácido fórmico. Os peptídeos trípticos resultantes foram dessalinizados por *Reversed-phase Zip Tip C18*. O volume final deste processo (50 μL) foi alíquotado em duas partes (20 μL e 30 μL) e seco em centrífuga rotatória a vácuo (Speed-Vac, Savant). As alíquotas de 20 μL foram dispersas em 25 μL de ACN 5 % (V/V) e ácido fórmico 0,1 % (V/V), centrifugadas e, destas, 20 μL foram aplicadas nos *vials* do espectrômetro de massas do tipo UPLC-ESI-QTOF (API-US, Waters, Manchester, UK). As alíquotas de 30 μL foram dispersas em 6 μL de matriz ácido 4-hidroxicinâmico (CHCA – 5 mg/mL) em TFA 0,1% (V/V) e ACN 50 % (V/V) e aplicada na placa do espectrômetro de massas com Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI),

acoplado ao analisador do tipo TOF (*Time of light*) (Axima Performance, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK). O equipamento foi programado para analisar em modo refletido.

3.7.3. Análise *in silico* das sequências de aminoácidos dos peptídeos obtidos

Os espectros obtidos foram analisados como descrito no item 3.2.4.

3.8. Reconhecimento dos componentes ofídicos e das peçonhas pelo soro anticrotálico comercial

Para a avaliação do reconhecimento das peçonhas de *C. d. collilineatus* pelo soro anticrotálico comercial foi realizado ensaio imunoenzimático de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto.

Microplaca de 96 poços de fundo plano (Costar[®], Corning Incorporated, NY, EUA) foi sensibilizada com 2 µg de proteína (frações ou peçonhas) diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6 (volume total por poço de 100 µL) e incubada a 4 °C, por 16 horas. Como controle positivo, poços da placa foram sensibilizados com imunoglobulina heteróloga contra peçonha de *Crotalus* (soro anticrotálico, lote 1208195, Instituto Butantan), diluída 1:1.000 em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6. Como controle negativo, foram utilizados poços não sensibilizados.

Após a incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa foi lavada três vezes com tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline* – PBS) pH 7,2. Em seguida, os poços foram bloqueados com 250 µL de leite em pó (Molico, São Paulo, SP, Brasil) 2 % diluído em PBS (MPBS) a 37 °C, por 2 horas. A placa foi lavada três vezes com PBS-Tween (PBS-T) 0,05 % e três vezes com PBS. A placa foi incubada a 37 °C, por uma hora, com 100 µL de soro anticrotálico comercial diluído 1:100 em MPBS 1%. A placa foi novamente lavada como descrito anteriormente. Após esta lavagem, a placa foi incubada com 100 µL de anticorpos policlonais anti-cavalo marcados com peroxidase (*anti-horse*, IgG - HRP, A6917, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluídos 1:3.000 em MPBS 1%. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada três vezes com PBS-T e três vezes com PBS. Em cada poço foram adicionados 100 µL de substrato OPD – H₂O₂ (SIGMAFAST OPD *tablet*, SLBM4528V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em 20 mL de água deionizada e uréia (SIGMAFAST *Buffer with urea* H₂O₂, 021M8224, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), conforme instruções do fabricante, e aguardou-se 15 minutos para o

desenvolvimento de cor ao abrigo de luz, sendo esta reação interrompida com 50 μL de H_2SO_4 1 M (Merck[®], São Paulo, Brasil). A leitura da absorbância foi realizada em 490 nm, em leitor de microplacas (*Sunrise-basic Tecan*, Swiss). O ensaio foi realizado em quadruplicata. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.9. Determinação da atividade hialuronidásica por turbidimetria

A atividade hialuronidásica foi determinada turbidimetricamente por modificações do método de Di Ferrante (1956) segundo Pukrittayakamee e colaboradores (1988), mas adaptado para microplacas de 96 poços, como descrito a seguir.

As massas de 2,5 μg e 5 μg de cada peçonha foram incubadas individualmente com tampão acetato de sódio (AcNa) 200 mM e cloreto de sódio (NaCl) 150 mM, pH 6,0, a 37 °C, por 15 minutos, em microplacas de 96 poços com fundo plano. Em seguida, foram adicionados 20 μL de ácido hialurônico (0,5 mg/mL) em cada poço, seguido de nova incubação a 37 °C por 45 minutos (volume final de 100 μL por poço). Para a interrupção da reação, foi adicionado brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) 2,5% (m/V) em hidróxido de sódio (NaOH) 2% (m/V). A leitura da absorbância foi realizada em 400 nm, até 10 minutos após interromper a reação, em leitor de microplacas (*Sunrise-basic Tecan*, Swiss). O ensaio foi realizado em duplicata.

A atividade enzimática foi determinada em porcentagem de hidrólise do ácido hialurônico calculada com base em curva padrão de ácido hialurônico, na qual, o padrão em que não foi adicionado o ácido hialurônico foi considerado como 100% de hidrólise e, o padrão que continha maior concentração de ácido hialurônico (20 μL), foi considerado como 0% de hidrólise.

3.10. Ensaios *in vivo*

Os ensaios em animais descritos neste item foram realizados de acordo com orientações dos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), sob o protocolo nº 15.1.1190.60.8, conforme Certificado de Aprovação (Anexo B).

3.10.1. Animais

Foram utilizados 62 camundongos machos da linhagem Balb/c (19 – 25 g) oriundos do Biotério de Criação da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto (Central). Os animais foram mantidos no Biotério de Criação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em gaiolas com filtros em ambiente climatizado (23 ± 1 °C, 55 ± 5 % de umidade). O período claro-escuro foi de 12 h (7:00 AM – 7:00 PM) e a ração e água foram disponibilizadas *ad libitum*.

3.10.2. Padronização da dose de peçonha de *C. d. collilineatus* para a indução do envenenamento experimental

Grupos de camundongos (n=5) machos Balb/c foram desafiados intramuscularmente (*im*) com 3 diferentes doses não-letais do *pool* de peçonhas de *C. d. collilineatus* (0,01, 0,02 e 0,04 µg/g de animal), baseadas no estudo de Santoro e colaboradores (1999), diluída em solução fisiológica estéril 0,9% em um volume final de 0,1 mL. Grupo de animais controle (n=5) recebeu apenas solução fisiológica.

Para a avaliação do quadro de envenenamento dos animais, os sinais clássicos (Tab. 4) foram observados durante o período de 12 horas. A dose não-letal, que apresentou maior número de sinais de envenenamento, foi utilizada no ensaio seguinte.

Tabela 4. Sinais clássicos de envenenamento pelo gênero *Crotalus* apresentados pelos animais envenenados.

SINAIS	Animais																			
	Grupo 1					Grupo 2					Grupo 3					Grupo 4 (controle)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Edema																				
Prostração																				
Sudorese																				
Sonolência																				
Inquietação																				
Ptose palpebral unilateral																				
Ptose palpebral bilateral																				

3.10.3. Envenenamento dos animais por inoculação das peçonhas de *C. d. collilineatus*

Grupos de camundongos (n=6) machos Balb/c foram desafiados *im* com diferentes peçonhas (as 5 que apresentaram maior variação na composição e o *pool* de peçonhas). A dose utilizada foi de 0,04 µg/g, por não ser letal e induzir o maior número de sinais de envenenamento (item 3.10.2), diluída em solução fisiológica estéril 0,9%. O grupo de animais controle recebeu apenas solução fisiológica.

Após 6 horas do desafio, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 60 mg/Kg de ketamina (Dopalen, Agripands Brasil Ltda[®], Paulínia, SP, Brasil) e 8 mg/Kg de xilazina (Rompun, Bayer Animal Health[®], Porto Alegre, RS, Brasil) para coleta das amostras de 500 µL de sangue pela cavidade retro-orbital. Após a coleta do material, os animais foram rapidamente eutanasiados por decapitação.

Os 500 µL de sangue foram centrifugados a 10.000 x g, 4 °C por 10 minutos, para a obtenção do soro, o qual foi congelado (- 20 °C) até o momento das subsequentes análises.

3.10.4. Avaliação bioquímica laboratorial do soro de animais envenenados pela peçonha de *C. d. collilineatus*

Os parâmetros bioquímicos do soro dos animais envenenados foram determinados em até 24 horas após a coleta do material e incluíam as dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ácido úrico, creatina cinase (CK), creatinina, glicose, lactato desidrogenase (LDH) e uréia.

Estas análises foram realizadas pelo Serviço de Análises Clínicas da FCFRP-USP, utilizando o analisador automático CT600i (Wiener, Rosário, Argentina) e seus respectivos *kits*: GPT (ALT) UV AA líquida, GOT (AST) UV AA líquida, URICOSTAT enzimático AA, CK- NAC UV AA líquida, CREATININA Cinética AA líquida, GLICEMIA Enzimática AA líquida, LDH-P UV AA líquida e UREIA UV Cinética AA (Wiener, Rosário, Argentina).

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.10.5. Avaliação de citocinas e óxido nítrico no soro de animais envenenados pela peçonha de *C. d. collilineatus*

As análises de citocinas foram realizadas utilizando leitor automático de microplacas MAGPIX[®] Luminex[®] (Thermo Fisher Scientific), seguindo instruções do fabricante, e os kits com microesferas magnéticas conjugadas com anticorpos específicos para cada citocina (ProcartaPlex[®], Affymetrix, eBioscience, Vienna, Austria). Foram avaliadas as citocinas IL - 1 β , IL - 2, IL - 4, IL - 5, IL - 6, IL - 10, IL - 12p70, IL - 13, IL - 17a, TNF - α e IFN - γ . Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Fisher's LSD ($p < 0,05$).

Também foi avaliada a presença de nitrito (NO²⁻) no soro dos animais envenenados através do método de Griess (GREEN; GOLDMAN, 1981). A produção de óxido nítrico (NO) é avaliada através de indicador de NO, no caso NO²⁻, produzido durante o ensaio. A concentração de nitrito nas amostras foi determinada através de curva padrão, utilizando diluições de nitrito de sódio (NaNO₂). A leitura da absorbância foi realizada em 540 nm. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise das variações individuais

4.1.1. Inspeção visual das peçonhas

No presente trabalho, analisou-se a ocorrência de variações na composição das peçonhas de 22 indivíduos da subespécie *C. d. collilineatus* (Tab. 3). Todas as peçonhas apresentaram aspecto cristalino e coloração variando entre as cores branca e amarela (Fig. 3).

É importante ressaltar que todos os animais são provenientes da mesma região (Catalão – GO) mantidos no serpentário da FMRP/USP e alimentados com camundongos. Estas características conferem maior homogeneidade às amostras, por reduzir as alterações decorrentes de alimentação e de região geográfica de procedência do animal.

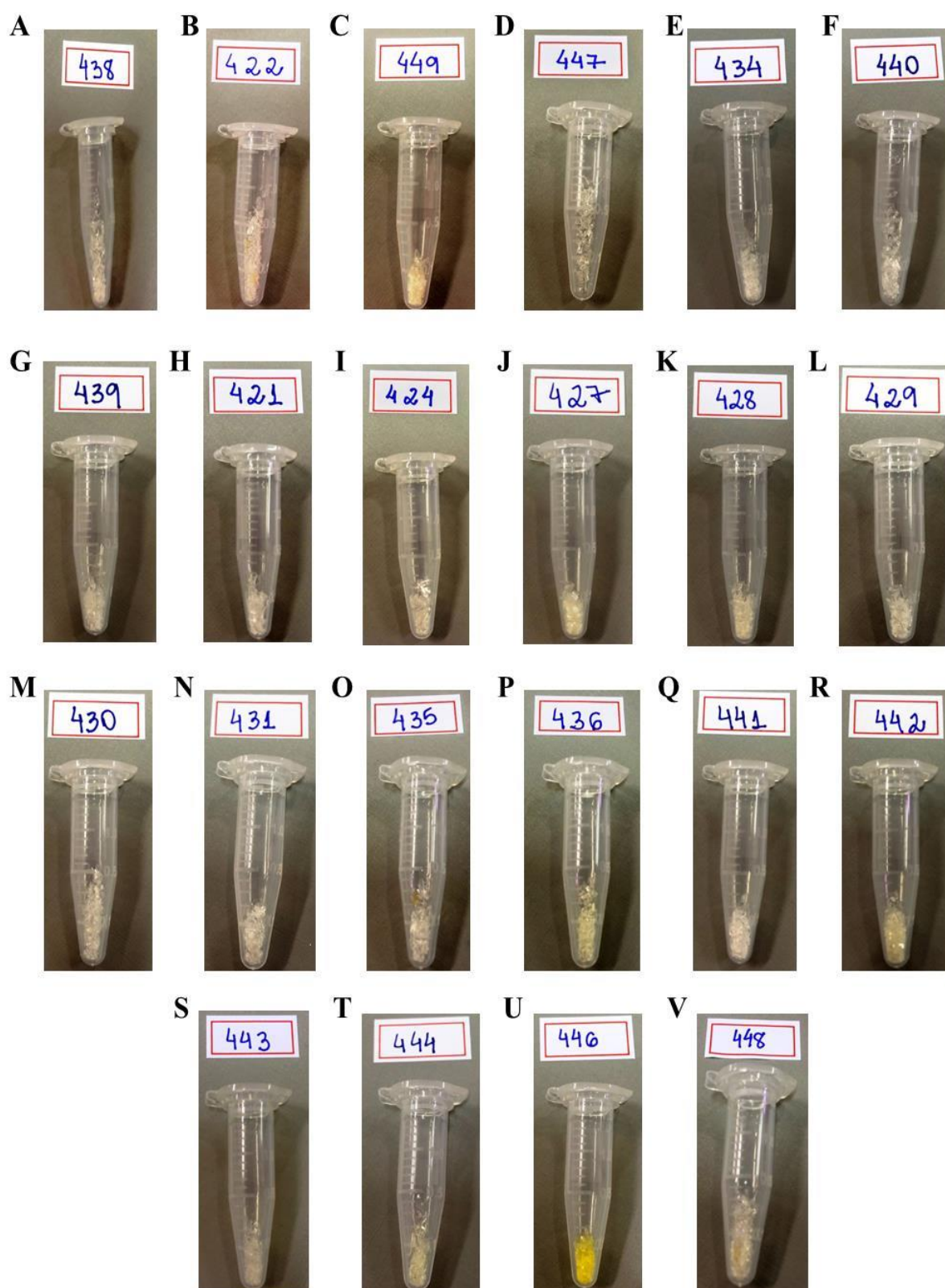


Figura 3. Peçonhas dessecadas a vácuo extraídas de 22 espécimes de *Crotalus durissus collilineatus*. Todas apresentaram aspecto cristalino, apesar de apresentarem diferenças de coloração entre si. Peçonhas (A) 1; (B) 2; (C) 3; (D) 4; (E) 5; (F) 6; (G) 7; (H) 8; (I) 9; (J) 10; (K) 11; (L) 12; (M) 13; (N) 14; (O) 15; (P) 16; (Q) 17; (R) 18; (S) 19; (T) 20; (U) 21; (V) 22. As etiquetas acima de cada microtubo indicam o número do *chip* do espécime utilizado na extração.

O número de peçonhas (22) avaliadas corresponde ao número de *Crotalus durissus collilineatus* mantidas no serpentário da FMRP/USP. Esse número é adequado para este tipo de estudo, visto que propiciará uma análise representativa da peçonha desta população de serpentes. Outros estudos sobre variações individuais utilizaram peçonhas a partir de 5 indivíduos (MENEZES et al., 2006; ALAPE-GIRÓN et al., 2008; KOPPER et al., 2015)

Observa-se na figura 3 que todas as peçonhas dessecadas apresentaram aspecto cristalino, das quais 14 apresentaram cor branca (serpentes 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 17 e 19), 7 apresentaram cor amarelada (serpentes 3, 10, 11, 16, 18, 20 e 22) e apenas o indivíduo 21 apresentou a peçonha com coloração amarela bastante evidente.

As peçonhas ofídicas podem variar entre as cores branca e amarela (SCHENBERG, 1959). A coloração amarela da peçonha ofídica pode ser um indicador da presença da enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) (TU, 1982). Esta enzima é um homodímero (BORDON et al., 2015) que apresenta o cofator dinucleotídico de flavina – adenina (FAD) ou mononucleotídico de flavina (FMN), responsável pela coloração amarela das peçonhas (IZIDORO et al., 2014).

A presença desta enzima pode ser um mecanismo de proteção contra patógenos, levando a apoptose desses através da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado pela deaminação oxidativa de aminoácidos hidrofóbicos (ANDE et al., 2008; IZIDORO et al., 2014).

Embora, nas peçonhas brancas das espécies *Vipera russelli* (DIMITROV; KANKONKAR, 1968) e *Vipera ammodytes* (KORNALIK; MASTER, 1964) também ser detectada a presença de LAAO, a concentração dessa enzima era menor do que na peçonha amarela. As peçonhas destas duas colorações podem ser produzidas no mesmo indivíduo, como em *C. viridis helleri* (DEORAS, 1963; KARDONG; OWNBY, 1987). Para a subespécie *C. d. ruruima* constatou-se que a peçonha branca é mais tóxica que a amarela, já que apresentou menor DL_{50} (DOS SANTOS et al., 1993). Ambas possuem atividades fibrinogenolítica, hemolítica, mionecrótica e edematogênica semelhantes, mas a peçonha amarela apresentou maiores atividades necrótica e hemorrágica (DOS SANTOS et al., 1993).

4.1.2. SDS-PAGE

As peçonhas dessecadas (Fig. 3) foram submetidas à análise em SDS-PAGE, como descrito no item 3.3. O perfil eletroforético de todas as peçonhas, inclusive do *pool* de peçonhas, é mostrado na figura 4.

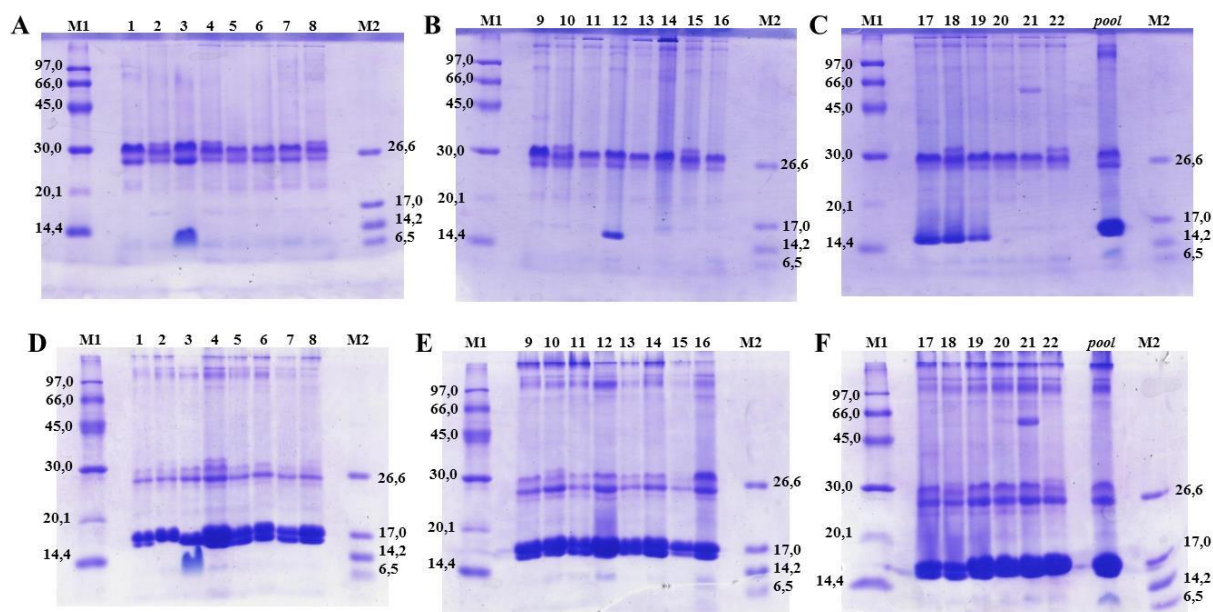


Figura 4. Perfil eletroforético das peçonhas de *C. d. collilineatus* (50 µg) em gel desnaturante de poliacrilamida a 12,5%. As peçonhas ofídicas foram ressuspondidas em água deionizada (géis A-C) ou em TFA 0,1% (géis D-F). M1 – marcador de massa molecular (17-0446-01, GE Healthcare); M2 – marcador de massa molecular (M3546-1VL, Sigma); *pool* – mistura de quantidades iguais de cada uma das 22 peçonhas. Após a eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-350* (GE Healthcare).

As peçonhas ressuspondidas em água deionizada (Fig. 4 A-C) formaram precipitado e os componentes que foram mais evidentes apresentavam massas moleculares entre 26 kDa e 30 kDa, sendo que todas as peçonhas apresentaram 2 ou mais bandas proteicas nesta faixa de massa molecular, variando em intensidade. Em contrapartida, não houve a formação de precipitado nas peçonhas dissolvidas em TFA 0,1% (V/V), e o perfil eletroforético dessas peçonhas (Fig. 4 D-F) apresentou bandas proteicas majoritárias entre 14,4 kDa e 20,1 kDa.

O precipitado observado nas peçonhas ressuspondidas em água pode corresponder ao complexo da crotoxina. Andriani (1995) verificou que quando o pH do meio era igual ao pI (4,7) do complexo da crotoxina, ocorria a formação de precipitado. O autor conseguiu solubilizar esse complexo em solução salina acidificada com ácido clorídrico (HCl), pH 3. Portanto, como a solução de TFA 0,1% (V/V), utilizada para solubilizar as peçonhas aplicadas nas eletroforeses apresentadas na figura 4 D-F, apresenta o pH ente 1,8 e 2,0, não houve a precipitação do complexo da crotoxina e a banda correspondente à mesma foi evidenciada no gel, indicando ser a mesma o componente majoritário da peçonha crotálica.

Geralmente, componentes proteicos são mais solúveis em pHs maiores ou menores que seus pIs. Cargas iguais aumentam a repulsão entre moléculas, levando a uma maior solubilidade. Entretanto, quando o pH de uma solução é igual ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, ou seja, quando a proteína apresenta carga líquida nula no sistema aquoso, as forças eletrostáticas de repulsão são reduzidas, o que aumenta a interação proteína-proteína, havendo

menor interação de proteínas com a água, favorecendo a aproximação de proteínas, que podem se agregar ou precipitar. Assim, quanto mais próximo o pH da solução do pI da proteína, menor será a solubilidade desta (PELEGRINE; GASPARETTO, 2003).

Outras variações também foram nitidamente perceptíveis, como a peçonha 3, que apresentou um componente muito evidente com massa molecular menor que 14 kDa (Fig. 4 A) e as peçonhas 12, 17, 18 e 19 (Fig. 4 B e C), que apresentaram componentes entre 20 kDa e 14 kDa. A peçonha 21 também apresentou um componente nitidamente visível entre 45 kDa e 66 kDa (Fig. 4 C), podendo ser a enzima LAAO, pois esta apresenta massa molecular entre 50 kDa e 70 kDa, quando avaliada por SDS-PAGE (DU; CLEMETSON, 2002), justificando a cor amarela da peçonha 21. A massa molecular do monômero da LAAO de *C. d. terrificus* foi estimada em 53 kDa por SDS-PAGE (BORDON et al., 2015).

Em relação aos perfis eletroforéticos das peçonhas ressuspendidas em TFA 0,1% (Fig. 4. D, E e F), além do componente majoritário, que deve ser a crotoxina, como citado anteriormente, e as mesmas variações citadas em relação aos perfis eletroforéticos das peçonhas ressuspendidas em água, também foi observado em todas as amostras a presença de vários componentes de alta massa molecular (acima de 97 kDa). Estes estão nitidamente visíveis nos géis e apresentam grande variabilidade entre as peçonhas avaliadas.

4.1.3. Variações individuais por análise proteômica

Técnicas de espectrometria de massas tem sido de grande importância em pesquisas de interesse biológico, já que são capazes de identificar nas amostras analisadas a presença de proteínas já depositadas em bancos de dados com muita eficiência (CALVETE, 2011). Para tal identificação, dois dados são utilizados, sendo o primeiro a informação sobre a massa molecular dos peptídeos provenientes de digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint - PMF*) e o segundo é a fragmentação e sequenciamento dos peptídeos obtidos (CANTÚ et al., 2008).

Cantú e colaboradores (2008) descreveram o estudo proteômico em apenas seis passos:

1. As proteínas de interesse devem ser isoladas;
2. As proteínas de interesse devem ser convertidas em peptídeos utilizando enzimas que promovem a clivagem das proteínas em locais específicos. Por exemplo, a enzima tripsina promove a clivagem de proteínas quando encontra um aminoácido arginina e/ou lisina;

3. Estes peptídeos devem ser separados através de cromatografia líquida acoplada ou não ao espectrômetro de massas. Os peptídeos serão ionizados por ESI ou por MALDI, sendo que por ESI, os peptídeos recebem duas ou mais cargas positivas, e por MALDI, os peptídeos recebem apenas uma carga positiva. Após a ionização, os peptídeos são transferidos para o analisador de massas;
4. Os espectros de massas desses peptídeos são obtidos, indicando a relação massa/carga (m/z) e, também, a massa molecular dos peptídeos, ou seja, este passo é o PMF;
5. Estes peptídeos detectados em PMF, também chamados de íons precursores, são submetidos a colisão com moléculas de gás inerte. Em outras palavras, são submetidos a fragmentação, resultando em espectros de fragmentação ou MS/MS;
6. Por último, estes resultados combinados são analisados utilizando softwares, como *Mascot* ou *Sequest*, para identificar homologias com as proteínas depositadas em bancos de dados.

Outra técnica de espectrometria de massas que, também, é utilizada para a identificação de proteínas é a *Shotgun Proteomic* ou cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), onde a identificação de proteínas é realizada diretamente a partir de uma mistura complexa. Esta mistura é digerida por uma enzima e, posteriormente, separada por dois métodos cromatográficos, sendo o primeiro uma troca catiônica, e o segundo, uma fase reversa. Após a separação, a amostra é transferida para o espectrômetro de massas e a análise é realizada como descrito acima para o MS/MS (NESVIZHSKI; AEBERSOLD, 2005; CARNIELLI, 2013).

Considerando a eficiência do *Shotgun Proteomic* para a caracterização de misturas complexas de proteínas, o *pool* de peçonhas foi analisado, como descrito no item 3.2, com o intuito de se obter uma visão global dos componentes presentes nas 22 peçonhas. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Identificação de proteínas encontradas no *pool* de peçonhas de *C. d. collilineatus* a partir da técnica de LC-MS.

Proteína (Espécie)	Acesso	*MM da proteína (Da)	Peptídeos	*MM do peptídeo (Da)	Carga	m/z
			123456789012345678901234567890			
Convulxina subunidade α (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	O93426	18.141,10	GLHCPDWDYDQHCYR	2.318,71	3+	773,91
			IFNEEMNWEDAWEFCTK	2.247,93	2+	1.124,97
			MVTQNIIESFSHVSIGLR	2.046,07	3+	683,03
			VTQNIIESFSHVSIGLR	1.915,01	3+	693,34
			WVASCIGK	1.066,24	2+	534,28
			WSDGSSVSYDNLDDLYITK	2.175,03	2+	1.088,25
Convulxina subunidade β (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	O93427	17.402,3	CNWQWSDGKPEYKEWHEEFCECLISR	3.414,17	4+	854,55
			EWHEEFCECLISR	1.633,74	2+	817,88
			STFFWIGANNIWNK	1.696,75	2+	849,38
			CNWQWSDGKPEYK	1.797,81	3+	600,28
Crotamina (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	O73799	7.391,40	ICIPSSDFGK	1.219,55	2+	610,78
Crotocetina (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	Q719L9	18.198,80	ETEFLQWYNTDCEEK	1.990,84	2+	996,43
			WSDGSSVNYENLLK	1.610,73	2+	806,37
Enzima bilineobina semelhante a trombina (<i>Agkistrodon bilineatus</i>)	Q9PSN3	26.478,90	WDKDIMLIR	1.188,65	2+	595,33
			SEHIAPLSLSPSSPPIVGSVCR	2.202,19	3+	735,07
			IAPLSLSPSSPPIVGSVCR	1.848,94	2+	925,48
			SLPSSPPIVGSVCR	1.454,75	2+	728,38
			PSSPPIVGSVCR	1.254,67	2+	628,34
			PPIVGSVCR	983,55	2+	492,78
Enzima contortrixobina semelhante a trombina (<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>)	P82981	25.413,00	VFDHLDWIQSI IAGN	1.726,87	2+	864,44
			LDSRVSNSEHIAPLSLSPSSPPSVGSVCH	2.929,39	3+	977,47
Enzima conversora de angiotensina (<i>Ophiophagus hannah</i>)	V8NKA6	143.625,50	NDEVLDKDIMLIK	1.544,84	2+	773,43
			ALDPLDLDTMAK	1.289,65	2+	645,83
Enzima semelhante a trombina (<i>Trimeresurus albolabris</i>)	A7LAC6	29.150,20	~MVLITVLANLLILQLSYAQKSELVIDD	2.985,65	4+	747,42
Fator de crescimento neural (<i>Naja sputatrix</i>)	Q5YF89	27.030,30	WDKDIMLIR	1.188,65	2+	595,33
			EDSLNRNIRAKR	1.453,69	3+	485,57
Fator de crescimento neural (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	Q9DEZ9	27.118,60	ALTMENQASWR	1.362,52	2+	682,27
			ALTMENQASWR	1.362,52	2+	682,27
			IDSACVCVISR	1.278,63	2+	640,32
			HWNSYCTTTNTFVK	1.757,79	2+	879,9
Fosfodiesterase (<i>Crotalus adamanteus</i>)	J3SEZ3	96.376,00	AGYLENWDLSLMPNINK	1.863,86	2+	932,94
			EQSSPLSCLPFGPVPSPDVSCK	2.331,07	2+	1.166,54
			IDKVNLMVDQQWMAVR	1.945,02	2+	973,52
			KTFLPIFVNPVN~	1.387,80	2+	694,91
			LWNYFHHTLIPK	1.531,79	2+	766,9
			NPAWWGGQPIWHTATY	1.883,90	2+	942,96
			NPAWWGGQPIWHTATYQGLK	2.310,05	3+	771,02
			QAIFLAHGPGFNEK	1.527,81	2+	764,91

			QPLPETLQLK	1.165,68	2+	583,85
			SMQAIFLAHGPGFNEK	1.745,87	2+	873,94
			SQDILMPLWSSYTIYR	1.971,97	2+	986,99
			TESEAHNLPYGRQPVLQNHKS	2.404,10	3+	802,37
			VLSFILPHRPDNSESCADTSPENLWVEER	3.396,59	4+	850,15
			VNLMVDQQWMAVR	1.588,80	2+	795,41
			WNYFH TTLIPK	1.418,76	2+	710,39
Fosfolipase A ₂ (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	P08878	15.272,80	AAAI CFR	807,43	2+	404,73
			CCFEHDCCYAK	1.548,58	2+	775,3
			CGAGGQGWPQDASDR	1.560,65	2+	781,33
			GCYCGAGGQGWPQDASDR	1.940,73	2+	971,37
			GSLVEFETLMMK	1.383,70	2+	692,86
			LTGCDPTTDVYTYR	1.660,65	2+	831,33
			NSMDTYDYK	1.135,48	2+	568,75
			SLVEFETLMMK	1.326,56	2+	664,29
			SSYGICYGAGGQGWPQDASDR	2.277,87	2+	1.139,94
			YCGAGGQGWPQDASDR	1.723,72	2+	862,87
Fosfolipase A ₂ (<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>)	P18998	15.210,90	AAAI CFR	807,44	2+	404,73
			CCFEHDCCYAK	1.531,53	2+	766,77
			CGAGGQGWPQDASDR	1.560,65	2+	781,33
			GCYCGAGGQGWPQDASDR	1.940,73	2+	971,37
			LTGCDPTTDVYTYR	1.660,65	2+	831,33
			RFSPE NCQGESQPC~	1.694,72	2+	848,37
			SSYGICYGAGGQGWPQDASDR	2.277,87	2+	1.139,94
			YCGAGGQGWPQDASDR	1.723,72	2+	862,87
			YGICYGAGGQGWPQDASDR	2.103,82	2+	1.052,92
Fosfolipase A ₂ (<i>Crotalus durissus ruruima</i>)	P86169	14.199,70	AFYGCYCGWGGR	1.452,58	2+	727,3
			CCFVHDCCY GK	1.504,59	3+	502,54
			CNTKWDIYPYSLK	1.686,84	2+	844,43
			GTWCEEQICECDR	1.741,52	2+	871,77
			~HLLQFNK	898,52	2+	450,27
			KNAIPFYAF	1.069,56	2+	535,79
			KNAIPFYAFY	1.232,67	2+	617,34
			KNAIPFYAFYGCYCGWGGR	2.285,99	3+	763
			KYGYMFYPDSR	1.425,66	2+	713,84
			NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2.157,81	2+	1.079,91
			SGYITCGK	884,42	2+	443,22
			VAAECLR	817,44	2+	409,73
			WDIYPYSLK	1.183,49	2+	592,75
			YAFYGCYCGWGGR	1.615,61	2+	808,81
			YGYMFYPDSR	1.297,54	2+	649,78
Fosfolipase A ₂ (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	P24027	15.968,60	CCFVHDCCY GK	1.504,59	3+	502,54
			KNAVPFYAFYGCYCGWGQGR	2.457,14	3+	820,05

			KNAVPFYAFYGCYCGWGGQGRPK	2.682,02	4+	671,51
			NAVPFYAFYGCYCGWGGQGR	2.328,99	2+	1.165,5
			NAVPFYAFYGCYCGWGGQGRPK	2.554,15	3+	852,39
			NEYMFYPDSR	1.320,51	2+	661,26
			SGYITCGK	884,42	2+	443,22
			SLSTYKNEYMFYPDSR	1.999,92	2+	1.000,97
			VAAECLR	817,44	2+	409,73
Fosfolipase A ₂ (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	P0CG56	14.167,40	CCFVHDCCYGK	1.504,59	3+	502,54
			GTWCEEQICECDR	1.741,52	2+	871,77
			~HLLQFNK	898,52	2+	450,27
			KNAVPFYAFYGCYCGWGGQGR	2.457,14	3+	820,05
			KNAVPFYAFYGCYCGWGGQGRPK	2.682,02	4+	671,51
			KNGYMFYPDSR	1.377,60	2+	689,8
			LSTYKNGYMFYPDSR	1.839,86	2+	920,94
			NAVPFYAFYGCYCGWGGQGR	2.328,99	2+	1.165,5
			NAVPFYAFYGCYCGWGGQGRPK	2.554,15	3+	852,39
			NGYMFYPDSR	1.248,54	2+	625,28
			SGYITCGK	884,42	2+	443,22
			SLSTYKNGYMFYPDSR	1.928,90	3+	643,98
			VAAECLR	817,44	2+	409,73
Fosfolipase A ₂ (<i>Crotalus durissus ruruima</i>)	P0CAS3	14.334,70	KNAIPFYAF	1.069,56	2+	535,79
			KNAIPFYAFY	1.232,67	2+	617,34
			NAIPFYAFYGCYCGWGGQGRPK	2.568,18	3+	857,07
			VAAECLR	817,44	2+	409,73
			YGYMIYPDSR	1.279,55	2+	640,78
Fosfolipase A ₂ (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	P0CAS5	14.480,00	CCFVHDCCYGK	1.487,40	2+	744,71
			PFYAFYGCYCGWGGQGR	1.987,90	2+	994,96
			VAAECLR	817,44	2+	409,73
Fosfolipase A ₂ ácida (<i>Calloselasma rhodostoma</i>)	Q9PVF1	14.369,80	GSLVQFETMIMK	1.383,70	2+	692,86
			SLVQFETMIMK	1.326,61	2+	664,31
Fosfolipase A ₂ ácida (<i>Lachesis stenophrys</i>)	P84651	13.901,90	~HLLQFGDLIDK	1.298,70	2+	650,36
Fosfolipase A ₂ ácida (<i>Sistrurus catenatus tergeminus</i>)	Q6EAN6	15.429,10	SSYGCYCGTGGQGWPDASDR	2.306,93	2+	1.154,47
			CCFRHDCCYAK	1.531,49	2+	766,75
Fosfolipase A ₂ ácida (<i>Trimeresurus gramineus</i>)	P70088	15.722,50	YGSYGCYCGKGGQLPDASDR	2.393,95	2+	1.197,98
			CCFVHDCCYGK	1.487,40	2+	744,71
			AAAICFR	807,44	2+	404,73
Fosfolipase A ₂ básica (<i>Lachesis muta muta</i>)	P0C942	14.278,70	KNAIPFYAF	1.069,56	2+	535,79
			KNAIPFYAFY	1.232,67	2+	617,34
			KNAIPFYAFYGCYCGWGGGR	2.285,99	3+	763
			NAIPFYAFYGCYCGWGGGR	2.157,81	2+	1.079,91
			YAFYGCYCGWGGGR	1.615,61	2+	808,81
			AFYGCYCGWGGGR	1.452,58	2+	727,3
			CCFVHDCCYGK	1.487,40	2+	744,71

			SGYLTCGK	884,41	2+	443,22
			GTWCEEQICECDR	1.741,52	2+	871,77
			VAAECLR	817,44	2+	409,73
			KYGYMFYPDSR	1.425,66	2+	713,84
			YGYMFYPDSR	1.297,54	2+	649,78
Giroxina B1.3 (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	B0FXM1	29.347,00	CAGVLEGGIDTCHR	1.543,71	2+	772,86
			DKDIMLIR	1.002,58	2+	502,3
			HILLYVGVHDR	1.320,71	2+	661,36
			IAPLSLPSSPPIVGSVCR	1.848,94	2+	925,48
			IICAGVLEGGIDTCHR	1.769,90	2+	885,96
			LNKPVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVCR	3.003,52	4+	751,89
			PPIVGSVCR	983,55	2+	492,78
			PSSPPIVGSVCR	1.254,67	2+	628,34
			PVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVCR	2.648,41	3+	883,81
			SEHIAPLSLPSSPPIVGSVCR	2.202,19	3+	735,07
			SLPSSPPIVGSVCR	1.454,75	2+	728,38
			SPQETLPDVPHCANINLLDYEVC	2.839,32	3+	947,45
			SYSEHIAPLSLPSSPPIVGSVCR	2.452,29	3+	818,44
			WDKDIMLIR	1.188,57	2+	595,29
Giroxina B1.4 (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	B0FXM2	29.261,90	DKDIMLIR	1.002,58	2+	502,3
			IICAGVLEGGIDTCNR	1.746,78	2+	874,4
			NNEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR	2.317,12	2+	1.159,57
			SLPSSPPSVGSVCR	1.428,71	2+	715,36
			THFLIYVGVHDR	1.455,67	3+	486,23
			VFDHLDWIQSI IAGN	1.726,87	2+	864,44
			WDKDIMLIR	1.188,65	2+	595,33
Glutaciona Peroxidase (<i>Ophiophagus hannah</i>)	V8P395	29.588,50	LVILGFPCNQFGK	1.491,81	2+	746,91
			QEPGQNSEILQGIK	1.539,72	2+	770,87
			HVRPGGGFVPNFQLFQK	1.926,99	3+	643,34
			FLVNPQGKPVMR	1.384,77	3+	462,6
Hialuronidase (<i>Crotalus adamanteus</i>)	J3S820	52.486,20	APMYPNEPFLVFWNAPTQCR	2.538,18	3+	847,07
			DLHPELSEDEIKR	1.579,81	3+	527,61
			DYALPVFPYAR	1.310,70	2+	656,36
			HSDSNAFLHLFPDSFR	1.888,72	4+	473,19
			KDYALPVFPY	1.211,63	2+	606,82
			NNQLLWLWR	1.241,66	2+	621,84
			TFHGLGVIDWENWR	1.728,83	2+	865,42
			TFHGLGVIDWENWRPQWDR	2.410,92	3+	804,65
Hialuronidase (<i>Echis ocellatus</i>)	A3QVN2	52.545,30	APMYPNEPFLVFWNAPTQCR	2.538,18	3+	847,07
			TFHGLGVIDWENWR	1.728,83	2+	865,42
			TFHGLGVIDWENWRPQWDR	2.410,92	3+	804,65
			NDQLLWLWR	1.241,66	2+	621,84
Hialuronidase (<i>Protobothrops flavoviridis</i>)	A0A077L860	60.401,60	APMYPNEPFLVFWNAPTQCR	2.538,18	3+	847,07

			TFHGLGVIDWENWRPQWDR	2.410,92	3+	804,65
			TKPDQYTGECPDIEMSR	2.025,88	2+	1.013,95
			NNQLLWLWR	1.241,68	2+	621,85
			DYMDGPLGR	1.022,48	2+	512,25
			HSDSNAFLHLFPDSFR	1.888,72	4+	473,19
L-aminoácido oxidase (<i>Crotalus durissus cumanensis</i>)	K9N7B7	56.829	DWYANLGPMR	1.221,59	2+	611,8
			ETDYEEFLEIAR	1.513,72	2+	757,87
			NNPGILEYPVKPSEEGK	1.869,97	3+	624,33
			YAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPFKR	3.108,58	4+	778,15
Membro da família fosfodiesterase/pirofosfatase ectonucleotídeo (<i>Ophiophagus hannah</i>)	V8PBN7	26.513,00	FVSPLTLVAEER	1.359,76	2+	680,89
Membro da família fosfodiesterase/pirofosfatase ectonucleotídeo (<i>Ophiophagus hannah</i>)	V8P682	100.917,10	WWGGQPIWITAAK	1.512,80	2+	757,41
			AGTFFWSNVI PYER	1.685,80	2+	843,91
			RIEDIHLLVER	1.391,69	3+	464,9
Metaloprotease - desintegrina (<i>Crotalus atrox</i>)	P34182	53.638,10	IECDCGSLNPCCYATTCK	2.336,90	2+	1.169,46
			IENDADSTASISACNGLK	1.864,86	2+	933,44
			ITTNPSVEDHCYYHGR	1.947,69	3+	650,24
			PSVEDHCYYHGR	1.518,51	2+	760,26
			YEDTMQYELK	1.318,54	2+	660,28
Metaloprotease - desintegrina (<i>Crotalus viridis viridis</i>)	C9E1R9	53.813,50	EPLKFPDSEAHAVFK	1.716,83	2+	859,42
			ESGNVNDYEVVYPR	1.639,77	2+	820,89
			IENDADSTASISACNGLK	1.864,86	2+	933,44
			IILESGNVNDYEVVYPR	1.978,97	2+	990,49
			IILESGNVNDYEVVYPR	1.865,93	2+	933,97
Metaloprotease - desintegrina (<i>Crotalus adamanteus</i>)	F8S108	67.909,60	ESGNVNDYEVVYPR	1.639,77	2+	820,89
			IENDADSTASISACNGLK	1.864,86	2+	933,44
			IILESGNVNDYEVVYPR	1.865,93	2+	933,97
			MYDIVNVITPIYHR	1.732,93	3+	578,65
Metaloprotease semelhante a desintegrina (<i>Deinagkistrodon acutus</i>)	Q9W6M5	68.542,60	IILESGDVNDYEVVYPR	1.865,93	2+	933,97
			ESGDVNDYEVVYPR	1.639,75	2+	820,88
Metaloprotease semelhante a desintegrina (<i>Macrovipera lebetina</i>)	Q4VM07	68.843,50	VNGKPVVLHLEK	1.331,77	2+	666,89
Metaloprotease - desintegrina (<i>Trimeresus gramineus</i>)	P15503	53.494,10	IENDADSTASISACDGLK	1.864,86	2+	933,44
Metaloprotease jerdonitina (<i>Protobothrops jerdonii</i>)	P83912	54.613,80	ESGNIDDYEVVYPR	1.639,77	2+	820,89
Metaloprotease PII (<i>Crotalus durissus collilineatus</i>)	C0L2T8	53.639,10	DLINVQPAAPNTLK	1.492,84	2+	747,43
			IECDCGSIENPCCYATTCK	2.336,90	2+	1.169,46
			IENDADSTASISACNGLK	1.864,86	2+	933,44
			ITTNPSVEDHCYYHGR	1.947,69	3+	650,24
			LRPGSQCAEGMCCDQCR	2.083,89	3+	695,64
			MCGVTQNWESNEPIK	1.791,76	2+	896,89

			MCGVTQNWESNEPIKK	1.919,92	3+	640,98
			VNGQPVVHLHEK	1.381,77	2+	666,89
			VSLVNKNDDTCTGQSADCP	2.237,02	3+	746,68
			YEDTMQYELK	1.318,54	2+	660,28
NADH desidrogenase (<i>Crotalus culminatus</i>)	Q58XS2	24.278,80	~LKQGGYGIIR	1.102,69	2+	552,35
Peptídeo Glutaminil-ciclotransferase (<i>Boiga dendrophila</i>)	A7ISW2	41.991,30	MWQNDLHPIL	1.265,62	2+	633,82
			MWQNDLHPILIER	1.663,88	2+	832,95
			QNDLHPILIER	1.346,77	2+	674,39
			LQGLQAGWLVEEDTFQSHTPYGYR	2.794,36	3+	932,46
			LIFFDGEEAFVR	1.441,74	2+	721,88
			NPVFPVYFLNTAR	1.536,84	2+	769,43
			RGVPILHLIPSPFPR	1.698,00	3+	567,01
			GVPILHLIPSPFPR	1.541,93	2+	771,97
			PILHLIPSPFPR	1.385,84	2+	693,93
Peptídeo glutaminil-ciclotransferase (<i>Gloydus blomhoffii</i>)	Q90YA8	42.268,70	MWQNDLHPIL	1.265,83	2+	633,82
			MWQNDLHPILIER	1.663,88	2+	832,95
			QNDLHPILIER	1.346,77	2+	674,39
			LQGLQAGWLVEEDTFQSHTPYGYR	2.794,36	3+	932,46
			LIFFDGEEAFVR	1.441,74	2+	721,88
			NPVFPVYFLNTAR	1.536,84	2+	769,43
			NLYDLGLLNYSSE	1.769,81	2+	885,91
			HPVEDDHIPFLR	1.473,63	3+	492,22
			RGVPILHLIPSPFPR	1.698,0	3+	567,01
			GVPILHLIPSPFPR	1.541,93	2+	771,97
			PILHLIPSPFPR	1.385,84	2+	693,93
Serinoprotease (<i>Crotalus atrox</i>)	Q8QHK2	27.909,30	DDVLDKDIMLIK	1.416,75	2+	709,38
			KDDVLDKDIMLIK	1.544,84	2+	773,43
			LLDDAVCQPPYPELPATSR	2.141,06	3+	714,69
			SLPSSPPSVGSGVCHIMGWSITPIEK	2.722,37	3+	908,46
			TLPDVPYCANIK	1.389,71	2+	695,86
Serinoprotease (<i>Crotalus adamanteus</i>)	J3RY93	28.727,80	FLVALYDPDR	1.207,60	2+	604,81
			LDSFVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGCVCR	2.888,44	3+	963,82
			SLPSSPPSVGCVCR	1.428,71	2+	715,36
			VFDHLDWIQSIIAGN	1.726,87	2+	864,44
			WDKDIMLIR	1.188,65	2+	595,33
Serinoprotease (<i>Crotalus adamanteus</i>)	J3SDW9	27.414,80	CADINIFDYEVC	1.673,71	2+	837,86
			GDILVLLGVHR	1.190,71	2+	596,36
			IAPLSLPSNPPSVGCVCR	1.849,93	2+	925,97
			LDSFVNSTHIAPLSLPSNPPSVGCVCR	2.913,55	3+	972,19
Serinoprotease (<i>Crotalus durissus durissus</i>)	Q2QA04	28.271,00	CADINIFDYEVC	1.673,71	2+	837,86
			DKDIMLIR	1.002,58	2+	502,3
			GDILVLLGVHR	1.190,71	2+	596,36

			IAPLSLPSNPPSVGSVCR	1.849,93	2+	925,97
Serinoprotease (<i>Gloydius brevicaudus</i>)	Q9YGJ9	28.180,40	SNSAHIAPLSLPSPPSVGSVCR	2.318,18	3+	773,73
Serinoprotease (<i>Bothrops jararaca</i>)	Q5W958	27.815,90	NSEHIAPLSLPSNPPSVGSVCR	2.318,15	3+	773,72
			IAPLSLPSNPPSVGSVCR	1.849,93	2+	925,97
5'-nucleotidase (<i>Crotalus adamanteus</i>)	F8S0Z7	64.683,30	ALGHSGFSEDQR	1.302,63	2+	652,32
			ALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	2.106,16	3+	703,06
			DISEDQDIKAEVVK	1.602,80	3+	535,28
			ETPVLSNPGPYLEFR	1.717,84	2+	859,93
			ETPVLSNPGPYLEFRDEVEELQNHANK	3.124,48	4+	782,13
			FHECNLGNLICDAVIYNNVR	2.420,15	3+	807,72
			HANFPILSANIRPK	1.576,79	3+	526,6
			HGEGMGELLQVSGIK	1.553,73	2+	777,87
			HPDDNEWNHVMCIVNGGGIR	2.405,87	3+	802,97
			I IALGHSGFSEDQR	1.528,79	3+	510,6
			LLLPSFLAAGGDGYHMLK	1.901,97	2+	951,99
			LPSFLAAGGDGYHMLK	1.675,87	2+	838,94
			NVIFDDKGNVIK	1.360,75	2+	681,38
			PSFLAAGGDGYHMLK	1.562,73	2+	782,39
			SFELTILHTNDVHAR	1.751,87	3+	584,96
			YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	2.586,29	3+	863,11
			YLGYNVIFDDK	1.458,77	2+	730,39
PREVISTA: Carboxipeptidase (<i>Python bivittatus</i>)	gi 602664721	53.967,30	NSLISYIEQIHR	1.471,81	3+	491,61
			VDFDLESLSER	1.308,63	2+	655,32
PREVISTA: Carboxipeptidase isoforma X1 (<i>Python bivittatus</i>)	gi 602655746	55.045,20	YASPSQGDPGQPLFLTPYIESGK	2.451,28	3+	818,1
PREVISTA: Enzima conversora de angiotensina (<i>Python bivittatus</i>)	gi 602635271	129.728,80	LLYAWEGWHNSAGNPLR	1.983,01	3+	662,01

*MM: massa molecular. Os dados de massas moleculares (Da) foram buscados no UniProtKB.

A partir da técnica de LC – MS, como descrito no item 3.2, foram identificadas 16 famílias de proteínas, entre elas estão a carboxipeptidase, convulxina, crotamina, crotocetina, enzima conversora de angiotensina (ECA), fosfodiesterase, fosfolipase A₂, glutaciona peroxidase, glutaminil ciclotransferase, hialuronidase, LAAO, metaloprotease, NADH desidrogenase, NGF, serinoprotease e 5'-nucleotidase, que serão discutidas posteriormente, bem como, pode-se estimar a abundância relativa de cada uma dessas famílias, evidenciando que o complexo da crotocetina é realmente majoritário nestas peçonhas, o que corrobora com dados proteômicos de Boldrini-França e colaboradores (2010) (Fig. 5).

Os peptídeos trípticos encontrados apresentaram homologia com proteínas presentes no gênero *Crotalus*, como é o caso de crotamina, hialuronidase, LAAO, fosfolipase A₂, NADH desidrogenase, crotocetina, convulxina, 5'-nucleotidase, fosfodiesterase, serinoprotease e NGF, embora, apenas alguns peptídeos apresentaram homologia com proteínas da subespécie *C. d. collilineatus*, como a metaloprotease (Tab. 5).

Além disso, os peptídeos trípticos também apresentaram homologia com proteínas de outros gêneros de serpentes, como *Lachesis*, *Bothrops*, *Naja*, *Trimeresurus*, *Boiga*, *Ophiophagus*, *Agkistrodon*, *Calloselasma*, *Deinagkistrodon*, *Demansia*, *Gloydius*, *Macrovipera*, *Echis*, *Protobothrops*, *Sistrurus* e *Python*, de forma que estes componentes presentes nestas peçonhas crotálicas apresentam resíduos conservados, aumentando a similaridade entre as proteínas (Tab. 5).

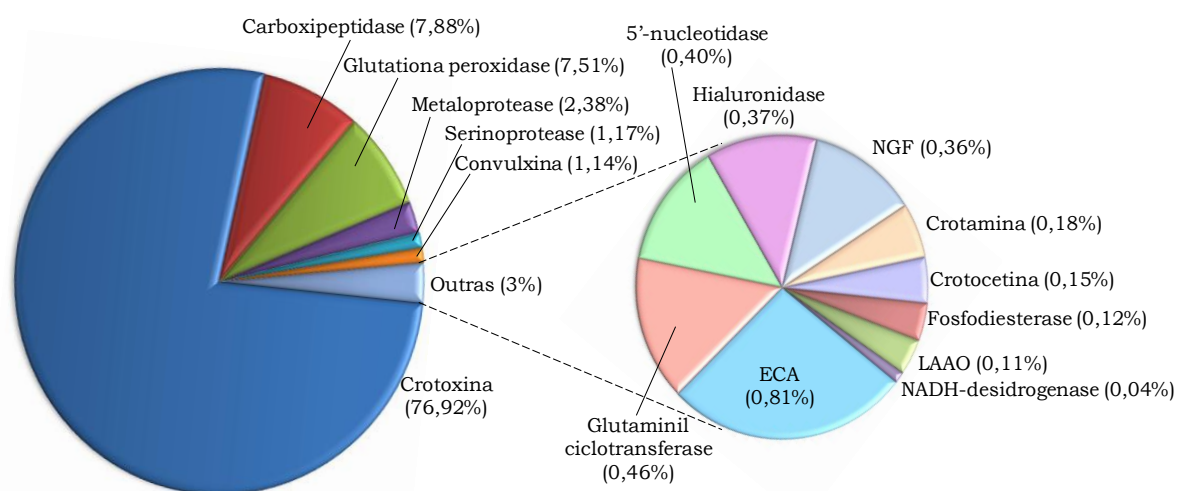


Figura 5. Perfil proteômico quantitativo do pool de peçonhas de *C. d. collilineatus*. Os gráficos apresentam a abundância relativa de cada família proteica obtidas através da técnica de LC-MS ou *Shotgun Proteomic* do pool das 22 peçonhas de *C. d. collilineatus*. NGF: Fator de crescimento neural; LAAO: L-aminoácido oxidase; ECA: Enzima conversora de angiotensina.

Foi a primeira vez que esta técnica foi utilizada para a identificação de proteínas na peçonha da subespécie *C. d. collilineatus* e, desta forma, podemos ter uma visão geral sobre as proteínas que fazem parte da composição das 22 peçonhas crotálicas analisadas e que podem inferir na fisiopatologia do envenenamento.

Este estudo também evidencia componentes que não foram descritos nas peçonhas de *C. d. collilineatus* até o momento, mostrando o quanto estas peçonhas são complexas e também, podendo aumentar o conhecimento das peçonhas crotálicas e os dados presentes em bancos de dados desta subespécie de serpente.

Adicionalmente ao ensaio *Shotgun Proteomic*, que evidenciou a grande complexidade da composição da peçonha de *C. d. collilineatus*, as 22 peçonhas, bem como o *pool* destas 22 peçonhas, foram analisadas por RP-FPLC, seguindo a metodologia proposta por Calvete e colaboradores (2007) no projeto “*Snake Venomics*”. Estes ensaios foram realizados objetivando a identificação de variações individuais relevantes na composição das peçonhas. Os perfis cromatográficos estão apresentados nas figuras 6 a 17.

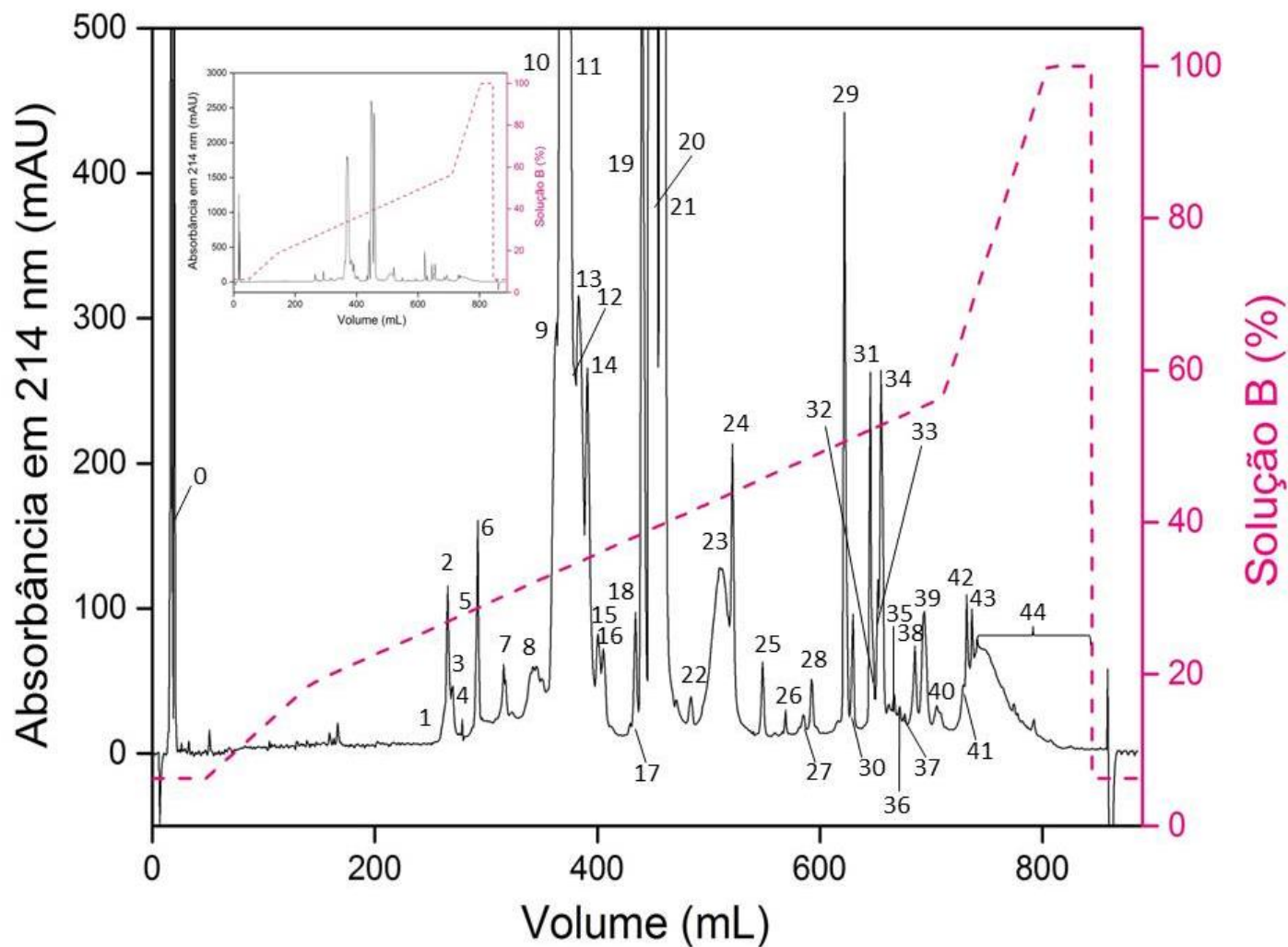
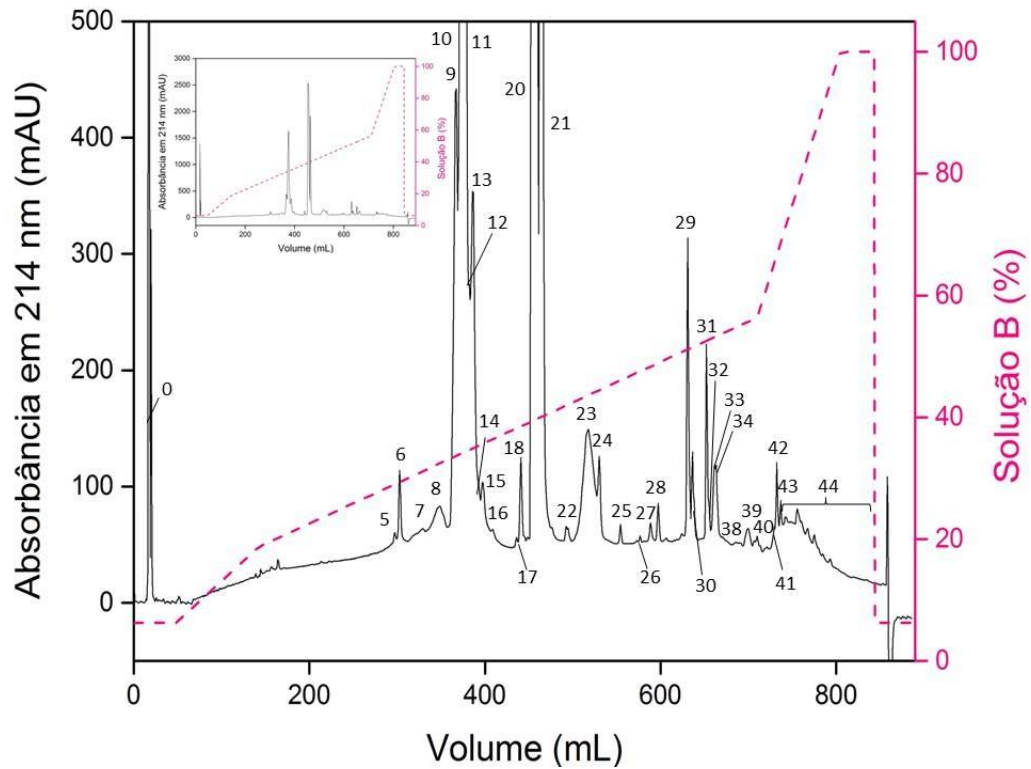


Figura 6. Perfil cromatográfico do fracionamento do pool de peçonhas de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 µm, 300 Å, Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

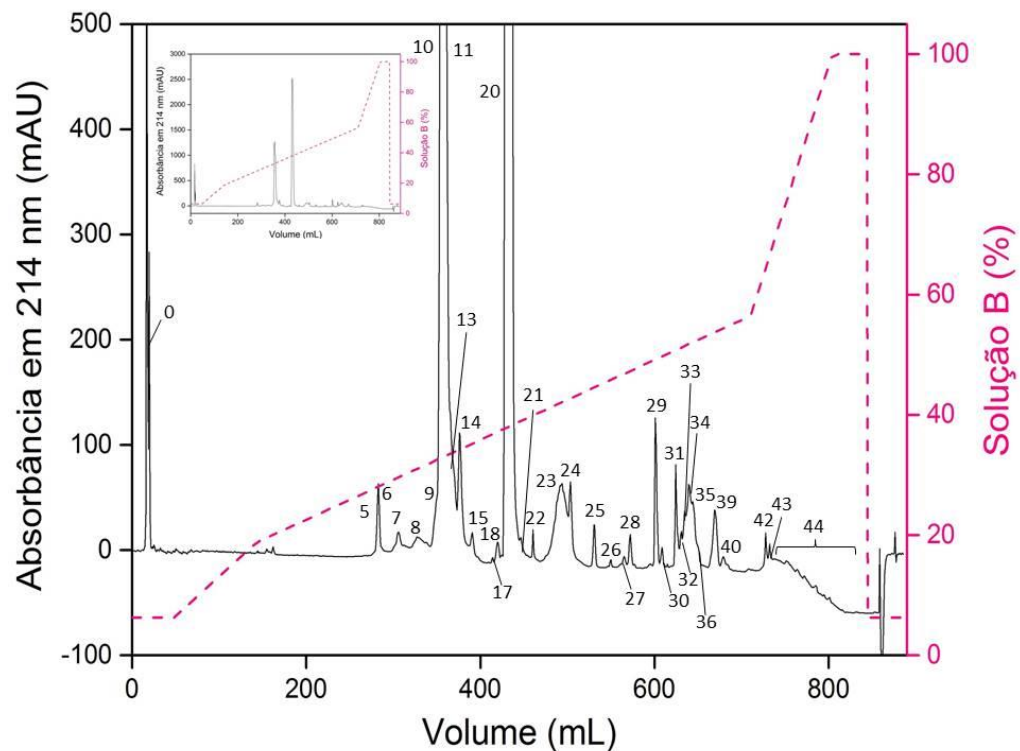
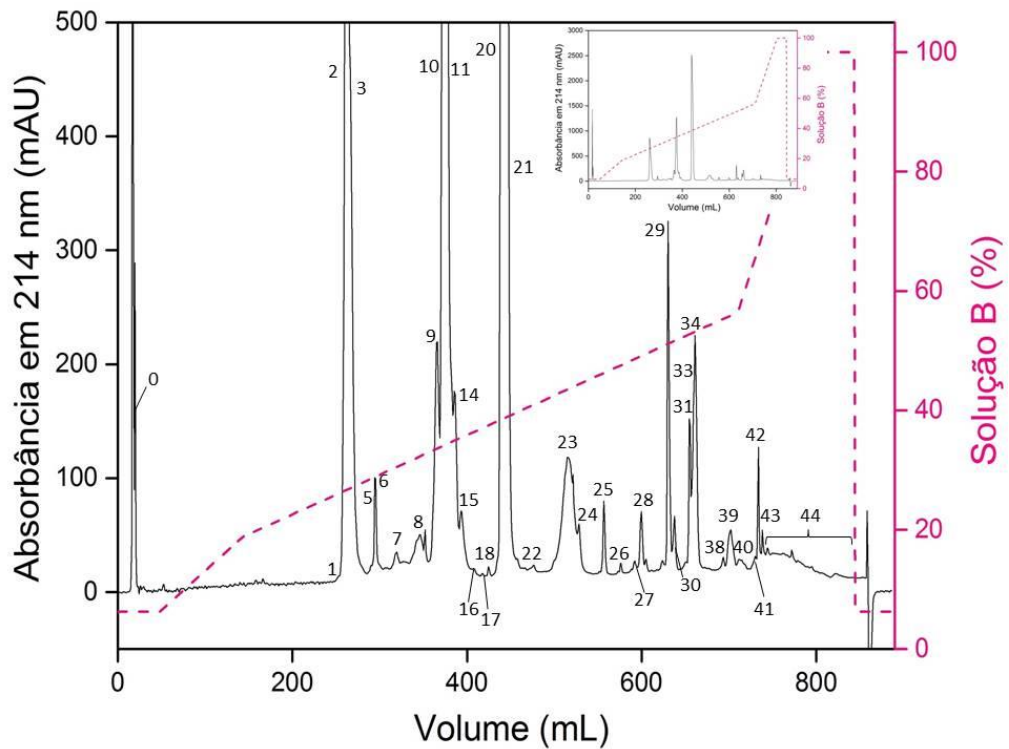


Figura 7. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 1 (A) e 2 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna semipreparativa C-18 (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

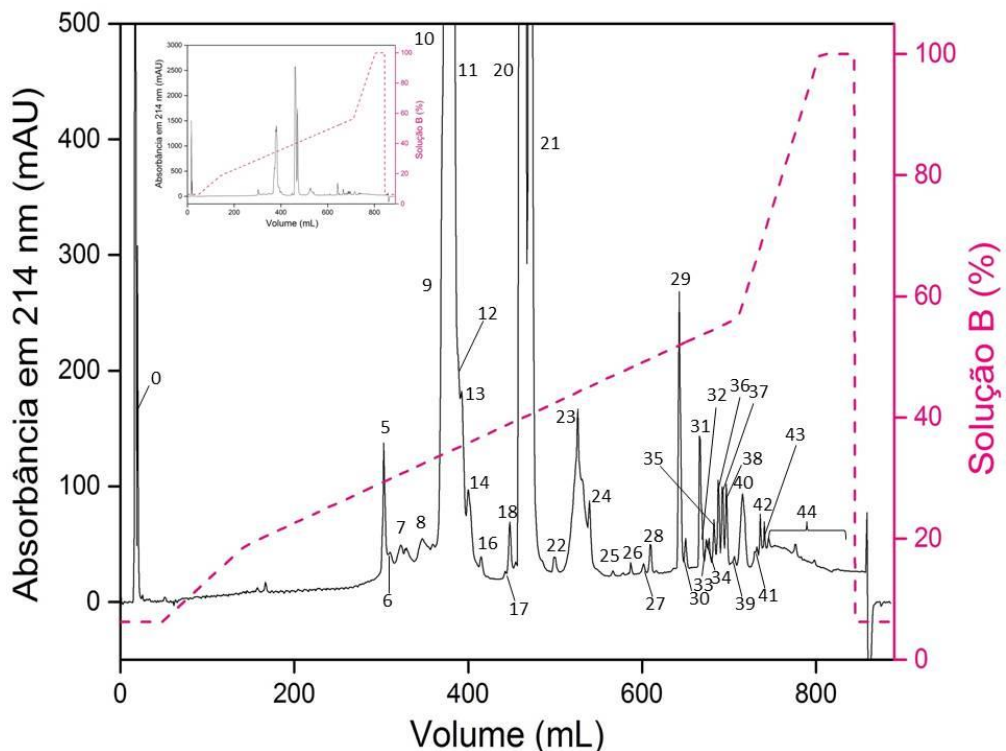
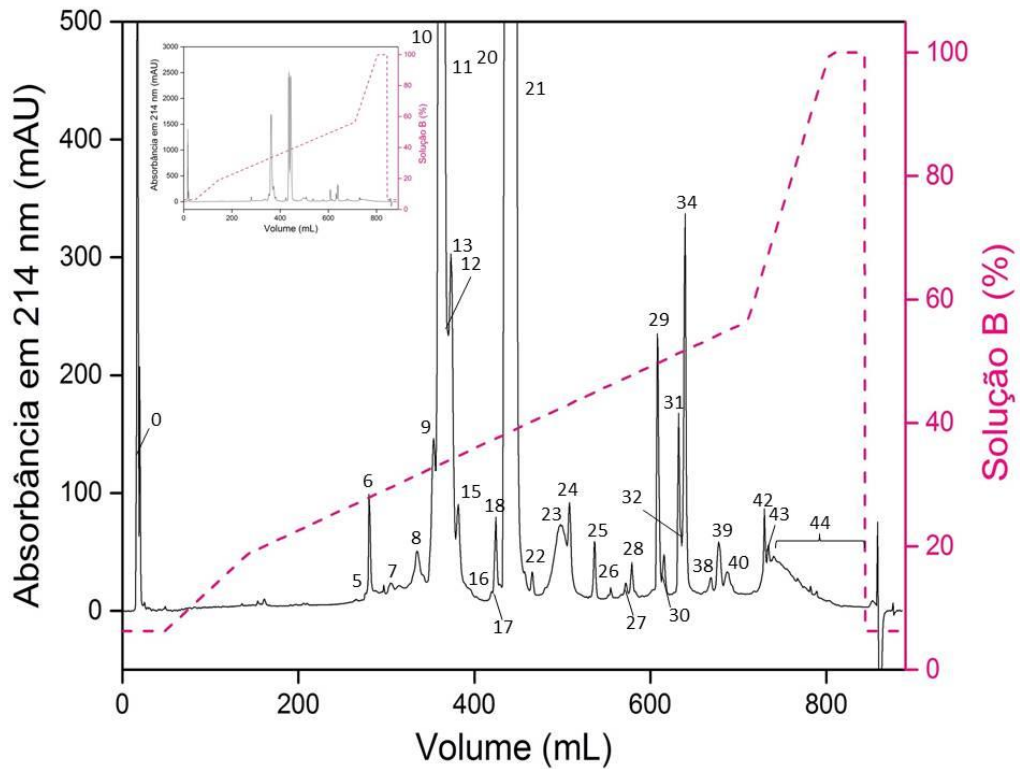


Figura 8. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 3 (A) e 4 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

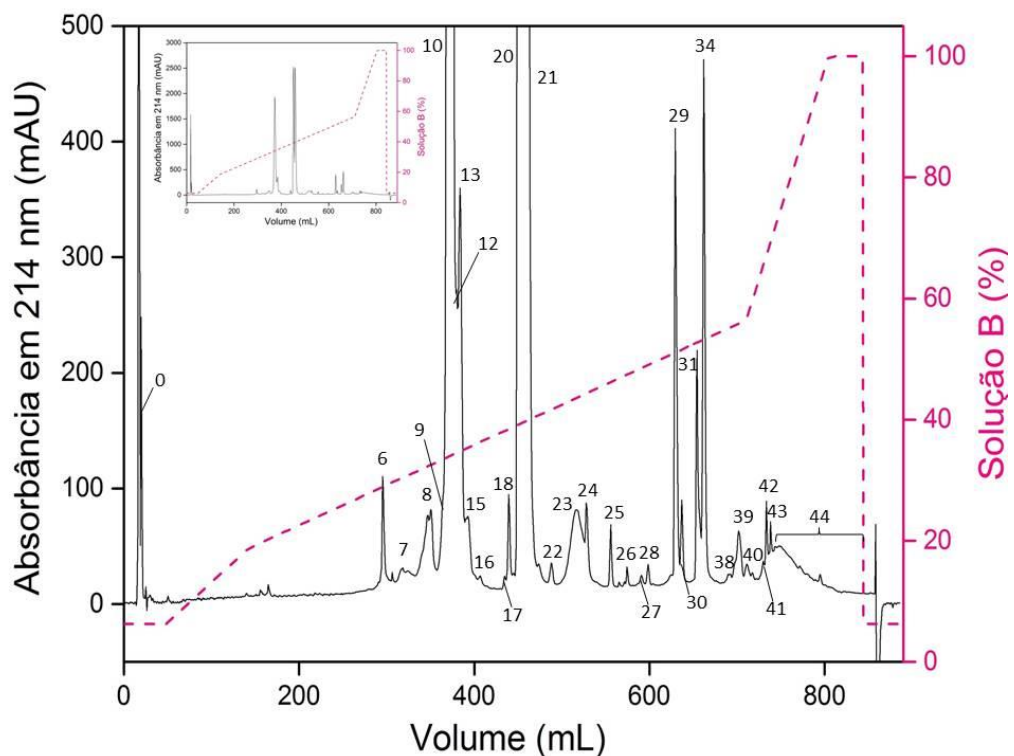
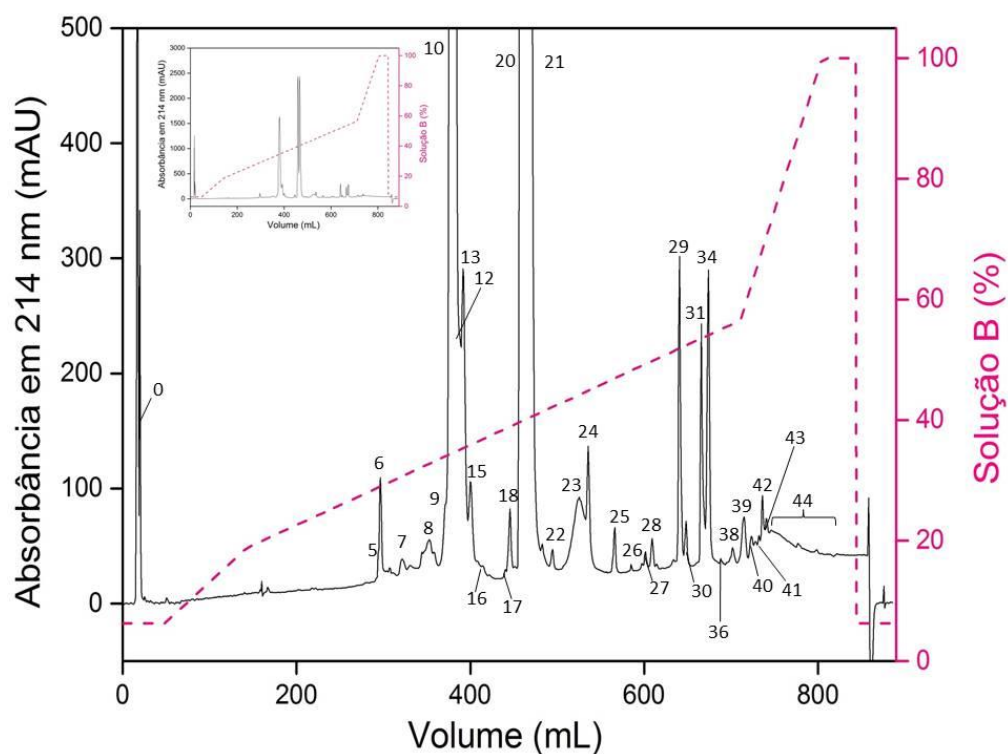


Figura 9. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 5 (A) e 6 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

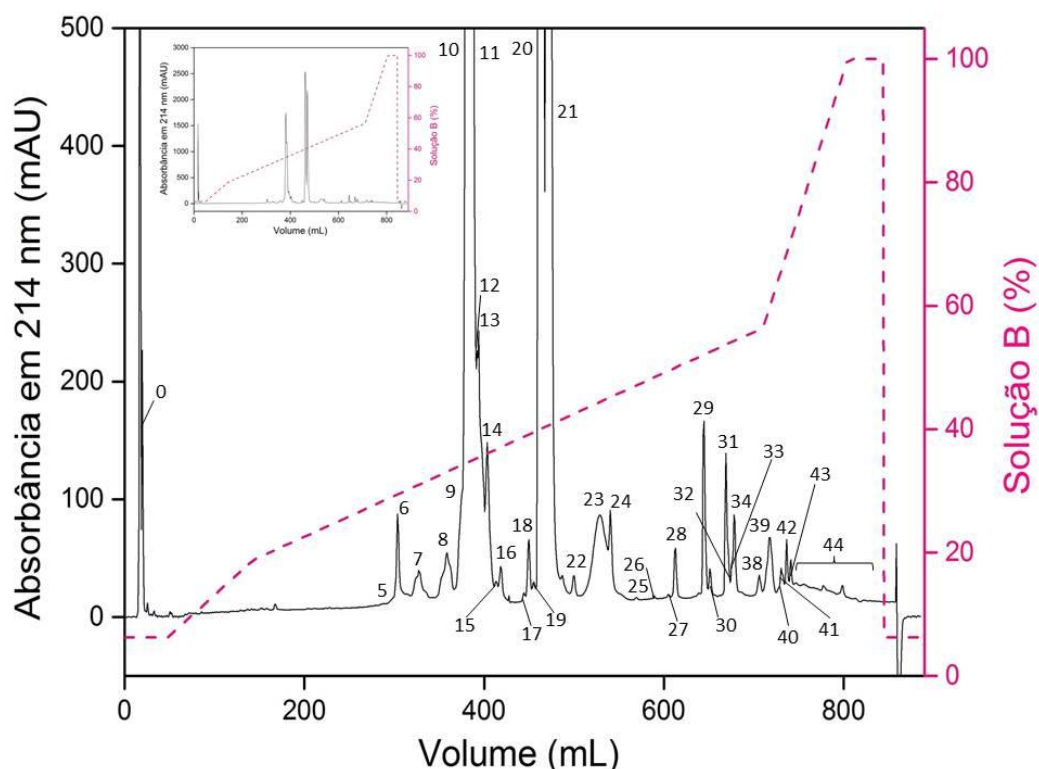
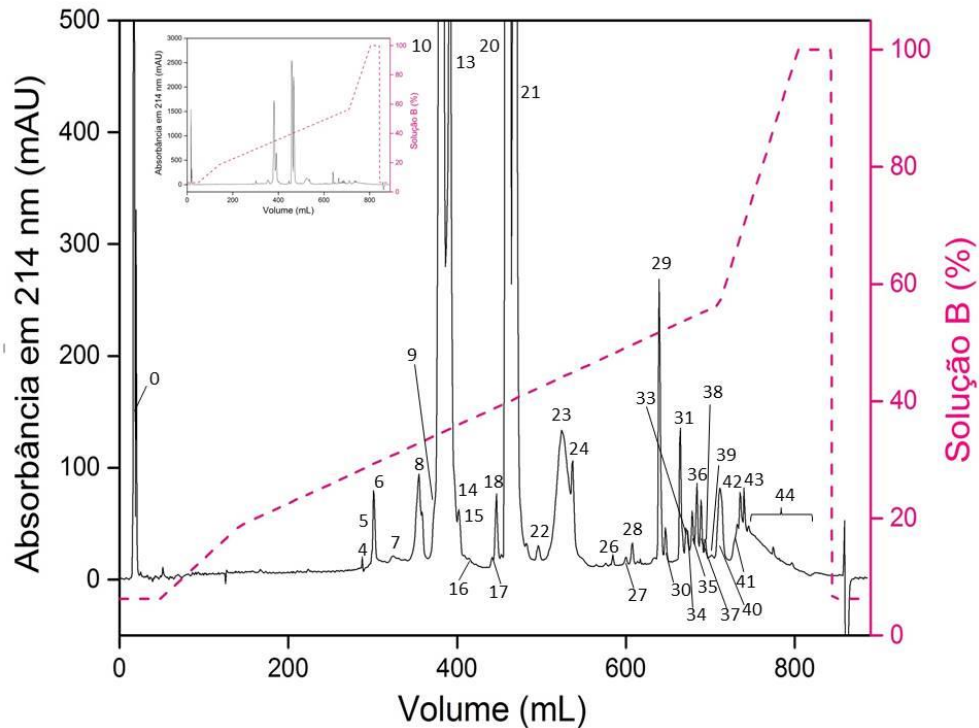


Figura 10. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 7 (A) e 8 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

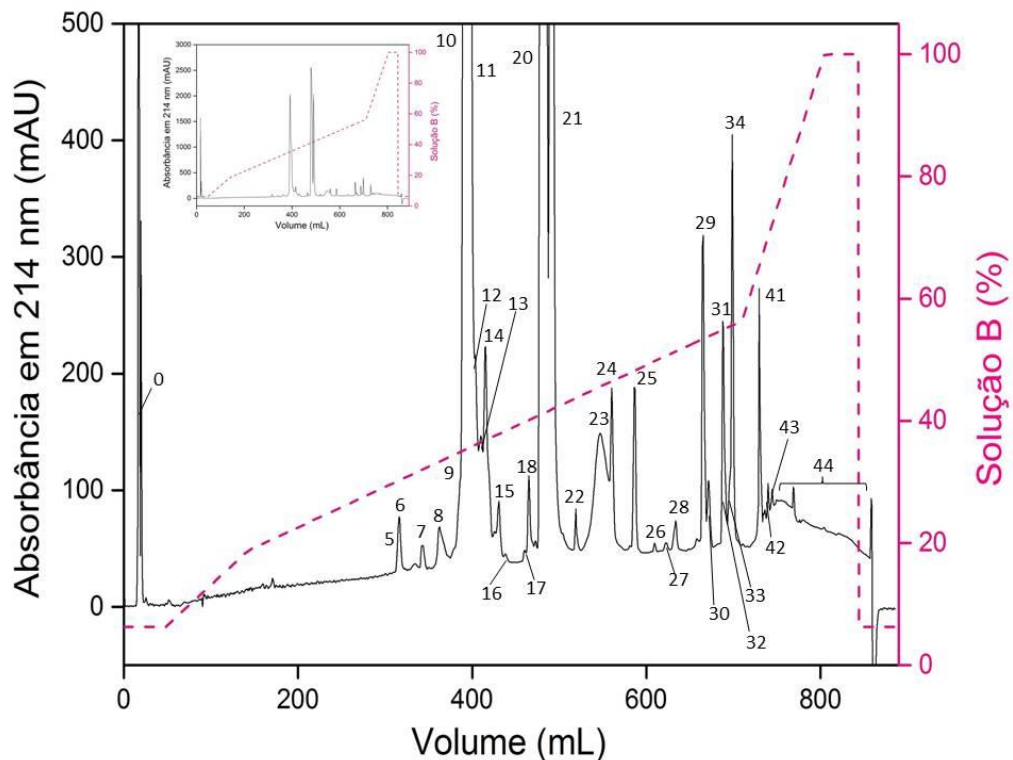
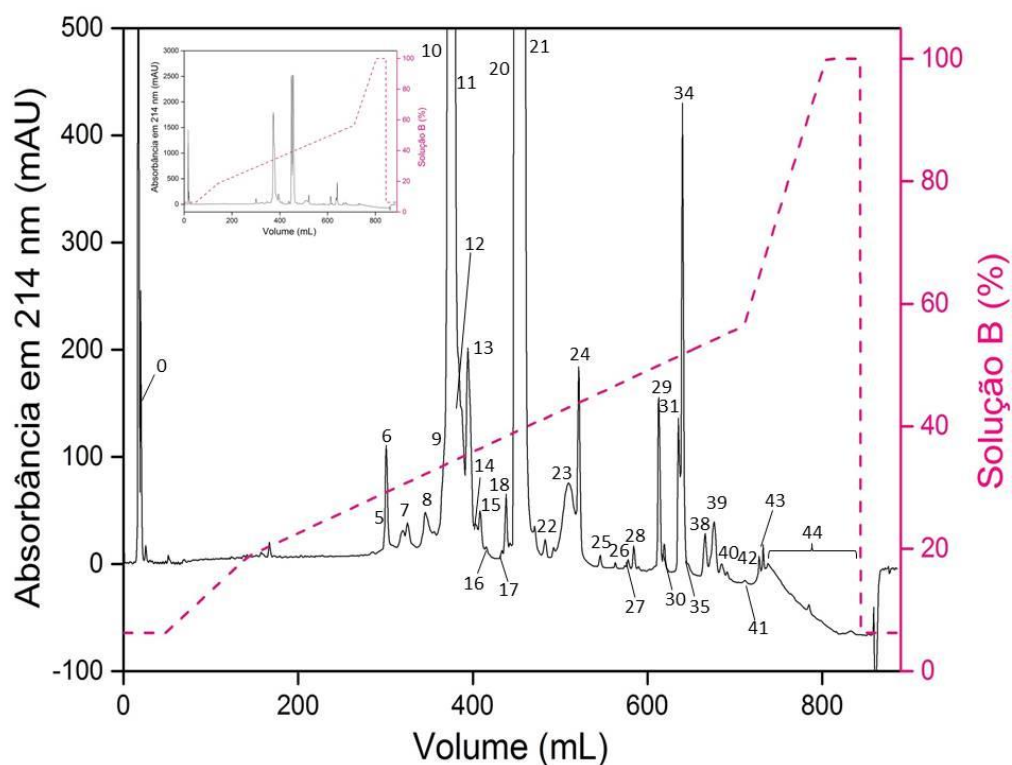


Figura 11. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 9 (A) e 10 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

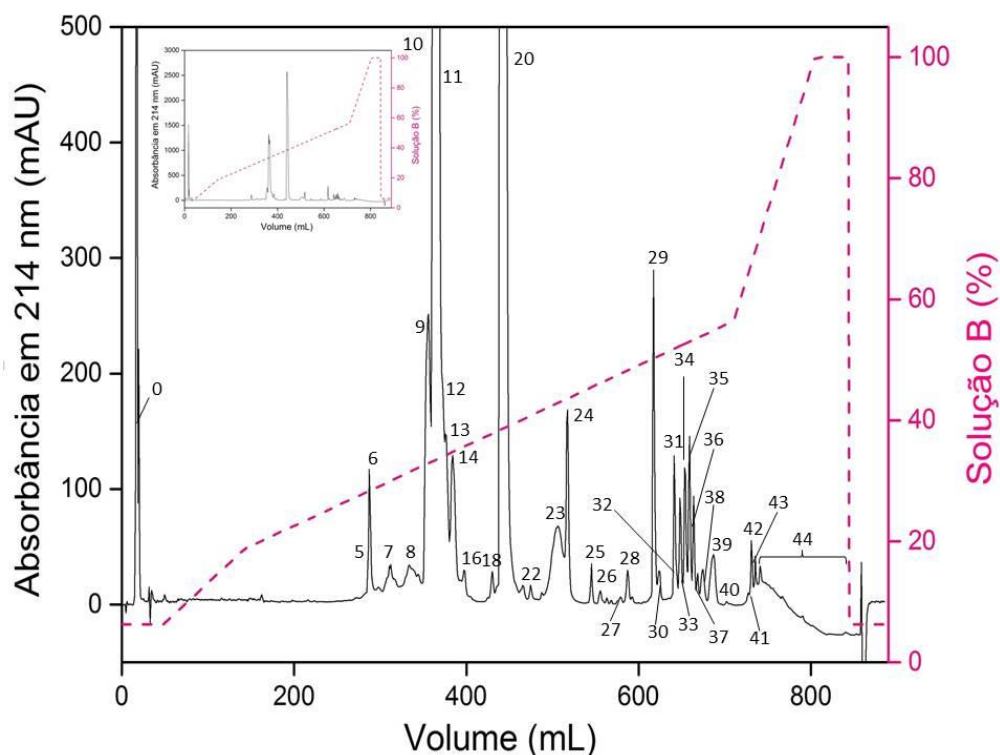
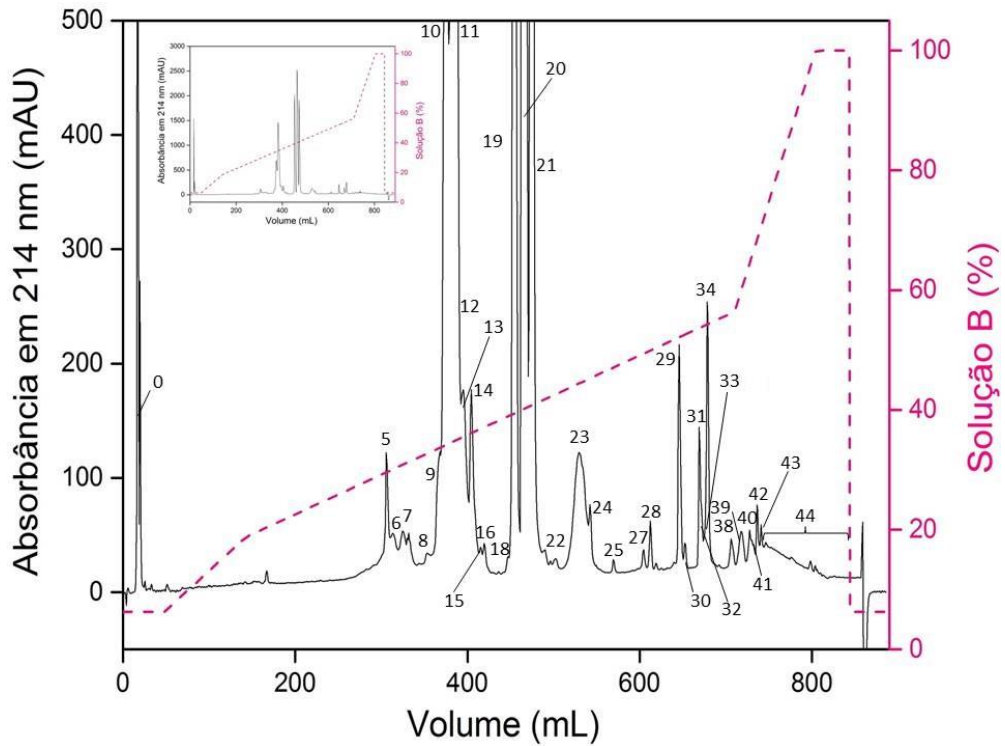


Figura 12. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 11 (A) e 12 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

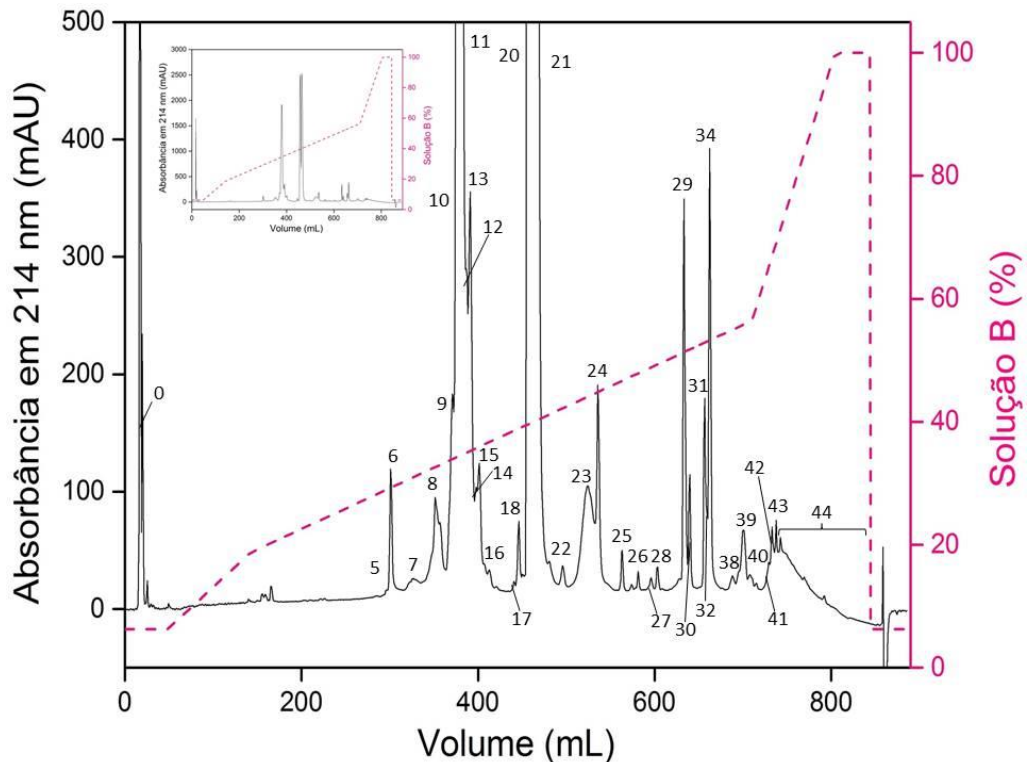
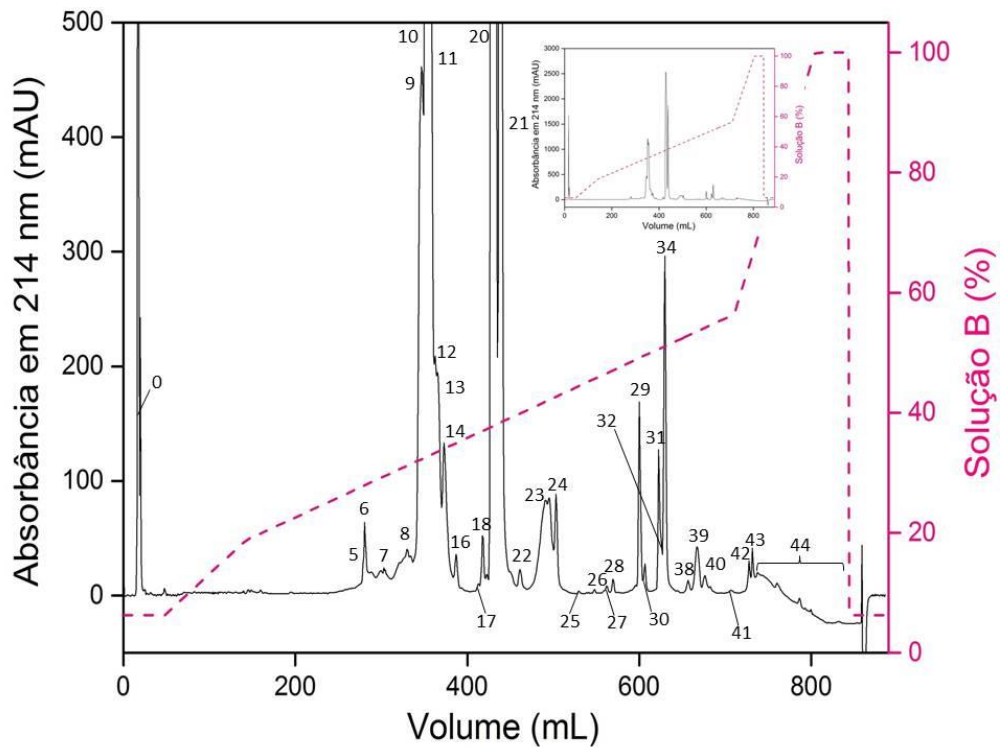


Figura 13. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 13 (A) e 14 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 µm, 300 Å, Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

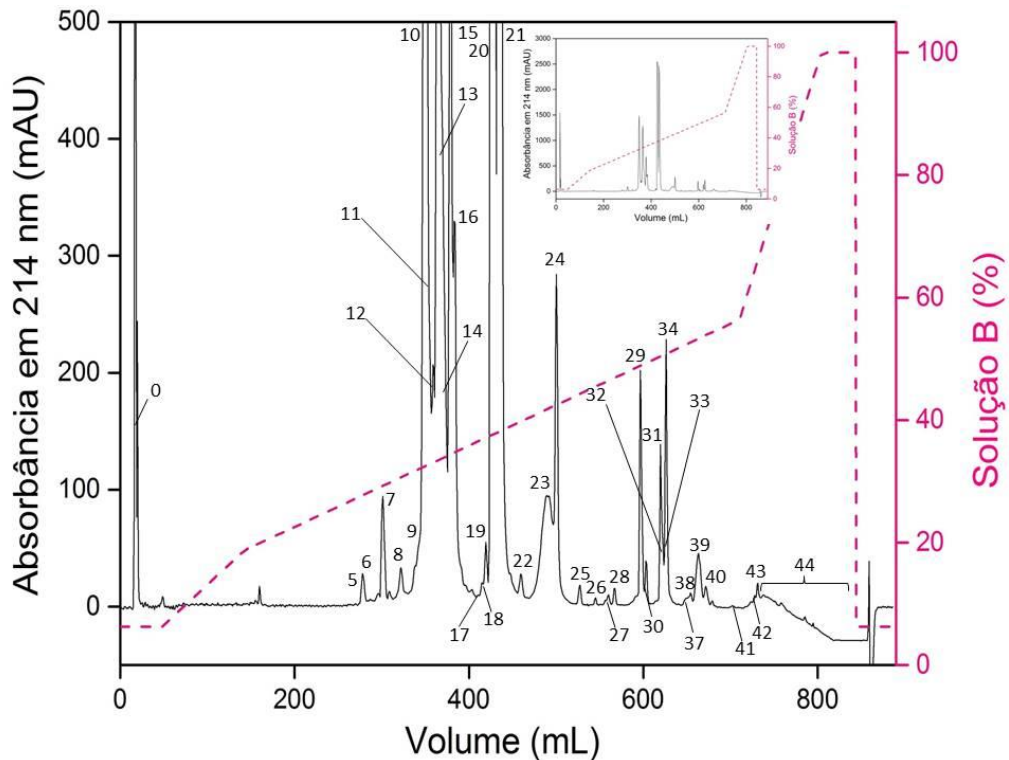
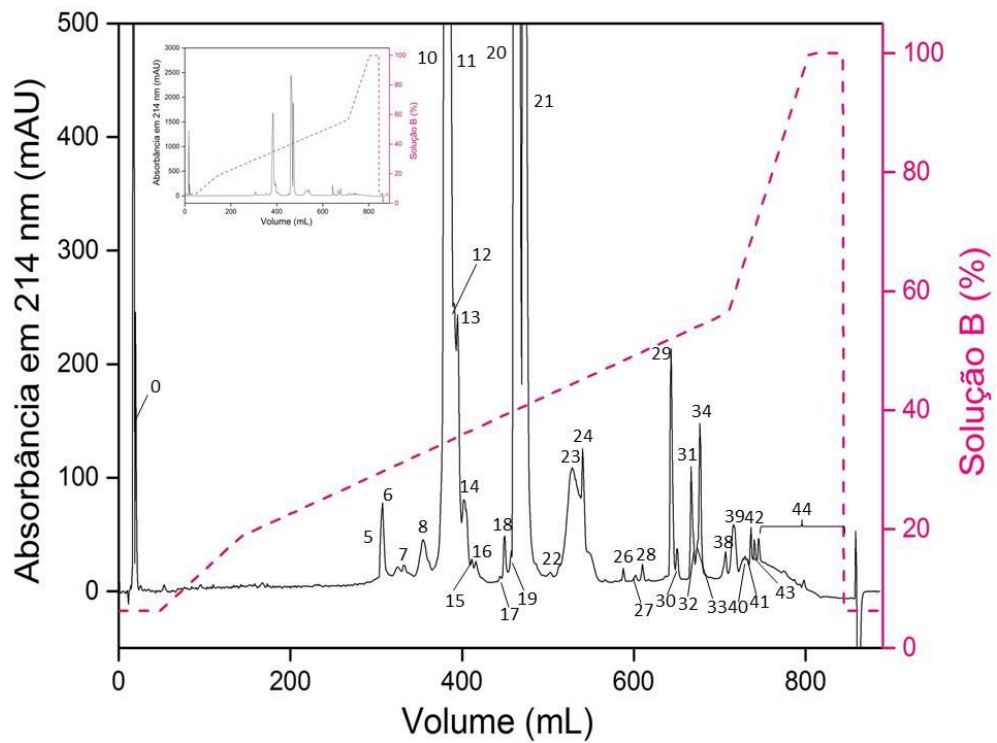


Figura 14. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 15 (A) e 16 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Åkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

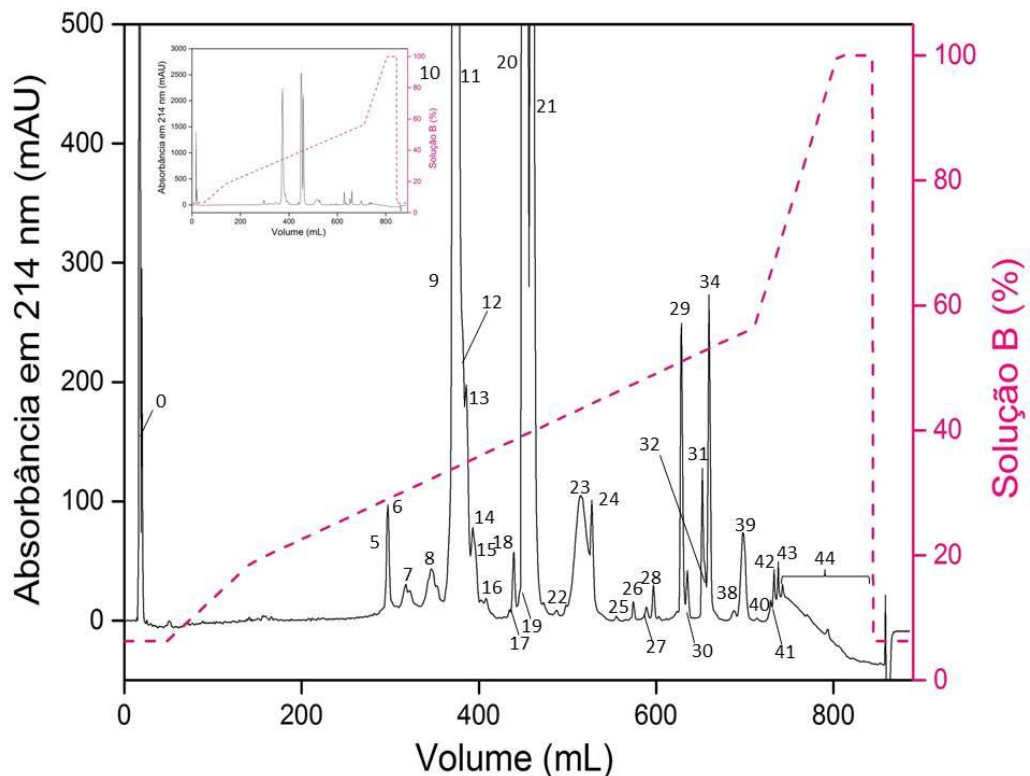
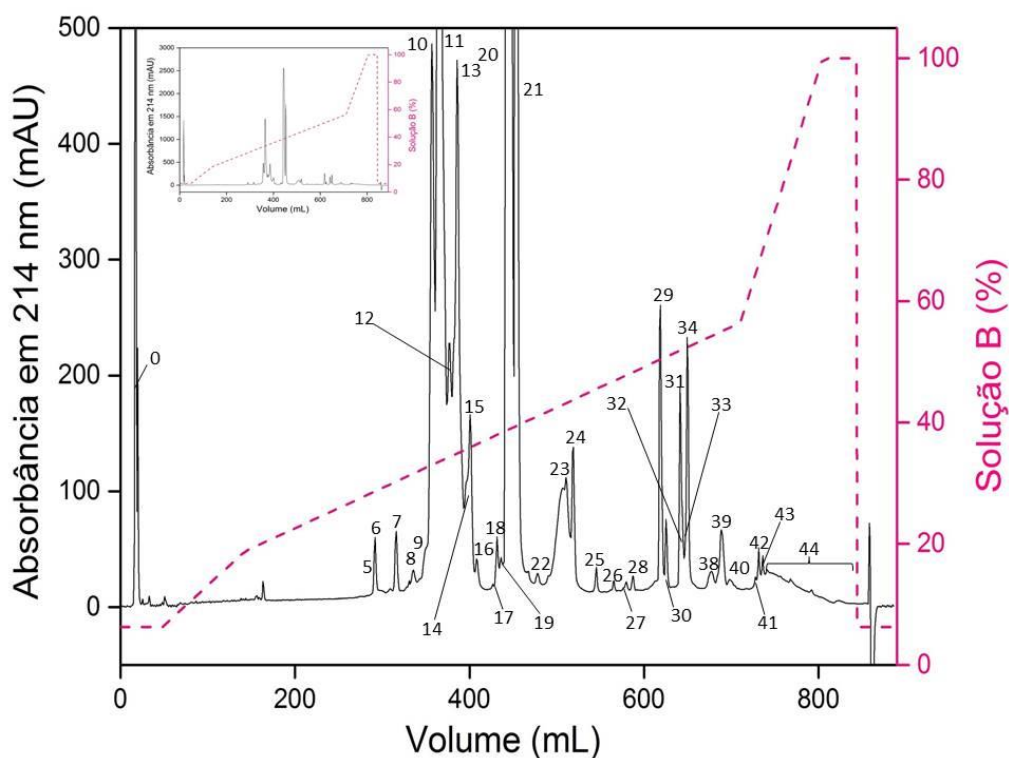


Figura 15. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 17 (A) e 18 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Ákta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

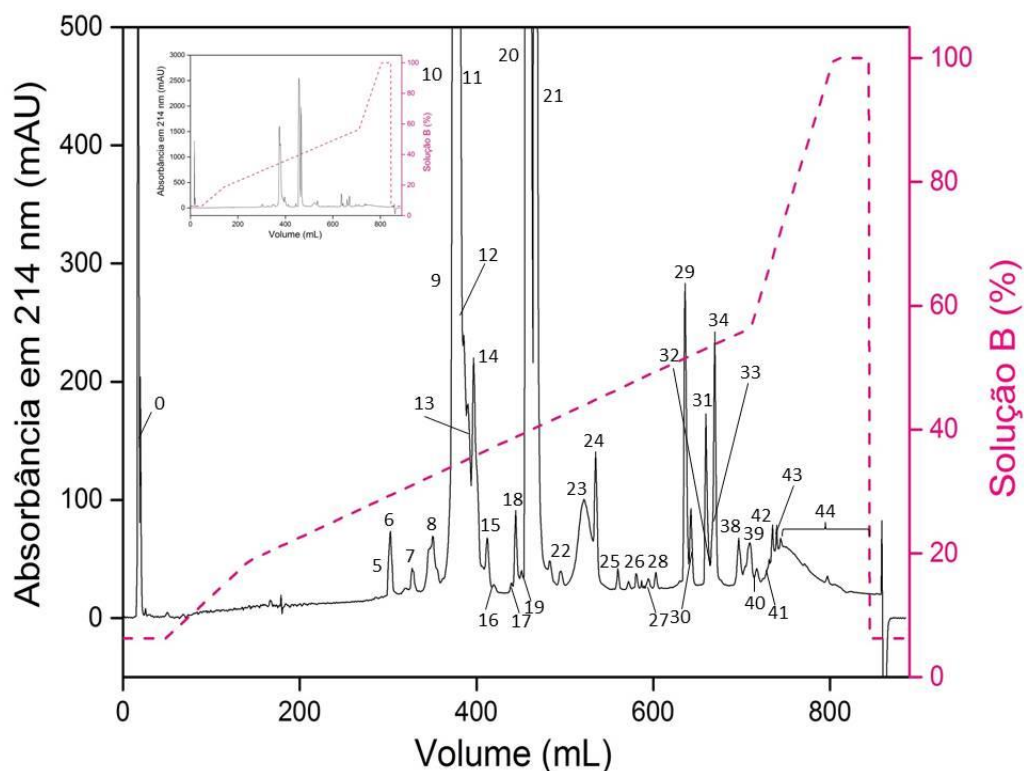
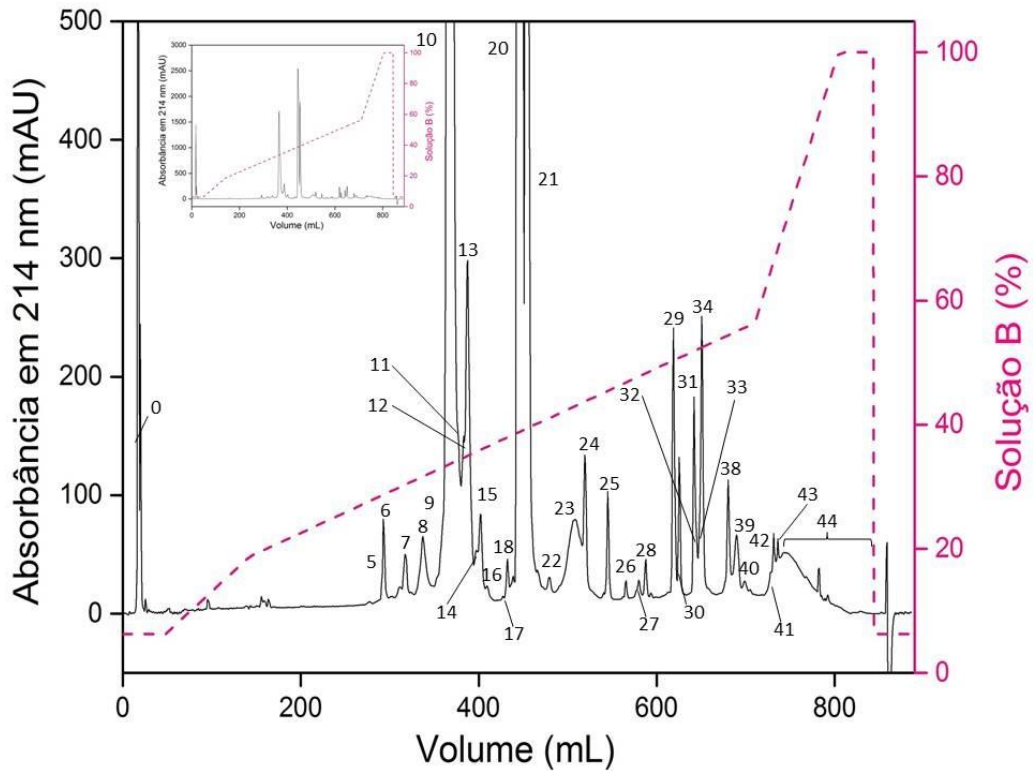


Figura 16. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 19 (A) e 20 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Åkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A



B

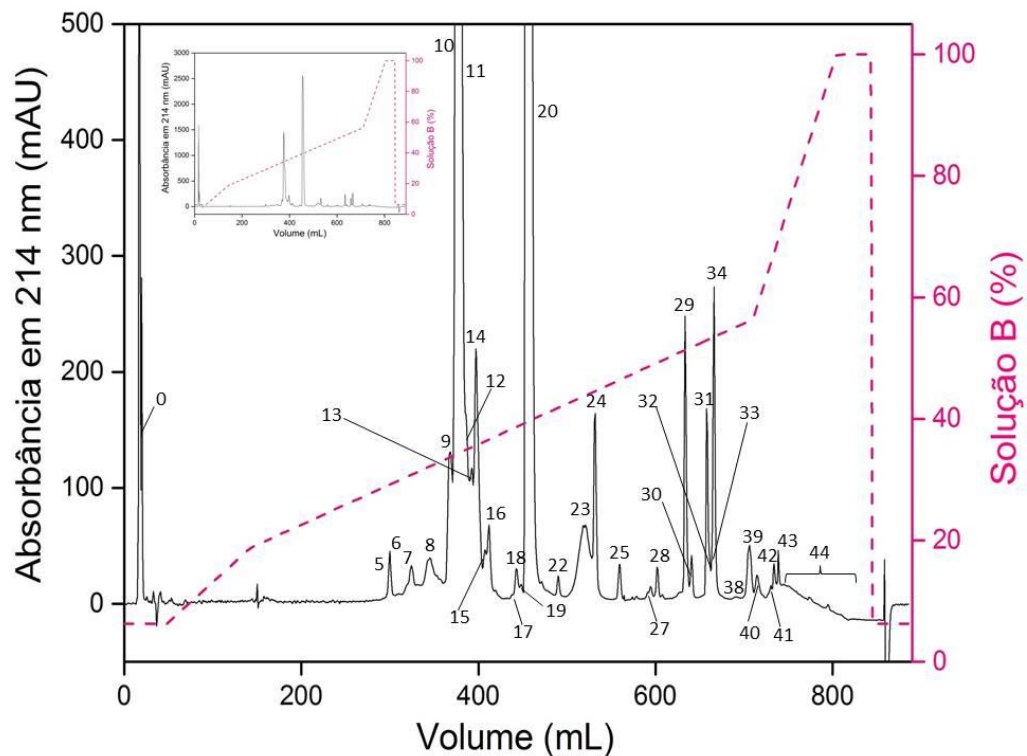


Figura 17. Perfil cromatográfico do fracionamento das peçonhas 21 (A) e 22 (B) de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de fase reversa C-18. A peçonha bruta (22 mg) foi fracionada em coluna C-18 semipreparativa (250 x 10 mm, partículas de 5 μ m, 300 \AA , Phenomenex) conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC-10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (V/V), como solução A, e ACN 80% (V/V) e TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada rosa). Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

O monitoramento da absorvância das frações eluídas foi realizado em 214 nm, tendo em vista que as ligações peptídicas absorvem luz entre 190 e 230 nm (CALVETE, 2011).

Os perfis cromatográficos das frações eluídas (Figs. 6-17) apresentaram-se semelhantes, mas contendo diferenças significativas, principalmente em relação à proporção de algumas toxinas. O cromatograma do *pool* das 22 peçonhas apresentou 44 frações (Fig. 6). A numeração das frações foi feita considerando estes 44 picos de absorvância, visto que o *pool* contém todos os componentes presentes em todas as 22 peçonhas avaliadas. Todos os perfis cromatográficos resultantes são semelhantes ao perfil obtido por Boldrini-França e colaboradores (2010), que utilizaram uma coluna C-18 de fase reversa acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para o fracionamento da peçonha de *C. d. collilineatus*.

As frações eluídas de cada uma das 22 peçonhas foram comparadas utilizando o tempo de retenção e a amplitude de cada pico de absorvância. Verificou-se que existem variações significativas tanto quantitativas quanto qualitativas. Ou seja, algumas frações estão presentes em algumas peçonhas, enquanto estão ausentes em outras. Por exemplo, as frações 1, 2 e 3 estão presentes apenas na peçonha 3 (Fig. 8), a fração 4 está presente apenas na peçonha 9 (Fig. 11) e a fração 37 é encontrada apenas nas peçonhas 4, 9, 12 e 16 (Figs. 8, 11, 12 e 14).

Considerando-se que foi injetada a mesma quantidade de peçonha (22 mg) e as porcentagens de recuperação proteica para uma mesma fração foram diferentes entre as 22 peçonhas avaliadas, pode-se afirmar que as proporções com que as toxinas são expressas também variaram muito e algumas diferenças são muito evidentes (Tab. 6). Por exemplo, a fração 19 representa quase 13% do total de proteínas eluídas na peçonha 13 (Fig. 13A), enquanto que em outras peçonhas, representa uma porcentagem muito pequena, 0,17% na peçonha 22, ou não é encontrada, como na peçonha 1. A fração 20 variou de 15,47% na peçonha 3 a 44,56% na peçonha 2. Já a fração 21 variou de 1,13% na peçonha 2 a 26,13% na peçonha 5 (Tab. 6).

As frações eluídas foram submetidas à análise por SDS-PAGE (Fig. 18), como descrito no item 3.6. As massas moleculares aproximadas foram calculadas como descrito no item 3.6.

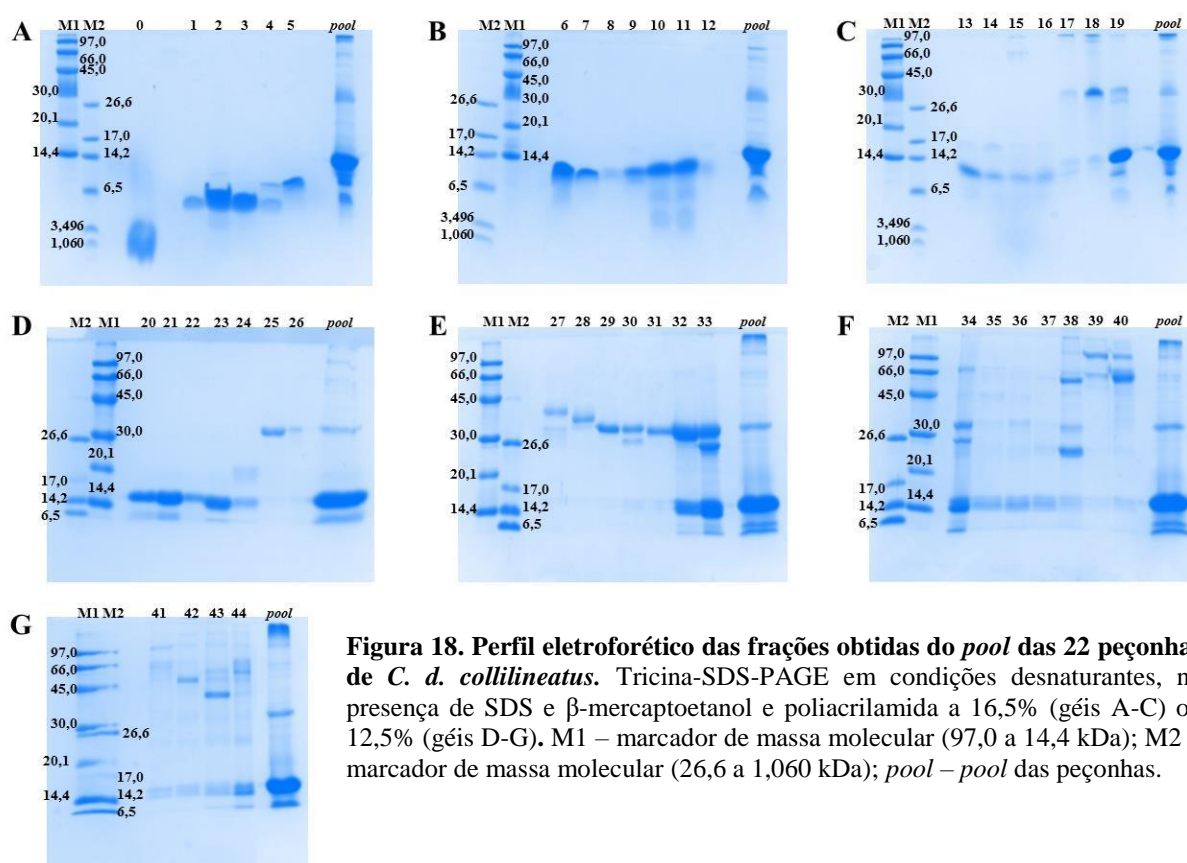


Figura 18. Perfil eletroforético das frações obtidas do pool das 22 peçonhas de *C. d. collilineatus*. Tricina-SDS-PAGE em condições desnaturantes, na presença de SDS e β -mercaptoetanol e poliacrilamida a 16,5% (géis A-C) ou 12,5% (géis D-G). M1 – marcador de massa molecular (97,0 a 14,4 kDa); M2 – marcador de massa molecular (26,6 a 1,060 kDa); *pool* – *pool* das peçonhas.

Nas frações iniciais (de 0 a 19) são eluídos os componentes de baixa massa molecular, aqueles entre, aproximadamente, 4 kDa a 9 kDa. Neste intervalo de massas moleculares podem ser encontradas as proteínas crotamina, desintegrina e a cadeia A do complexo da crotocina ou, crotapotina (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Portanto, a eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 16,5% (Fig. 18A-C), pois nesta concentração de acrilamida a malha do polímero forma poros menores, o que melhora a resolução para proteína que apresentam massa molecular inferior a 20 kDa (SHAGGER; VON JAGOW, 1987). Assim, a separação de proteínas de baixa molecular é melhor do que em gel de poliacrilamida a 12,5% (Fig. 18D-G), mais adequado para proteínas maiores (LAEMMLI, 1970).

Tabela 7. Massas moleculares aproximadas das bandas proteicas reveladas para cada uma das frações aplicadas em SDS-PAGE.

Frações (FPLC)	Massas moleculares aproximadas nos géis (kDa)*								
0	abaixo de 1 kDa até 3,5 kDa								
1	4,40								
2	4,78								
3	4,40								
4	6,28	4,22							
5	6,55								
6	9,61								
7	9,13								
8	8,80								
9	9,37								
10	9,98	5,54	3,77						
11	10,63	6,03	3,80						
12	10,63								
13	10,16	5,95							
14	9,00								
15	8,55								
16	8,52								
17	30,10	12,02	9,42						
18	30,02	12,65	10,26						
19	31,45	27,33	13,69	8,99					
20	15,49	6,50							
21	15,33	6,50							
22	15,49								
23	14,78	6,5							
24	19,89	14,93							
25	32,45								
26	33,86								
27	38,85	32,57							
28	35,57								
29	32,00								
30	31,63	28,00							
31	30,71								
32	29,63	14,40							
33	29,63	25,50	14,40						
34	70,88	32,79	27,92	14,61					
35	44,75	14,83							
36	33,52	14,83							
37	25,53	14,98							
38	> 97,00	57,04	32,25	24,93	15,20				
39	> 97,00	63,06							
40	> 97,00	60,25	15,12						
41	> 97,00	66,88	63,19	15,05	12,61				
42	> 97,00	49,09	15,05						
43	> 97,00	55,94	49,09	39,99	14,80				
44	> 97,00	61,03	54,50	47,41	40,40	31,58	23,69	14,80	6,50

*Os dados de massas moleculares estão apresentados na ordem em que são evidenciadas no perfil eletroforético, ou seja, da maior para a menor.

A partir desses resultados foi verificado que os componentes presentes nas frações iniciais da cromatografia (frações de 0 a 16) apresentavam componentes menores que 10 kDa e as proteínas maiores foram eluídas principalmente nas frações subsequentes (Fig. 18 e Tab.

7). Estes resultados indicam que a escolha dos protocolos de eletroforese utilizados foram adequados para a detecção dos principais componentes proteicos das frações.

Considerando o perfil eletroforético, as frações que apresentaram apenas uma banda eletroforética (frações de 1 a 3, de 5 a 8, 14, 20, 22, 25, 28, 29 e 31) foram submetidas a sequenciamento aminoterminal, seguindo a metodologia de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), como descrito no item 3.7.1. As demais frações que apresentaram duas ou mais bandas eletroforéticas foram submetidas à espectrometria de massas para dedução de sequências de aminoácidos, a fim de identificar proteínas presentes nas mesmas, como descrito no item 3.7.2. Para isso foram utilizados espectrômetros de massas com ionização tanto do tipo ESI, quanto MALDI, para se ter uma cobertura maior de identificação de peptídeos trípticos. Os resultados obtidos com estes dois ensaios para a identificação de proteínas foram agrupados e estão apresentados na tabela 8.

O sequenciamento de proteínas por degradação de Edman é iniciado pelo aminoácido N-terminal, que é marcado, removido da proteína e identificado, não interferindo em outras ligações peptídicas da cadeia de aminoácidos. Este ensaio envolve a reação do fenilisotiocianato com o peptídeo em condições alcalinas, levando à geração de um aduto de feniltiocarbamoil (PTC) no aminoácido aminoterminal. Próximo a este aduto, a ligação peptídica é clivada em TFA anídrico, removendo o aminoácido aminoterminal como um derivado anilinoiazolinona. Esse aminoácido é extraído por solventes orgânicos e convertido para uma forma mais estável (derivado de feniltiodantoína) em solução aquosa ácida, para posterior identificação (NELSON; COX, 2014; STRACK, 2015). Estas reações são automatizadas em um sequenciador de proteínas PPSQ-33A.

Tabela 8. Identificação de proteínas nas frações obtidas por RP-FPLC das peçonhas de *C. d. collilineatus*.

Fração (FPLC)	Sequenciamento		Peptídeo		Proteína		MM*** (Da)	
	N-terminal*	MS/MS**	Carga	m/z	Família	Acesso		
	12345678901234567890123456	12345678901234567890123456789						
0	-	-	-	-	-	-	-	
1 – 3	YKQCHKKGGHCFPEKIKICIPSSDFG KMDC	ICIPSSDFGK	1+	1.220,55	Crotamina	P63327	4.890,00	
4	-	IECDCGSIENPCCYATTCK	2+	1.169,48	Metaloprotease P-II (409-427)	COL2T8	53.639,00	
5 – 7	AREECDCGSIENPCCYATTCKLR	ICIPSSDFGK	2+	610,82	Crotamina	P63327	4.890,00	
		IECDCGSIENPCCYATTCK	1+	2.338,01	Metaloprotease P-II (407-444)	COL2T8	53.639,00	
8	SSYGICYGAGGQGWP	LRPGSQCAEGMCCDQCR	1+	2.084,93				
		SSYGICYGAGGQGWPQDASDR	1+	2.278,90	Crotoxina A (subunidade ácida)	P08878	15.273,00	
		SYGICYGAGGQGWPQDASDR	1+	2.191,78				
		CCFEHDCCYAK	1+	1.549,56				
9 – 13	-	LTGCDPTTDVYTYR	1+	1.661,78				
		SSYGICYGAGGQGWPQDASDR	1+	2.278,90	Crotoxina A (subunidade ácida)	P08878	15.273,00	
		SYGICYGAGGQGWPQDASDR	1+	2.191,78				
		CCFEHDCCYAK	1+	1.549,56				
14	SSYGICYGAGGQGWPQDASDRCCFEH DCCYAKLTGCDPT	LTGCDPTTDVYTYR	1+	1.661,78				
		-	-	-	Crotoxina A (subunidade ácida)	P08878	15.273,00	
15 – 16	-	SSYGICYGAGGQGWPQDASDR	1+	2.278,90	Crotoxina A (subunidade ácida)	P08878	15.273,00	
		SYGICYGAGGQGWPQDASDR	1+	2.191,78				
		CCFEHDCCYAK	1+	1.549,56				
		LTGCDPTTDVYTYR	1+	1.661,78				
17, 19 e 21	-	KNAIPFYAFYGCYCGWGGR	3+	763,02	Fosfolipase A ₂	P62022	15.907,00	
		NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.079,98				
		WDIYPYSLK	2+	592,81				
		GTWGEEQICECDRR	3+	871,83				
		YGYMFYPDSR	2+	649,79				
18	-	NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.080,02	Fosfolipase A ₂	P62022	15.907,00	
		WDIYPYSLK	2+	592,83				
		YGYMFYPDSR	2+	657,80				
		EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	4+	790,95	Fator de crescimento endotelial vascular	C0K3N3	16.126,00	
-	-	QYFFETK	2+	481,74	Fator de crescimento neural	Q9DEZ9	27.199,00	
		NPNPVPTGCR	2+	556,31				
		IDSACVCVISR	2+	640,35				
		ALTMEGNQASWR	2+	682,28				
		HNNSYCTTTNTFVK	2+	879,86				
		HNNSYCTTTQTYVRALTMEGNQASWR	4+	794,89			R4FIR0	29.063,00

		EYFFETK	2+	481,73		P61898	13.064,00
		ALTMEGSRASWR	2+	682,28		F8RKW5	27.282,00
		HWNSYCTTTQSFVK	2+	879,86		A6MFL5	27.209,00
		NPNPLPSGCR	2+	556,31		R4G7F0	27.752,00
20	HLLQFNKMIKFETRKNNAIPFYAFYGC	KNAIPFYAFYGCYCGWGGR	3+	763,02	Fosfolipase A ₂	P62022	15.907,00
	YCGWGGRGRPKDATDRCCFVHDCCYG	NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.079,98			
	KLAKCNTK	WDIYPYSLK	2+	592,81			
		GTWGEEQICECDR	3+	871,83			
		YGYMFYPDSR	2+	649,79			
22	HLLQFNKMIKFETRKNNAIPFYAFYGC	-	-	-	Fosfolipase A ₂	P86169	14.199,00
	YCGWGGRGRPKDAT						
23	-	EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	4+	790,95	Fator de crescimento endotelial vascular	C0K3N3	16.126,00
	-	LTGCDPTTDVYTYR	2+	831,37	Crotoxina A	P08878	15.273,00
	-	YLQFSPENCQGESQPC	2+	972,43	(subunidade ácida)		
	-	KNAIPFYAFYGCYCGWGGR	3+	763,05	Fosfolipase A ₂	P62022	15.907,00
		NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.080,00			
		WDIYPYSLK	2+	592,82			
		YGYMFYPDSR	2+	649,82			
24	-	LTGCDPTTDVYTYR	2+	831,35	Crotoxina A	P08878	15.273,00
	-	YLQFSPENCQGESQPC	2+	972,42	(subunidade ácida)		
	-	QEDGEIVCGEDDPCGTQICECDK	3+	905,38			
	-	SGISYSSYGCYCGAGGQGWPDASDR	3+	983,78			
	-	EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	4+	790,95	Fator de crescimento endotelial vascular	C0K3N3	16.126,00
25	VVGDECNINEHRSLVAIFYSTEFFC	-	-	-	Serinoprotease	Q8QHK2	27.909,00
	SGDLINQEWV						
26	-	LTGCDPTTDVYTYR	2+	831,38	Crotoxina A	P08878	15.273,00
	-	YLQFSPENCQGESQPC	2+	972,43	(subunidade ácida)		
	-	QEDGEIVCGEDDPCGTQICECDK	3+	905,39			
	-	SGISYSSYGCYCGAGGQGWPDASDR	3+	983,77			
	-	FFCLSSK	2+	444,73	Serinoprotease	Q7T229	28.654,00
		TLCAGILEGGK	2+	559,79			
		EKFFCLSSK	2+	573,32			
		WDKDIMLIR	2+	595,34			
		WNKDIMLIR	3+	402,57		B0ZT25	28.794,00
		GDILVLLGVHR	2+	596,39		J3SDW9	27.414,00
		TLCAGILQGGK	2+	559,79		O13069	27.894,00
		LDSPVKNSAHIAPISLPSPPIVGSVCR	3+	966,83			
		EKFFCVSTK	2+	573,32		J3S3W6	28.909,00
		QKFFCLSSK	2+	573,32		E5AJX2	28.216,00

		TLCAGILKGGK	2+	559,79		P0C5B4	28.616,00
	-	EMLVSIILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	4+	790,95	Fator de crescimento endotelial vascular	C0K3N3	16.126,00
		YGYMFYPDSR	2+	657,81	Fosfolipase A ₂	P62022	15.907,00
		GTWCEEQICECDR	2+	871,87			
		NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.080,01			
27	-	IDSACVCVISR	2+	640,34	Fator de crescimento neural	Q9DEZ9	27.199,00
		HWNSYCTTTNTFVK	2+	879,93	Crotoxina A (subunidade ácida)	P08878	15.273,00
	-	LTGCDPTTDVYTYR	2+	831,37	Fosfolipase A ₂	P62022	15.907,00
		YGYMFYPDSR	2+	657,81			
		GTWCEEQICECDR	2+	871,85			
		NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.080,01			
		GTWCKEQICECDR	2+	871,85	Serinoprotease	P0CAS5	14.480
	-	TLCAGILEGGK	2+	559,79		Q9DG84	28.321,00
		IMGWGTISPTK	2+	595,82			
		AVYPELPATSR	2+	602,31			
		IMGWGTISPTK	2+	603,83			
		LDRPVSNSEHIAPLSLPSPPSVGSVCR	4+	740,41		Q8QHK3	28.625,00
		IAPISLPSNPPSVGSVCR	2+	925,98		A1E2S1	25.179,00
		FICPNR	2+	403,73		Q2QA04	28.271,00
		GDILVLLGVHR	2+	596,38			
		SLALVYITSGFLCGGTLINK	2+	1.064,12			
		LDSPVNNSTHIAPLSLPSNPPSVGSVCR	3+	972,22		J3SDW9	27.414,00
		NFQMLFGVHSK	2+	654,35		E5L0E5	28.078,00
		LDSPVSNSEHIAPLSLPSPPSVGSVCR	3+	963,86			
		TLCAGILEGGKDTCR	3+	550,96		Q91053	28.908,00
		DMEIYLGVHSK	2+	654,35		Q91507	28.099,00
		ETYPDVPHCANINILDHAVCR	3+	832,09		Q072L6	28.019,00
		IMGWGTITPSK	2+	595,82		Q5W958	27.815,00
		TLPDVPYCANIK	2+	695,87		Q8QHK2	27.909,00
		LLDDAVCQPPYPELPATSR	3+	714,72			
28	VIGGDECNINEH	-	-	-	Serinoprotease	CEJ25501	26.664,00
29	VIGGDECNINEHNFVALYEYWSQSF	ILCAGVLEGGIDTCHR	1+	1.770,94	Serinoprotease	CEJ25501	26.664,00
	LCGG	WDKDIMLIR	1+	1.189,67			
30	-	VMGWGTIK	2+	445,72	Serinoprotease	B0FXM1	29.347,00
		YFFNCR	2+	453,70			
		WDKDIMLIR	2+	603,33			
		HILYVGVHDR	3+	441,27			
		ILCAGVLEGGIDTCHR	2+	885,92			
		LPATSRILCAGVLEGGIDTCHR	3+	799,45			
		VFDHLDWIQNI IAGSETVNCPS	3+	839,09			

		SPQETLPDVPHCANINLLDYEVC	3+	947,44			
		LNKPVSYSSEHIAPLSLPSPPPIVGSVCR	4+	751,91			
		TLCAGILEGGK	2+	559,79	F8S118		29.041,00
		FLVALYDPDR	2+	604,85			
		VFDHLDWIQSIIAGNTDATCPFVNF	3+	960,80			
		DSGGPLICNGEFQGI VSWGDSQAQPKP	4+	903,46	Q58G94		26.585,00
		ALYSK					
		VFDHLDWIQSIIAGNTDATCPFVNF	3+	960,80	J3SBQ3		28.578,00
		WNKDIMLIR	3+	402,56	Q91508		28.149,00
		CANINLLDYEVC	2+	820,41			
		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,46	B0FXM2		29.262,00
		NNEHIAPLSLPSPPSVGSVCR	2+	1.159,63			
		IAPISLPSNPPSVGSVCR	2+	925,56	A1E2S1		25.179,00
		LDSPVNNSARIAPISLPSNPPSVGSVCR	4+	726,65			
		VFDHLDWIQSIIAGNTTVTCPHENL	3+	960,80	T2HPG7		5.338,00
-		LTGCDPTTDVYTYR	2+	831,37	Crotoxina A (subunidade ácida)	P08878	15.273,00
-		EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	4+	790,95	Fator de crescimento endotelial vascular	C0K3N3	16.126,00
-		WfVASCIGK	2+	534,29	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00
		WSDGSSVSYDNLLDLYITK	2+	1.088,57			
		IFNEEMNWEDA EWFKTK	2+	1.133,02			
		EADFAWMVTQNIIEESF SHVSI GLR	3+	955,83			
-		GTWCEEQICECDR	2+	871,86	Fosfolipase A ₂	P62022	15.907,00
		NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.080,01			
-		LVILGFPCNQFGK	2+	746,92	Glutathiona peroxidase	V8P395	29.588,00
		QEPGQNSEILQGIK	2+	770,92			
31	VIGGDECNINEHNFLVALYEYWSQSF	-	-	-	Serinoprotease	CEJ25501	26.664,00
32	-	WDKDIMLIR	2+	595,36	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00
		THFLIYGVVHDR	2+	728,92			
		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,40			
		NNEHIAPLSLPSPPSVGSVCR	2+	1.159,55			
		VFDHLDWIQSIIAGNTIVNCP	3+	837,10			
		VMGWGQTTSPQNTLPDVPHCANINLLDYE	4+	922,22			
		VCR					
		ILCAGVLEGGIDTCHR	2+	885,96	B0FXM1		29.347,00
		SPQETLPDVPHCANINLLDYEVC	3+	947,48			
		LNKPVSYSSEHIAPLSLPSPPPIVGSVCR	4+	751,94			
		NSEHIAPLSLPSNPPSVGSVCR	2+	1.160,08	U5YCR8		27.783,00
		VFDHLDWIQSIIAGNTDATCPFVNF	3+	960,83	J3SBQ3		28.578,00
		ILCAGVLEGGIDTCKR	2+	881,47	Q9PSN3		26.479,00

	-	CANINLLDYEVC	2+	820,41		Q91508	28.149,00
	-	WVASCIGK	2+	534,29	Convulxina	O93426	18.141,00
		KWVASCIGK	2+	598,34	(subunidade α)		
		WSDGSSVSYDNLLDLYITK	2+	1.088,57			
		IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.125,02			
	-	EADFWAWMVTQNIIEESFSHVSIKLR	3+	955,83	Convulxina	O93427	17.403,00
	-	EWHEEFECLISR	2+	817,90	(subunidade β)		
		STFFWIGANNIWNK	2+	849,44			
		CNWQWSDGTPKPEYK	2+	899,93			
		TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,38			
	-	CNWQWSDGTPKPEYKEWHEEFECLISR	4+	854,62	Glutaciona	V8P395	29.588,00
	-	LVILGFPCNQFGK	2+	746,92	peroxidase		
		QEPGQNSEILQGIK	2+	770,92			
		HVRPGGGFVFNFLQFK	3+	643,37			
33	-	WVASCIGK	2+	534,30	Convulxina	O93426	18.141,00
		WSDGSSVSYDNLLDLYITK	2+	1.088,54	(subunidade α)		
		IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.133,00			
		EADFWAWMVTQNIIEESFSHVSIKLR	3+	955,83			
	-	EWHEEFECLISR	2+	817,88	Convulxina	O93427	17.403,00
		STFFWIGANNIWNK	2+	849,43	(subunidade β)		
		CNWQWSDGTPKPEYK	2+	899,93			
		TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,37			
	-	CNWQWSDGTPKPEYKEWHEEFECLISR	4+	854,61	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00
	-	WVKDIMLIR	2+	595,31			
		YFFNCGNNFTK	2+	706,31			
		EKYFFNCGNNFTK	2+	834,90			
		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,40			
		NNEHIAPLSLPPSPVGSVCR	2+	1.159,56			
		LPATSRILCAGVLEGGIDTCNR	3+	792,10			
		VFDHLDWIQSI IAGNTIVNCP	3+	837,10			
		VMGWGQTTSPQNTLPDVPKCANINLLDYE	4+	922,22			
		VCR					
		ILCAGVLEGGIDTCNR	3+	590,99		B0FXM1	29.347,00
		VFDHLDWIQNI IAGSETVNCPS	3+	839,10			
		SPQETLPDVPKCANINLLDYEVC	3+	947,45			
		LNKPVSYSSEHIAPLSLPPSPVGSVCR	4+	751,92			
		CANINLLDYEVC	2+	820,40		Q91508	28.149,00
		NSEHIAPLSLPPSPVGSVCR	3+	773,36		U5YCR8	27.783,00
		IMGWGAITSPNETFPDVPKCANINLNFNYT	4+	928,47		Q9DG83	28.664,00
		VCR					
	-	VDFDLESLSER	2+	655,34	Carboxipeptidase	V8NCB4	27.084,00
	-	LVILGFPCNQFGK	2+	746,89	Glutaciona	V8P395	29.588,00
		QEPGQNSEILQGIK	2+	770,92	peroxidase		

34	-	HVRPGGGFVPNFQLFQK	3+	643,36	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00		
		WVASCIGK	2+	534,29					
		WSDGSSVSYDNLDDLYITK	2+	1.088,53					
				IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,99	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00
				EADFVAWMVTQNIIEESFSHVSIGLR	3+	955,82			
				SAKEADFVAWMVTQNIIEESFSHVSIGLR	4+	788,67			
				VFKQEMTWADA EK	3+	528,28	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00
				EWHEEFECLISR	2+	817,88			
				STFFWIGANNIWNK	2+	849,39			
				TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,38	5'-nucleotidase	Q9PSN3 F8S0Z7	26.479,00 64.682,00
				FCTQQHTGSHLVSFHSSTEEVDFVVK	3+	974,17			
				CNWQWSDGTPKPEYKEWHEEFECLISR	4+	854,61			
				WDKDIMLIR	2+	595,32	Carboxipeptidase Glutaciona peroxidase	A0A077L6M5 V8NCB4 V8P395	64.640,00 27.084,00 29.588,00
				YFFNCGNNFTK	2+	706,31			
				EKYFFNCGNNFTK	2+	834,88			
				ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,45	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00
				NNEHIAPLSLSPSSPPSVGSVCR	2+	1.159,56			
				VFDHLDWIQSIIAGNTIVNCP	3+	837,11			
				VMGWGQTTSPQNTLPDVPHCANINLLDYE VCR	4+	922,22	5'-nucleotidase	Q9PSN3 F8S0Z7	26.479,00 64.682,00
				VFDHLDWIQNIAGSETVNCPS	3+	839,09			
				SPQETLPDVPHCANINLLDYEVC	3+	947,44			
				LNKPVSYSEHIAPLSLSPSPPIVGSVCR	4+	751,91	Carboxipeptidase Glutaciona peroxidase	A0A077L6M5 V8NCB4 V8P395	64.640,00 27.084,00 29.588,00
				NSEHIAPLSLSPSPPIVGSVCR	2+	1.159,60			
				VLSLNLVLCTECR	2+	732,38			
				HGEGMGELLQVSGIK	2+	777,92	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00
				LLLPSFLAAGGDGYHMLK	3+	635,03			
				YLGYNVIFDDKGNVIK	2+	986,13			
		FHECNLGNLICDAVIYNNVR	3+	807,75	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00		
		YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,11					
		HGQGMGELLQVSGIK	2+	777,92					
		VDFDLESLSER	2+	655,34	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00		
		LVILGFPCNQFGK	2+	746,93					
		HVRPGGGFVPNFQLFQK	3+	643,35					
35	-	WVASCIGK	2+	534,26	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00		
		KWVASCIGK	2+	598,34					
		WSDGSSVSYDNLDDLYITK	2+	1.088,50					
				IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,99	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00
				EADFVAWMVTQNIIEESFSHVSIGLR	3+	955,81			
				SAKEADFVAWMVTQNIIEESFSHVSIGLR	4+	788,67			
				QEMTWADA EK	2+	604,78	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00
				EWHEEFECLISR	2+	817,87			
				STFFWIGANNIWNK	2+	849,40			

		CNWQWSDGTKPEYK	3+	600,29			
		TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,37			
		FCTQQHTGSHLVSFHSTEEVDFVVK	4+	730,62			
		CNWQWSDGTKPEYKEWHEEFECLISR	4+	854,62			
-		WDKDIMLIR	2+	595,34	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00
		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,41			
		NNEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR	2+	1.159,61			
		VFDHLDWIQSI IAGNTIVNCP	3+	837,09			
-		VLSLNVLCTECR	2+	732,38	5'-nucleotidase	F8S0Z7	64.682,00
		HGEGMGELLQVSGIK	2+	777,94			
		HANFPILSANIRPK	3+	526,66			
		ETPVLSNPGPYLEFR	2+	859,95			
		YLGYNVIFDDKGNVIK	3+	657,71			
		FHECNLGNLICDAVIYNNVR	3+	807,74			
		YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,11			
		ETPVLSNPGPYLEFRDEVEELQNHANK	4+	782,17			
		HGQGMGELLQVSGIK	2+	777,94		A0A077L6M5	64.640,00
		HRHVLLLDAGDQYQGTIWFSFFK	4+	695,33			
		FHECNLGNLICDAVYNNLR	3+	807,74		U3FYP9	62.983,00
-		DLINVQPAAPNTLK	2+	747,42	Metaloprotease P-II	C0L2T8	53.639,00
-		IYTFLK	1+	784,46	Glutathiona peroxidase	V8P395	29.588,00
		LVILGFPCNQFGK	2+	746,87			
		QEPGQNSEILQGIK	2+	770,91			
		HVRPGGGFVVPNFQLFQK	2+	964,54			
-		VDFDLELSER	2+	655,34	Carboxipeptidase	V8NCB4	27.084,00
36	-	WVASCIGK	2+	534,25	Convulxina	O93426	18.141,00
		KWVASCIGK	2+	598,34	(subunidade α)		
		WSDGSSVSYDNLLDLYITK	2+	1.088,51			
		IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,95			
		EADFVAVMVTQNIIEESFSHVSI GLR	3+	955,81			
-		QEMTWADA EK	2+	604,78	Convulxina	O93427	17.403,00
		EWHEEFECLISR	2+	817,89	(subunidade β)		
		STFFWIGANNIWNK	2+	849,43			
		TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,37			
		CNWQWSDGTKPEYKEWHEEFECLISR	4+	854,63			
-		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,41	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00
		VFDHLDWIQSI IAGNTIVNCP	3+	837,10			
-		VLSLNVLCTECR	2+	732,39	5'-nucleotidase	F8S0Z7	64.682,00
		I IALGHSGFSEDQR	3+	510,62			
		HANFPILSANIRPK	3+	526,66			
		FHECNLGNLICDAVIYNNVR	3+	807,75			
		YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,10			

37	-	ETPVLSNPGPYLEFRDEVEELQNHANK	4+	782,16	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00						
		WVASCIGK	2+	534,29									
		KWVASCIGK	2+	598,34									
		WSDGSSVSYDNLDDLYITK	2+	1.088,49									
		IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,99									
		EADFWAWMVTQNIIEESFSHVSIQGLR	3+	955,80									
		QEMTWADAQK	2+	604,78				Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00			
		EWHEEFECLEISR	3+	545,59									
		STFFWIGANNIWNK	2+	849,40									
		TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,36									
		CNWQWSDGKPEYKEWHEEFECLEISR	4+	854,61									
		FWEDDGIR	2+	519,27				L-aminoácido oxidase	K9N7B7	56.827,00			
		ETDYEEFLEIAR	2+	757,87									
		DCADIVINDLSLIHQLPK	2+	1.032,57									
		RFDEIVGMDQLPQSMYEAQK	3+	800,74									
		YAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPFK	3+	985,16									
		IFFAGEYTAHAHGWIDSTIK	2+	1.133,00									
		DCADIVINDLSLIHELQK	3+	688,71									
		WDIYPYSLK	2+	592,82							Fosfolipase A ₂	A0A077L6L4 O93364 P62022	57.375,00 58.662,00 15.907,00
		YGYMFYPPDSR	2+	657,80									
		GTWCEEQICECDR	2+	871,85									
		NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.079,98									
		YGYMFYLDQR	2+	657,80									
		GTWCKEQICECDR	2+	871,85				Serinoprotease	Q6EER2 P0CAS5 B0FXM2	15.884,00 14.480,00 29.262,00			
		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,43									
		NNEHIAPLSLPPSPSVGQVCR	3+	773,41									
		VFDHLDWIQSIIAGNTIVNCPQ	3+	837,10									
		IIALGHSGFSEDQR	3+	510,61									
		HANFPILSANIRPK	3+	526,65				5'-nucleotidase	F8S0Z7	64.682,00			
		ETPVLSNPGPYLEFR	2+	859,97									
		YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,12									
		FLVNPQGKPVMR	3+	462,61							Glutathiona peroxidase	V8P395	29.588,00
		LVILGFPCNQFGK	2+	746,92									
QEPGQNSEILQGIK	2+	770,90											
HVRPGGGFVFNQFLQK	3+	643,35	Metaloprotease P-II	C0L2T8	53.639,00								
DLINVQPAAPNTLK	2+	747,40											
QPLPETLQLK	2+	583,86	Fosfodiesterase	J3SEZ3	96.373,00								
EQSSPLSCFPVPSPDVSGCK	2+	1.166,56											
VLSFILPHRPDENSECADTSPENLWVEER	4+	850,19											
38	-	WDKDIMLIR	2+	603,33	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00						
		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,39									
		NNEHIAPLSLPPSPSVGQVCR	2+	1.159,58									

	VFDHLDWIQSIIAGNTIVNCP	3+	837,09			
	VMGWGQTTSPQNTLPDVP	4+	922,21			
	VCR					
	NSEHIAPLSLPSNPPSVGSVCR	3+	773,72		U5YCR8	27.783,00
-	WVASCIGK	2+	534,28	Convulxina	O93426	18.141,00
	WSDGSSVSYDNLDDLYITK	2+	1.088,53	(subunidade α)		
	IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,97			
	EADFVAVMVTQNIIEESFSHVSI	3+	955,80			
-	STFFWIGANNIWNK	2+	849,44	Convulxina	O93427	17.403,00
	TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,37	(subunidade β)		
	FCTQQHTGSHLVSFHSTEEVDFVVK	4+	730,62			
	CNWQWSDGKPEYKEWHEEFCECLISR	4+	854,64			
-	FWEDDGIR	2+	519,24	L-aminoácido	K9N7B7	56.827,00
	NPLEECFR	2+	532,75	oxidase		
	KFWEDDGIR	2+	583,29			
	DWYANLGPMR	2+	611,79			
	SAAQLYVESLR	2+	618,83			
	SAAQLYVESLRK	3+	455,61			
	YILDKYDYSTK	2+	755,38			
	ETDYEEFLEIAR	2+	757,85			
	NNPGILEYPVKPSEEGK	2+	935,98			
	DCADIVINDLSLIHQLPK	2+	1.032,55			
	FDEIVGGMDQLPTSMYEAIK	2+	1.122,52			
	RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK	3+	800,74			
	NPLEECFRETDYEEFLEIAR	3+	854,07			
	KFGLQLNEFFQENENAWYFIK	3+	889,12			
	YAMGGITFTTPYQFQHFSEALTAPFK	3+	990,49			
	NNPGLLEYPVKPSEEGK	2+	935,98		P56742	58.767,00
	DCADIVINDLSLIHELK	2+	1.032,55		O93364	58.662,00
	NPLEQCFRETDYEEFLEIAR	3+	854,07		POC2D2	6.561,00
	ETNYEEFLEIAR	2+	757,87		POC2D6	2.931,00
	NPLEECFRETDYEEFLEIAR	3+	854,07			
-	TLGMLMEGLK	2+	546,80	Fosfodiesterase	J3SEZ3	96.373,00
	QPLPETLQLK	2+	583,85			
	TFLPIFVNPVN	2+	630,88			
	AATYFWPGSEVK	2+	678,35			
	DFYTFDSEGIVK	2+	710,85			
	LWNYFHHTLIPK	2+	766,93			
	AGYLENWDLSLMPNINK	2+	932,96			
	NPAWWGGQPIWHTATYQGLK	3+	771,40			
	EQSSPLSCLPFGVPSPDVSGCK	2+	1.166,55			
	NGLNVISGPIFDYNYDGHFDSYDTIK	3+	988,81			
	VLSFILPHRPDENSECADTSPENLWVEER	4+	850,17			

-	LVILGFPCNQFGK	2+	746,86	Glutathiona peroxidase	V8P395	29.588,00
	QEPGQNSEILQGIK	2+	770,89			
	HVRPGGFVFNQFLQK	3+	643,34			
-	WDIYPYSLK	2+	592,82	Fosfolipase A2	P62022	15.907,00
	YGYMFYPDSR	2+	657,79			
	GTWCCEQICECDR	2+	871,84			
	NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.079,99			
	YGYMFYLDSR	2+	657,79		Q6EER2	15.884,00
	GTWCKEQICECDR	2+	871,84		P0CAS5	14.480,00
-	HSDSN AFLHLFPDSFR	3+	630,64	Hialuronidase	A0A077L860	60.400,00
	KHSDSN AFLHLFPDSFR	3+	673,35			
	TKPDQYTGECPDIEMSR	3+	676,32			
	TFHGLGVIDWENWRPQWDR	3+	804,74			
	APMYPNEPFLVFWNAPTQCR	3+	847,09			
	DSTALFPNIYLETVLR	2+	926,51		J3S820	52.484,00
-	VDFDLESLSER	2+	655,32	Carboxipeptidase	V8NCB4	27.084,00
-	VLSLNLVCTEGR	2+	732,38	5'-nucleotidase	F8S0Z7	64.682,00
	ETPVLSNPGPYLEFR	2+	859,96			
	YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,12			
-	DLINVQPAAPNTLK	2+	747,43	Metaloprotease P-II	C0L2T8	53.639,00
	GHFKLQGEMYIIIEPLELSDSEDAVFK	3+	1.045,15			
39	YGPVSGEIIK	2+	531,79	Fosfodiesterase	J3SEZ3	96.373,00
	TLGMLMEGLK	2+	546,78			
	NPFYTPSPAK	2+	561,29			
	QPLPETLQLK	2+	583,81			
	TFLPIFVNPVN	2+	630,85			
	AATYFWPGSEVK	2+	678,29			
	DFYTFDSEGIVK	2+	710,83			
	LWNYFHTTLIPK	2+	766,89			
	STSTSVPPSASDCLR	2+	782,88			
	VNLMVDQQWMAVR	2+	795,40			
	DVELLTGLNFYSGLK	2+	834,95			
	SMQAI FLAHGPGFNEK	3+	582,96			
	AGYLENWDSLMPNINK	2+	932,96			
	VRDVELLTGLNFYSGLK	2+	962,52			
	NPAWWGGQPIWHTATYQGLK	3+	771,04			
	EQSSPLSCFPVSPDVSGCK	2+	1.166,47			
	NEVTSFENIEVYNLMCDLLK	3+	811,07			
	YISAYSQDILMPLWSSYTIYR	3+	857,44			
	NLHNCVNLILLADHGMEIISCDR	3+	908,42			
	CASSGATQCPAGFEQSPILIFSMGFR	3+	978,79			
	NGLNVISGPIFDYNYDGHFDSYDTIK	3+	988,78			
	IPIPTHYFVVLTSQENQINTPLNCLGPLK	4+	835,45			

	DSTALFPNIYLETVLR	2+	926,47			
	HSDSNAFLHLFPDSFR	2+	945,43			
	KHSDSNAFLHLFPDSFR	2+	1.009,51			
	TFHGLGVIDWENWRPQWDR	3+	804,75			
	APMYPNEPFLVFWNAPTQCR	3+	847,07			
	LELENLI FLINNFMCQCYQGWK	3+	950,47			
	VKDYMDGPLGR	3+	417,56	A0A077L860	60.400,00	
	TKPDQYTGECPDIEMSR	3+	676,28			
	NDQLLWLWR	2+	622,34	A3QVN2	52.543,00	
	VKTYMNGPLGR	3+	417,56	A3QVN9	52.312,00	
	VKDYMNGPLGR	3+	417,56	COL2W4	17.752,00	
	NDQLIWLWR	2+	622,34	U3FYQ4	52.078,00	
	NDKINWLWR	2+	622,34	I0CME7	51.427,00	
-	TLGMLMEGLK	2+	554,80	Fosfodiesterase	J3SEZ3	96.373,00
	NPFYTPSPAK	2+	561,30			
	QPLPETLQLK	2+	583,82			
	TFLPIFVNPVN	2+	630,86			
	AATYFWPGSEVK	2+	678,33			
	DFYTFDSEGIVK	2+	710,84			
	LWNYFHHTLIPK	2+	766,91			
	VNLMVDQQWMAVR	2+	795,41			
	DVELLTGLNFYSGLK	2+	834,96			
	SMQAI FLAHGPGFNEK	3+	588,31			
	AGYLENWD SLMPNINK	2+	940,95			
	VRDVELLTGLNFYSGLK	2+	962,53			
	NPAWWGGQPIWHTATYQGLK	3+	771,04			
	EQSSPLSCPF GPVPS PDVSGCK	2+	1.166,52			
	NEVTSFENIEVYNLMCDLLK	3+	811,07			
	CASSGATQCPAGFEQSPLILFSMDGFR	3+	978,79			
	NGLNVISGPIFDYNYDGHFDSYDTIK	3+	988,80			
	IPIPTHYFVVLTSCE NQINTPLNCLGPLK	4+	835,46			
	VLSFILPHRPDNSESCADTSPENLWVEER	4+	850,17			
	IANVLCSCSEDCLEK	2+	899,39	A0A077LA64	91.899,00	
-	VPTYVPLEK	2+	523,29	5'-nucleotidase	F8S0Z7	64.682,00
	QVPVVQAYAFGK	2+	653,84			
	YLGYNVIFDDK	2+	730,38			
	VLSLNVLCTECR	2+	732,31			
	I IALGHSGFSEDQR	3+	510,60			
	HGEGMGELLQVSGIK	2+	777,89			
	HANFPILSANIRPK	3+	526,64			
	ETPVLSNPGPYLEFR	2+	859,93			
	LLLPSFLAAGGDGYHMLK	2+	952,01			
	YLGYNVIFDDKGNVIK	2+	986,03			

		HPDDNEWNHVMCIVNGGGIR	3+	803,38			
		FHECNLGNLICDAVIYNNVR	3+	808,06			
		YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,10			
		ETPVLSNPGPYLEFRDEVEELQNHANK	4+	782,13			
		HGQGMGELLQVSGIK	2+	777,89			
-		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	873,93	Serinoprotease	A0A077L7M9 B0FXM2	65.019,00 29.262,00
		NNEHIAPLSLSPSSPPSVGVSVC	2+	1.159,60			
		VFDHLDWIQSIIAGNTIVNCP	3+	837,10			
-		WVASCIGK	2+	534,27	Convulxina	O93426	18.141,00
		WSDGSSVSYDNLDDLYITK	2+	1.088,53	(subunidade α)		
		IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,98			
		EADFVAWMVTQNIIEESFSHVSI	3+	955,81			
-		LVLGFPCNQFGK	2+	746,90	Glutaciona	V8P395	29.588,00
		QEPGQNSEILQGIK	2+	770,89	peroxidase		
		HVRPGGGFVFNQFLQK	2+	964,52			
-		WDIYPYSLK	2+	592,81	Fosfolipase A ₂	P62022	15.907,00
		YGYMFYPSDR	2+	657,78			
		GTWCEEQICECDR	2+	871,84			
		NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.079,99			
		GTWCKEQICECDR	2+	871,84			
-		VDFDLESLSER	2+	655,33	Carboxipeptidase	P0CAS5 V8NCB4	14.480,00 27.084,00
-		DLINVQPAAPNTLK	2+	747,43	Metaloprotease	COL2T8	53.639,00
		GHFKLQGEMYIIIEPLELSDSEDAVFK	3+	1.044,86	P-II		
41	-	YGPVSGEIIK	2+	531,80	Fosfodiesterase	J3SEZ3	96.373,00
		TLGMLMEGLK	2+	546,79			
		NPFYTPSPAK	2+	561,30			
		QPLPETLQLK	2+	583,84			
		TFLPIFVNPVN	2+	630,85			
		AATYFWPGSEVK	2+	678,33			
		DFYTFDSEGIVK	2+	710,84			
		LWNYFHTTLIPK	2+	766,90			
		VNLMVDQQWMAVR	2+	795,40			
		DVELLTGLNFYSGLK	2+	834,96			
		AGYLENWDSLMPNINK	2+	932,95			
		VRDVELLTGLNFYSGLK	2+	962,53			
		NPAWWGGQPIWHTATYQGLK	3+	771,03			
		EQSSPLSCFPVPSPDVSGCK	2+	1.166,52			
		NLHNCVNLILLADHGMEIISCDR	3+	908,44			
		CASSGATQCPAGFEQSPILIFSM	3+	978,78			
		NGLNVISGPIFDYNYDGHFDSYDTIK	3+	988,80			
		IPIPTHYFVVLTSQENQINTPLNCLG	4+	835,45			
		VLSFILPHRPDENSECADTSPENLW	4+	850,16			
		SYSEILSLK	2+	520,30		V8P682	100.914,00

	ILGQLMDGLK	2+	544,32			
	IEDIHLIVER	2+	618,85			
	TYLHTFESEI	2+	620,30			
	RIEDIHLIVER	2+	696,92			
	DIEQLTGLDFYR	2+	735,36			
	WGGQPIWITAAK	2+	757,39			
	DIDKILGQLMDGLK	2+	779,96			
	AGTFFWSNVIPIYER	2+	843,91			
	VRDIEQLTGLDFYR	2+	862,96			
	INSMQTVFLGYGPSFK	2+	894,95			
	YDAFLITNVIPIYPAFK	2+	1.010,02			
	QMSYGFLEFPQLSSSVETK	2+	1.073,54			
	TPECPAGFLHPPLIIFSDGFR	3+	824,10			
	NGVNVISGPIFDYDFDGLHDTDPK	3+	879,09			
	CDGPLSVLAYIFPHRPDNEDESCNNSSEDE SR	4+	895,90			
	IANVLCSCSEDCLEK	2+	899,39		T2HP62	96.588,00
	CASPSATQCPAGFEQSPILIFSMGFR	3+	997,78			
	CASPSATQCPAGFEQSPILIFSMGFR	3+	997,78		A0A077LA64	91.899,00
	CASPSATQCPAGFEQSPILIFSMGFR	3+	997,78		U3TAI7	96.239,00
-	VPTYVPLEK	2+	523,29	5'-nucleotidase	F8S0Z7	64.682,00
	QVPVQAYAFGK	2+	653,86			
	YLGYNVIFDDK	2+	730,39			
	VLSLNVLCTECR	2+	732,32			
	IIALGHSGFSEDQR	3+	510,60			
	HGEGMGELLQVSGIK	2+	777,88			
	HANFPILSANIRPK	3+	526,63			
	ETPVLSNPGPYLEFR	2+	859,93			
	LLLPSFLAAGGDGYHMLK	2+	952,01			
	YLGYNVIFDDKGNVIK	2+	986,03			
	HPDDNEWNHVMCIVNGGGIR	3+	803,03			
	FHECNLGNLICDAVIYNNVR	3+	807,71			
	YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,10			
	ETPVLSNPGPYLEFRDEVEELQNHANK	4+	782,15			
	HGQGMGELLQVSGIK	2+	777,88		A0A077L7M9	65.019,00
	FHECNLGNLICDAVVYNNLR	3+	807,71		U3FYP9	62.983,00
-	WVASCIGK	2+	534,26	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00
	KWFVASCIGK	2+	598,33			
	WSDGSSVSYDNLDDLYITK	2+	1.088,52			
	IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,97			
	EADFVAVMVTQNIIEESFSHVSIKLR	3+	955,81			
-	EWHEEFECLISR	2+	817,88	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00
	STFFWIGANNIWNK	2+	849,42			

		TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,37			
		CNWQWSDGKPEYKEWHEEFECCLISR	4+	854,61			
-		NNQLLWLWR	2+	621,85	Hialuronidase	J3S820	52.484,00
		DLHPELSEDEIKR	3+	527,60			
		DSTALFPNIYLETVLR	2+	926,49			
		HSDSNAFLHLFPDSFR	2+	945,46			
		KHSDSNAFLHLFPDSFR	3+	673,34			
		TFHGLGVIDWENWRPQWDR	4+	603,80			
		APMYPNEPFLVFWNAPTQCR	3+	847,08			
		TKPDQYTGECPDIEMSR	3+	676,31		A0A077L860	60.400,00
		NDQLLWLWR	2+	621,85		A3QVN2	52.543,00
		NDQLIWLWR	2+	621,85		U3FYQ4	52.078,00
-		ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,42	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00
		NNEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR	3+	773,40			
		VFDHLDWIQSI IAGNTIVNCP	3+	837,10			
-		DLINVQPAAPNTLK	2+	747,42	Metaloprotease P-II	C0L2T8	53.639,00
-		SAAQLYVESLR	2+	618,85	L-aminoácido oxidase	K9N7B7	56.827,00
		ETDYEEFLEIAR	2+	757,86			
		YAMGGITFTFPYQFQHFSEALTAPFK	3+	985,16			
		ETNYEEFLEIAR	2+	757,86		P0C2D6	2.931,00
-		LVILGFPCNQFGK	2+	746,87	Glutaciona peroxidase	V8P395	29.588,00
		QEPGQNSEILQGIK	2+	770,89			
		HVRPGGGFVFNQFLQK	2+	964,52			
42	-	WVASCIGK	2+	534,253	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00
		KWVASCIGK	2+	598,327			
		WSDGSSVSYDNLDDLYITK	2+	1.088,52			
		IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,97			
		EADFAWMVTQNIIEESFHVSI GLR	3+	955,81			
-		EWHEEFECCLISR	2+	817,87	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00
		STFFWIGANNIWNK	2+	849,42			
		TFDNQWLSAPCSDTYSFVCK	3+	809,36			
		MTHQSLKSTFFWIGANNIWNK	3+	847,08			
		CNWQWSDGKPEYKEWHEEFECCLISR	4+	854,61			
-		YPGSPGSYAVR	2+	577,29	Glutaminil ciclase	U3TBM3	40.742,00
		WSPSDSLYGSR	2+	627,79			
		LIFFDGEEAFVR	2+	721,86			
		HPVEDDHI PFLR	3+	492,25			
		NPVFPVYFLNTAR	2+	769,39			
		GVPIHLHLPSPFPR	2+	771,95			
		MWQNDLHPILIER	2+	832,93			
		NLYDLGLLNYSER	2+	885,94			
		VFVGATDSAVPCAMMLELAR	2+	1.069,53			

-	LQGLQAGWLVEEDTFQSHTPYGYR	3+	932,44			
	DHQEFLIK	2+	515,27	Metaloprotease	C5H5D1	46.165,00
	LYCFPNSPENK	2+	684,77			
	DECDMADVCTGR	2+	714,78			
	LFLVADYIMYLK	2+	744,91			
	NPCNIYYSPNDEDK	2+	864,85			
	MYDIVNVITPIYHR	2+	867,44			
	QGAQCAEGLCCDQCR	2+	906,87			
	NPCNIYYSPNDEDKGMVLPGTK	3+	838,03			
	IHDLVIAIAIAHEMGHNLGMDHDK	4+	635,07			
	MYDIDNVITPIYHR	3+	583,97			
-	VPTYVPLEK	2+	523,30	5'-nucleotidase	Q076D1	46.565,00
	QVPVVQAYAFGK	2+	653,86		F8S0Z7	64.682,00
	YLGYNVIFDDK	2+	730,39			
	VLSLNVLCTECR	2+	732,35			
	HGEGMGELLQVSGIK	2+	777,89			
	HANFPILSANIRPK	3+	526,65			
	ETPVLSNPGPYLEFR	2+	859,94			
	LLLPSFLAAGGDGYHMLK	2+	952,01			
	YLGYNVIFDDKGNVIK	2+	986,04			
	HPDDNEWNHVSMCIVNGGGIR	3+	803,37			
	FHECNLGNLICDAVIYNNVR	3+	807,72			
	YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,11			
	ETPVLSNPGPYLEFRDEVEELQNHANK	4+	782,15			
	HGQGMGELLQVSGIK	2+	777,89		A0A077L7M9	65.019,00
	FHECNLGNLICDAVVYNNLR	3+	807,72		U3FYP9	62.983,00
	YDAMALGNHEFDNGLNGLLDPLLK	3+	882,46			
-	YGPVSGEIIK	2+	531,80	Fosfodiesterase	J3SEZ3	96.373,00
	TLGMLMEGLK	2+	546,80			
	QPLPETLQLK	2+	583,84			
	TFLPIFVNPVN	2+	630,87			
	DFYTFDSEGIVK	2+	710,84			
	LWNYFHHTLIPK	2+	766,92			
	VRDVELLTGLNFYSGLK	2+	962,54			
	NPAAWGGQPIWHTATYQGLK	3+	771,05			
	EQSSPLSCPFGPVSPDVSGCK	2+	1.166,53			
	YISAYSQDILMPLWSSYTIYR	3+	857,44			
	CASSGATQCPAGFEQSPILILFSDMGFR	3+	978,79			
	VLSFILPHRPDNSESCADTSPENLWVEER	4+	850,16			
	IEDIHLLVER	2+	618,84		V8P682	100.914,00
	DIEQLTGLDFYR	2+	735,38			
	DIDKILGQLMDGLK	2+	779,94			
	AGTFFWSNVIPYER	2+	843,92			

	INSMQTVFLGYGPSFK	2+	894,96			
	YDAFLITNVIPMYPAFK	2+	1.002,03			
	TPECPAGFLHPPLIIIFSVDGFR	3+	824,10			
	NGVNVISGPIFDYDFDGLHDTDPK	3+	879,42			
	CDGPLSVLAYIFPHRPDDESCNNSSEDE SR	4+	895,90			
	IANVLCSCSEDCLEK	2+	899,39		T2HP62	96.588,00
	CASPSATQCPAGFEQSPLILFSMDGFR	3+	997,80			
	CASPSATQCPAGFEESPLILFSMDGFR	3+	997,80		U3TAI7	96.239,00
-	ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,43	Serinoprotease	BOFXM2	29.262,00
	NNEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR	3+	773,40			
	VFDHLDWIQSI IAGNTIVNCP	3+	837,10			
-	VVPESLFAWER	2+	666,86	Fosfolipase B	A0A077L7E7	64.115,00
	FTAYAINGPPVEK	2+	703,88			
	HGLEFSYEMAPR	2+	718,85			
	SLEDGTLYIIEQVPK	2+	852,94			
-	DLHPELSEDEIKR	3+	527,61	Hialuronidase	J3S820	52.484,00
	DSTALFPNIYLETVLR	2+	926,51			
	HSDSNAPLHLFPDSFR	3+	630,63			
	TFHGLGVIDWENWRPQWDR	3+	804,73			
	TKPDQYTGECPDIEMSR	3+	676,31			
-	VDFDLESLSER	2+	655,32	Carboxipeptidase	A0A077L860	60.400,00
-	LVILGFPCNQFGK	2+	746,88	Glutaciona peroxidase	V8NCB4 V8P395	27.084,00 29.588,00
	QEPGQNSEILQGIK	2+	770,91			
	HVRPGGGFVVPNFQLFQK	3+	643,34			
-	IAFLPFGYLIDQWR	2+	869,97	Enzima conversora de angiotensina	V8NKA6	143.619,00
	IAFLPFGYLIDQWR	2	869,97			
	KIIGSIQTLGPSNLPLEK	2+	953,99			
	LLEHLEDNIESDINYLMSIALDK	3+	902,12			
-	SAAQLYVESLR	2+	618,84	L-aminoácido oxidase	K9N7B7	56.827,00
	ETDYEEFLEIAR	2+	757,86			
	YAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPFK	3+	985,16			
	ETNYEEFLEIAR	2+	757,86		POC2D6	2.931,00
-	AWSAEPECIVSK	2+	688,82	Crotocetina	Q719L8	16.728,00
43	WVASCIGK	2+	534,25	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00
	WSDGSSVSYDNLLDLYITK	2+	1.088,52			
	IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,97			
	EADFVAVMVTQNIIEESFSHVSIGLR	3+	955,79			
-	EWHEEFELISR	2+	817,89	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00
	STFFWIGANNIWNK	2+	849,40			
-	LIFFDGEEAFVR	2+	721,88	Glutaminil ciclase	U3TAD9	34.563,00
	WQNDLHPILIER	2+	767,41			
	NPVFPVYFLNTAR	2+	769,36			

	MWQNDLHPILIER	2+	832,90			
	NLYDLGLLNYSER	2+	885,89			
	VFVGATDSAVPCAMMLELAR	2+	1.077,51			
	LQGLQAGWLVEEDTFQSHTPYGYR	3+	932,42			
-	HGEGMGELLQVSGIK	2+	777,89	5'-nucleotidase	F8S0Z7	64.682,00
	ETPVLSNPGPYLEFR	2+	859,94			
	HGQGMGELLQVSGIK	2+	777,89		U3T7C6	55.517,00
-	YYVWIGLR	2+	535,31	Crotocetina	Q719L9	18.199,00
	ETEFLQWYNTDCEEK	2+	996,41			
-	LLSLPNIR	2+	463,28	Carboxipeptidase	V8P5W4	48.962,00
	FLPTVPWGK	2+	522,79			
	QVGEFYQVIVR	2+	669,36			
	VDFDLESLSER	2+	655,32		V8NCB4	27.084,00
-	IAFLPFGLIDQWR	2+	869,95	Enzima conversora de angiotensina	V8NKA6	143.619,00
	LLEHLEDNIESDINYLSIALDK	3+	896,80	Glutaciona		
-	LVILGFPCNQFGK	2+	746,90	peroxidase	V8P395	29.588,00
	HVRPGGGFVFNQFLQK	3+	643,33	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00
-	ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,42	Fosfolipase B	T2HQ75	64.133,00
-	VVPESLFAWER	2+	666,85	Convulxina (subunidade α)	O93426	18.141,00
44	WVASCIGK	2+	534,28			
	KWVASCIGK	2+	598,32			
	WSDGSSVSYDNLLDLYITK	2+	1.088,51			
	IFNEEMNWEDAWEFCTK	2+	1.124,97			
	EADFVAVMVTQNIIEESFHVSIKGLR	3+	955,79			
-	EWHEEFECLISR	2+	817,84	Convulxina (subunidade β)	O93427	17.403,00
	STFFWIGANNIWNK	2+	849,40			
	FCTQQHTGSHLVSFHSSTEEVDFVVK	4+	730,61			
	CNWQWSDGTPKPEYKEWHEEFECLISR	4+	854,61			
-	YLGYNVIFDDK	2+	730,38	5'-nucleotidase	F8S0Z7	64.682,00
	VLSLNVLCTECR	2+	732,35			
	HGEGMGELLQVSGIK	2+	777,89			
	ETPVLSNPGPYLEFR	2+	859,93			
	LLLPSFLAAGGDGYHMLK	2+	952,01			
	YLGYNVIFDDKGNVVK	2+	986,03			
	HPDDNEWNHVSVCIVNGGGIR	3+	803,03			
	FHECNLGNLICDAVIYNNVR	3+	807,72			
	YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK	3+	863,10			
	HGQGMGELLQVSGIK	2+	777,89		A0A077L7M9	65.019,00
-	FWEDDGIR	2+	519,25	L-aminoácido oxidase	K9N7B7	56.827,00
	SAAQLYVESLR	2+	618,85			
	ETDYEEFLEIAR	2+	757,86			
	DCADIVINDLSLIHQLPK	2+	1.032,54			
	IYFAGEYTAQFHGWIDSTIK	3+	783,07			

	RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIK	3+	800,73			
	YAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPFK	3+	985,15			
	ETNYEEFLEIAR	2+	757,86		POC2D6	2.931,00
	DCADIVINDLSLIHELK	2+	1.032,54		O93364	58.662,00
-	LIFFDGEEAFVR	2+	721,86	Glutaminil	U3FZH0	42.150,00
	NPVFPVYFLNTAR	2+	769,41	ciclase		
	GVPIHLHLIPSPFPR	2+	771,96			
	MWQNDLHPILIER	3+	555,63			
	LQGLQAGWLVEEDTFQSHTPYGYR	3+	932,45			
	NLYDLGLLNYSER	2+	885,94		A0A077LD07	42.305,00
-	VAVPFSPAIR	2+	528,82	Carboxipeptidase	V8NCB4	27.084,00
	VDFDLESLSER	2+	655,32			
	GVIHWIMDIPFVLSANLHGGDLVANYPYD	4+	903,96			
	ETR					
-	WDIYPYSLK	2+	592,80	Fosfolipase A2	P62022	15.907,00
	YGYMFYPDSR	2+	649,79			
	NAIPFYAFYGCYCGWGGR	2+	1.079,96			
-	LVILGFPCNQFGK	2+	746,86	Glutaciona	V8P395	29.588,00
	QEPGQNSEILQGIK	2+	770,88	peroxidase		
	HVRPGGGFVFNQFLFQK	3+	643,35			
-	QPLPETLQLK	2+	583,85	Fosfodiesterase	A0A077LA64	91.899,00
	TFLPIFVNPVN	2+	630,87			
	NPAWWGGQPIWHTATYQGLK	3+	771,07			
-	YYVWIGLR	2+	535,31	Crotocetina	Q719L9	18.199,00
	TWEDAWEFCTKQAK	2+	900,88			
	ETEFLQWYNTDCEEK	2+	996,42			
	GAHLVSVESAGEADFVAQLVAENIK	3+	852,12			
	AWSAEPECIVSK	2+	688,82		Q719L8	16.728,00
-	ILCAGVLEGGIDTCNR	2+	874,43	Serinoprotease	B0FXM2	29.262,00
	VFDHLDWIQSIIAGNTIVNCP	3+	837,10			
-	DLINVQPAAPNTLK	2+	747,42	Metaloprotease	C0L2T8	53.639,00
				P-II		

*N-terminal: obtido através do método de degradação de Edman

**MS/MS: sequências peptídicas determinadas por espectrometria de massas através de equipamentos do tipo MALDI e ESI, sendo que os peptídeos que apresentaram carga 1+ foram obtidas por MALDI.

***MM: massa molecular. Os dados de massas moleculares (Da) foram buscados no UniProtKB.

Os resultados apresentados neste estudo proteômico corroboram com os resultados apresentados por Boldrini-França e colaboradores (2010) quando determinaram o proteoma da peçonha da mesma subespécie (*C. d. collilineatus*). No presente estudo apenas uma proteína já descrita para esta peçonha não foi detectada. No entanto, outras 9 foram identificadas pela primeira vez e serão discutidas posteriormente. A diferença entre esses resultados confirma a ocorrência de variações individuais relevantes, já que em ambos os trabalhos as serpentes são originadas da região de Goiás (GO).

A única proteína que não foi identificada no presente estudo é a proteína secretória rica em cisteína (CRISP). Esta proteína tem massa molecular entre 20 kDa e 30 kDa, contendo 16 resíduos de cisteína, formando 8 pontes dissulfeto (YAMAZAKI; MORITA, 2004). Suas propriedades biológicas ainda não foram totalmente elucidadas. Estudos anteriores mostram que as CRISPs podem bloquear canais para cálcio do tipo L (YAMAZAKI et al., 2002) e são capazes de inibir a angiogênese (LECHT et al., 2015), não apresentaram atividade enzimática e não se mostraram tóxicas para ratos (UTKIN; OSIPOV, 2007).

As proteínas encontradas no presente trabalho e por Boldrini-França e colaboradores (2010) são:

- Crotamina – esta proteína foi encontrada nas frações 1, 2, 3 e 4, sendo que apenas a peçonha 3 possui as 3 primeiras frações (Fig. 8), enquanto a fração 4, só esteve presente na peçonha 9 (Fig. 11). Schenberg (1959) analisou a frequência de crotamina em serpentes da subespécie *C. d. terrificus* em Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Seu estudo revelou que a frequência de crotamina nesta subespécie aumentou de acordo com o eixo leste-oeste, sendo que, as serpentes do leste não secretavam crotamina e as do oeste, secretavam. Porém, a região mais central deste eixo, mostrava ambos os tipos de serpentes, o que indicava que a variação de crotamina nas peçonhas de serpente era de caráter Mendeliano. Boldrini-França e colaboradores (2010) demonstraram que a frequência de crotamina também aumentou de acordo com o eixo norte-sul. Esta miotoxina leva a extensão e induz paralisia das patas traseiras de camundongos, pois atua bloqueando canais para potássio (PEIGNEUR et al., 2012). Esta proteína apresenta atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (OGUIURA et al., 2011) e antimalárica (EL-CHAMY-MALUF et al., 2016);
- Metaloproteases – estas enzimas foram encontradas nas frações 35, 37 a 42 e 44 (Tab. 8). Estas enzimas são capazes de causar hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2016), alterando a

integridade capilar. Elas possuem também atividade fibrinolítica, fibrinogenolítica, ativam o fator X da cascata de coagulação e também a protrombina, inibem a agregação plaquetária e induzem a apoptose (FOX; SERRANO, 2005). Desta forma, desempenham um papel importante na fisiopatologia do envenenamento crotálico (FOX; SERRANO, 2009);

- Desintegrinas – são proteínas relacionadas ao termo ADAM (do inglês, *A Disintegrin And Metalloprotease*), sendo metaloproteases ancoradas na membrana, que possuem um domínio extracelular com a porção aminoterminal de metaloproteases e um domínio de desintegrina (MOURA-DA-SILVA; THEAKSTON; CRAMPTON, 1996; CALVETE et al., 2009d; CALVETE, 2010), sendo inibidores de integrinas (CALVETE et al., 2005) e inibidores da agregação plaquetária (MARKLAND, 1998). Estas proteínas podem estar livres na peçonha ofídica devido a um processo proteolítico de precursores de metaloprotease do tipo P-II (KINI; EVANS, 1992). Possuem um resíduo de aspartato (D) conservado em seu domínio (KGD, MGD, MLD, RGD, VGD ou WGD), que pode ser responsável pela interação dessa proteína com receptores de integrina (CALVETE, 2013a). Por apresentarem uma massa molecular baixa (menor que 10 kDa) e a sequência encontrada por espectrometria de massas estar contida no domínio desintegrina, podemos dizer que nas frações de 4 a 7, temos a proteína desintegrina sem a porção aminoterminal de metaloproteases (Tab. 8 e Fig.18). Estudos atuais mostram que as desintegrinas podem induzir a apoptose em células de melanoma humano (HAMMOUDA et al., 2016);
- LAAO – esta enzima está presente nas frações 37, 38, 39, 41, 42 e 44, de acordo com dados de espectrometria de massas (Tab. 8). Entretanto, como já dito anteriormente, sua massa molecular é alta (~60 kDa) e pode não ter sido evidenciada pela eletroforese (Fig. 18) em algumas frações, como na fração 37, pois, esta toxina pode estar em quantidades muito menores do que as outras proteínas encontradas na fração. Dessa forma, a quantidade aplicada na eletroforese não foi suficiente para evidenciar todos os componentes da amostra. A enzima LAAO apresenta atividades citotóxicas (RIBEIRO et al., 2016), apoptótica, bactericida, antiparasitária, edematogênica e de agregação plaquetária (BREGGE-SILVA et al., 2012). Estas ações são devidas, principalmente, à deaminação oxidativa de L-aminoácidos, liberando H₂O₂, levando a produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo. Apesar disto, a atividade

da LAAO na clínica do envenenamento ainda não foi muito bem determinada (FOX, 2013);

- Proteínas do complexo da crotoxina – As duas proteínas que formam o complexo da crotoxina (fosfolipase A₂ e crotapotina) foram encontradas nas peçonhas, em muitas das frações, exceto nas 1 a 7, 25, 28, 29, 31 a 36, 39 e 41 a 43 (Tab. 8). A crotapotina e a fosfolipase A₂ são os componentes majoritários da peçonha de *C. d. collilineatus*, sendo eluídas principalmente nas frações 9 a 14 e 19 a 21, respectivamente (Fig. 18). Estas proteínas quando associadas fazem com que a atividade enzimática da fosfolipase diminua, mas eleva o grau de letalidade do complexo em dez vezes (CHANG; SU, 1981; RADVANYI et al., 1989). Estas proteínas são responsáveis pela nefrotoxicidade (MARTINS et al., 2002; AMORA et al., 2006) e neurotoxicidade (HAWGOOD, 1990) observadas no envenenamento crotálico. Estudos recentes revelaram que a crotoxina é capaz de atenuar a colite em camundongos, causando um efeito imunomodulatório potente (ALMEIDA et al., 2015);
- Convulxina – esta proteína é formada por duas subunidades, α e β , formando uma estrutura tetramérica, capaz de ativar plaquetas, mas não tem atividade hemaglutinante como as lectinas (TOYAMA et al., 2001; ARLINGHAUS; EBLE, 2012). Essa toxina foi encontrada nas frações 30 e 32 a 44 (Tab. 8);
- Serinoprotease – enzima encontrada a partir da fração 25 (Tab. 8), que é capaz de afetar o sistema hematológico, interferindo na agregação plaquetária, fibrinólise e coagulação sanguínea (SERRANO; MAROUN, 2005). Estudos recentes mostram que esta enzima, quando é submetida a PEGlação (técnica a qual conjuga polietilenoglicol a molécula de interesse, resultando em melhora da farmacocinética e farmacodinâmica da molécula, diminuindo sua depuração renal, aumentando a solubilidade em água e a protegendo de degradação enzimática) pode ser um potente biofármaco (DA-SILVA-FREITAS; BOLDRINI-FRANÇA; ARANTES, 2015). Entre as serinoproteases encontra-se a enzima giroxina, que possui ação como as serinoproteases, porém, possui este nome devido a síndrome gerada em animais que a recebem, pois estes começam a girar em torno de seu próprio eixo (SILVA et al., 2012);

- VEGF – esta proteína foi encontrada nas frações 18, 23, 24, 26 e 30 (Tab. 8) e possui ação angiogênica e linfangiogênica (YAMAZAKI et al., 2009). Este fator de crescimento também possui atividade hipotensora e proliferativa do endotélio vascular por se ligar em receptores que contem o domínio de inserção a quinase (KDR) (YAMAZAKI et al., 2003).

Além destas toxinas, foi verificada a presença de outro fator de crescimento, NGF, nas frações 18 e 27 (Tab. 8), proteínas as quais também são visíveis nos perfis eletroforéticos dessas frações (Fig. 18). Esta proteína possui massa molecular entre 30 kDa (SIIGUR et al., 1985) e 27 kDa, de acordo com o banco de dados UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>). Essa proteína havia sido identificada apenas em dados do transcriptoma dessa subespécie (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009) e até o momento não havia trabalho algum relatando que era expressa na peçonha. Portanto, nosso estudo é o primeiro que mostra que o NGF é expresso na peçonha de *C. d. collilineatus*. Essa proteína possui atividade pró-apoptótica e contribui para a difusão de outros componentes da peçonha durante o envenenamento, de forma que libera mediadores químicos, levando ao aumento da permeabilidade vascular e inflamação (SUNAGAR et al., 2013).

Embora já existam estudos sobre venômica da peçonha de *C. d. collilineatus*, algumas proteínas foram identificadas pela primeira vez no presente estudo. Estes dados mostram a grande contribuição do mesmo para o conhecimento da composição proteica desta peçonha. São elas:

- ECA – enzima capaz de converter angiotensina I em angiotensina II, sendo capaz, também de degradar bradicinina e outros peptídeos vasoativos. Sendo assim, esta enzima é capaz de modular a pressão arterial, tornando-se um promissor alvo para o tratamento de insuficiência cardíaca, hipertensão e diabetes nefropática (NG; VANE, 1967; IMIG, 2004; ZHANG; WU; XU, 2013). Em relação às peçonhas ofídicas, no banco de dados UniProtKB existem apenas 2 depósitos de sequências de aminoácidos de ECA, ambas da espécie *Ophiophagus hanna*. No presente estudo, esta enzima foi encontrada nas frações 42 e 43 (Tab. 8);
- Hialuronidase – esta enzima foi encontrada nas frações de 38 a 42 (Tab. 8) e possui atividade de “espalhamento”, devido à hidrólise de ácido hialurônico da matriz intersticial, ou seja, de uma barreira dérmica, o que permite a difusão dos outros componentes da peçonha pela pele (HECHTER, 1947). Esta toxina é encontrada em

diversas peçonhas das famílias Viperidae (GIRISH et al., 2002), e na espécie *C. durissus*, essa toxina já foi identificada nas peçonhas de *C. d. terrificus* (BORDON et al., 2012) e *C. d. collilineatus* (CASTANHEIRA; BRANDEBURGO, 2008), sendo que, no presente estudo, as sequências peptídicas encontradas pela primeira vez para a essa peçonha, não havendo depósitos no banco de dados UniProtKB;

- Fosfodiesterase – estas enzimas são catalisadores da hidrólise de ligações fosfodiéster, gerando 5'-mononucleotídeos (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010) e, também, possuem atividades de inibição da agregação plaquetária (SANTORO et al., 2009) e causam hipotensão e depressão locomotora da presa (RUSSELL; BUESS; WOO, 1963). No presente estudo, esta enzima foi encontrada nas frações 37 a 42 e 44 (Tab. 8). Em estudos anteriores, esta proteína já foi encontrada nas peçonhas de *Vipera lebetina* (TRUMMAL et al., 2014) e *Pseudonaja textilis* (MCCLEARY et al., 2016);
- 5'-nucleotidase – toxina capaz de catalisar a clivagem de 5'-AMP e liberar adenosina (TRUMMAL et al., 2015), podendo levar a inibição da agregação plaquetária (OUYANG; HUANG, 1983; CHEN et al., 2008; HART et al., 2008). Ela pode também, por sinergia, aumentar os efeitos anticoagulantes de desintegrinas, ADPases e fosfolipases (DA SILVA; AIRD, 2001). No presente estudos, essa toxina foi identificada nas frações 35 a 44 (tabela 8), sendo que também já foi encontrada nas peçonhas de *Pseudonaja textilis* (MCCLEARY et al., 2016) e *Naja naja karachiensis* (BIN et al., 2016);
- Carboxipeptidase – esta enzima foi encontrada nas frações 33 a 35, 38 a 40 e 42 a 44 (Tab. 8). Ela tem ação de liberar resíduos de arginina e lisina da porção C-terminal do peptídeo, podendo estar envolvida nos processos de modificações pós-traducionais e já foi encontrada no proteoma de *C. vegrandis* (VIALA et al., 2015). Essa proteína pode ser utilizada como biomarcador para metástase em tumores neuroendócrinos (LEE et al., 2011) e biomarcador para tumores hepatocelulares (HUANG et al., 2016);
- Glutaminil ciclase – esta toxina é responsável pela ciclização de glutamina na porção N-terminal de toxina, sendo que esta modificação pós-traducional pode contribuir indiretamente para a toxicidade do acidente ofídico, pois essa modificação pode alterar

a atividade biológica de outras toxinas, bem como, torná-las resistentes à proteólise (PAWLAK; KINI, 2006). No presente estudo, essa enzima foi detectada nas frações 42 a 44 (Tab. 8). Outros estudos revelam que essa enzima está presente nas glândulas de peçonha de *Sistrurus catenatus edwardsii* (CHAPEAUROUGE et al., 2015) e *Bothrops jararaca* (GONÇALVES-MACHADO et al., 2016), no proteoma de *C. atrox* (FOX et al., 2006) e *C. d. terrificus* (GEORGIEVA et al., 2010);

- Crotoctina – esta toxina apresenta homologia com a convulxina, pode induzir a agregação plaquetária e tem ação antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e positivas, podendo ser isolada da peçonha de *C. durissus*, especialmente de *C. d. cascavella* (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2006), mas também foi encontrada no proteoma de *C. vegrandis* (VIALA et al., 2015) e de *Daboia russelii* (SHARMA et al., 2015). No presente estudo, essa proteína se encontra entre as frações 42 e 44 (Tab. 8);
- Glutaciona peroxidase – enzima capaz de catalisar a redução de hidroxiperóxidos pela glutaciona, evitando danos oxidativos desses compostos, sendo que sua ação no acidente ofídico ainda não foi elucidada (VIALA et al., 2015). No presente estudo foi identificada nas frações 30, 32 a 35 e 37 a 44 (Tab. 8). Esta enzima já foi identificada nas peçonhas de *C. d. terrificus* (MELANI et al., 2015), *C. vegrandis* (VIALA et al., 2015), *Micrurus clarki*, correspondendo a 0,2% da peçonha (LOMONTE et al., 2016), e *Naja melanoleuca*, correspondendo a 0,9% da peçonha (LAURIDSEN et al., 2016).

Essas proteínas foram identificadas a partir das duas metodologias utilizadas neste estudo (LC-MS e venômica). No entanto, a NADH desidrogenase foi identificada apenas através da técnica LC-MS (Tab. 5), como descrito no item 3.2, enquanto a fosfolipase B, através da venômica (Tab. 8), como descrita por Calvete e colaboradores (2007).

A enzima NADH desidrogenase já foi identificada em abundância na glândula de *Deinagkistrodon acutus*, sendo uma das enzimas que atendem às necessidades energéticas da síntese proteica, ou seja, da produção de toxinas pela glândula e, também, necessária para a contração da mesma (ZHANG et al., 2006).

A fosfolipase B foi identificada nas frações 42 e 43 (tabela 8). Essa toxina foi identificada, recentemente, nas peçonhas de *Lachesis muta rhombeata* (WIEZEL et al., 2015), de *C. d. terrificus* (MELANI et al., 2015) e, também, de *Sistrurus catenatus edwardsii*, possuindo ação de clivar ligações éster de glicerolípídeos, na posição sn-1 e sn-2

(CHAPEAUROUGE et al., 2015), porém, sua ação no envenenamento ainda não está elucidada (WIEZEL et al., 2015).

As proteínas ECA, fosfodiesterase, 5'-nucleotidase, carboxipeptidase, glutaminil ciclase, crotocetina, glutathiona peroxidase, NADH desidrogenase e fosfolipase B, já foram descritas em estudos anteriores de peçonhas ofídicas. No entanto, é importante ressaltar que a identificação dessas proteínas por técnicas ômicas na peçonha de *C. d. collilineatus* é descrita pela primeira vez neste estudo. Estas informações ampliam significativamente o conhecimento sobre a composição desta peçonha, o que o torna muito relevante. Adicionalmente, estas informações podem contribuir para o conhecimento da sintomatologia do envenenamento crotálico, bem como para a melhoria do soro antiofídico.

4.2. Reconhecimento das peçonhas e dos componentes ofídicos pelo soro anticrotálico comercial

O método de ELISA é um ensaio imunoenzimático que tem se mostrado o ensaio mais específico, barato, simples, sensível e de rápida execução para a detecção de toxinas e peçonhas ofídicas (SELVANAYAGAM; GOPALAKRISHNAKONE, 1999). Essa metodologia foi utilizada pela primeira vez para detectar peçonhas ofídicas e anticorpos antiofídicos em 1977 (THEAKSTON; LLOYD-JONES; REID, 1977).

Nas últimas décadas, essa metodologia tem sido utilizada para diversas finalidades, como determinar a potência do soro antiofídico (BARBOSA et al., 1995) e detectar níveis de antígenos e anticorpos em fluídos corporais de pacientes vítimas do envenenamento (BARRAVIERA et al., 1996).

Considerado o único tratamento existente para o acidente ofídico (WHO, 2010), o soro antiofídico por ser produzido em cavalos, pode levar a reações indesejadas ao paciente (BARRAVIERA; PERAÇOLI, 1994), que podem ocorrer entre 10 a 180 minutos após a infusão do soro, são ditas as reações imediatas, as que ocorrem nas primeiras 24 horas, são as reações precoces e as que ocorrem entre 5 e 14 dias após a soroterapia, são as chamadas reações tardias ou doença do soro (CUPO et al., 1991).

As 22 peçonhas ofídicas e suas frações foram incubadas com o soro anticrotálico do Instituto Butantan, como descrito no item 3.8, para avaliar, através do método de ELISA, se o soro era capaz de reconhecer todas as peçonhas e todos os componentes presentes nas peçonhas.

O soro utilizado para o presente trabalho foi produzido pelo Instituto Butantan, o qual conta com, aproximadamente, 800 cavalos, localizados na Fazenda São Joaquim, no município de Araçariguama, no estado de São Paulo. Para ter garantia do bem estar dos animais e boa qualidade do produto, os animais são submetidos a rigoroso acompanhamento médico-veterinário e o plasma equino já coletado tem que passar por rigoroso controle de qualidade, desde a fase de purificação de imunoglobulinas, até a liberação dos lotes produzidos, desta forma, todo o processo para a produção de soro ocorre em sistema fechado, semi-automatizado, capaz de produzir até um milhão de ampolas por ano. A produção deste antídoto para o envenenamento ofídico é a única no mundo validada como experimentalmente segura na eliminação de vários tipos de vírus no decorrer do fracionamento do plasma, de forma que, o soro produzido seja livre de vírus (BUTANTAN, 2016).

A partir dos resultados apresentados, pode ser afirmado que o soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan foi capaz de reconhecer nitidamente todas as 22 peçonhas. Entretanto, em relação às frações eluídas do processo cromatográfico, esse soro não foi capaz de reconhecer com alta eficiência as frações 0, 35, 36 e 37 (Fig. 19). Isso pode ter acontecido pelo fato das proteínas presentes nessas frações (Tab. 8) não serem tão imunogênicas ou não terem sido inoculadas nos cavalos utilizados para a produção deste lote de soro. Isso é possível caso estas proteínas não estivessem presentes nas peçonhas crotálicas utilizadas na hiperimunização dos cavalos. Deve-se considerar também que elas estão presentes em baixas proporções nesta peçonha.

Nesse estudo o soro anticrotálico do Instituto Butantan foi capaz de reconhecer as frações de 1 a 4, nas quais foram identificadas a crotamina. Esse resultado se opõe aos dados obtidos dos estudos de antivenômica publicados por Boldrini-França e colaboradores (2010), em que a crotamina não foi reconhecida pelo soro anticrotálico do Instituto Butantan. Assim, após o ano de 2010, pode ser que o Instituto Butantan tenha melhorado a qualidade do soro produzido, de forma que, o *pool* peçonhas de serpentes escolhido para a imunização dos cavalos apresente crotamina em sua peçonha. Portanto, provavelmente quase todos os componentes da peçonha crotálica foram inoculados nos cavalos e o soro do lote utilizado no presente estudo apresentava imunoglobulinas capazes de se ligar à crotamina.

A

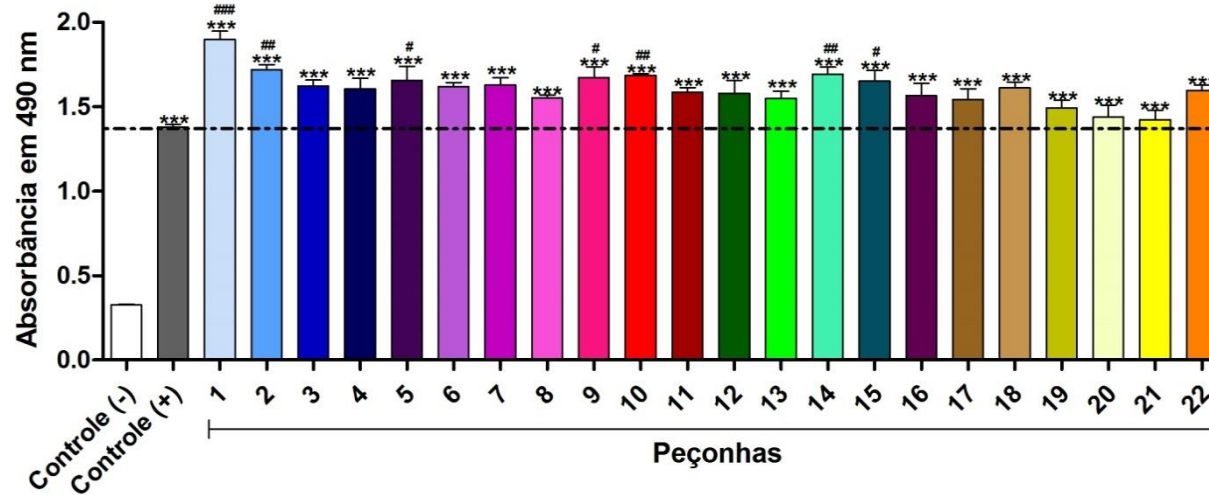
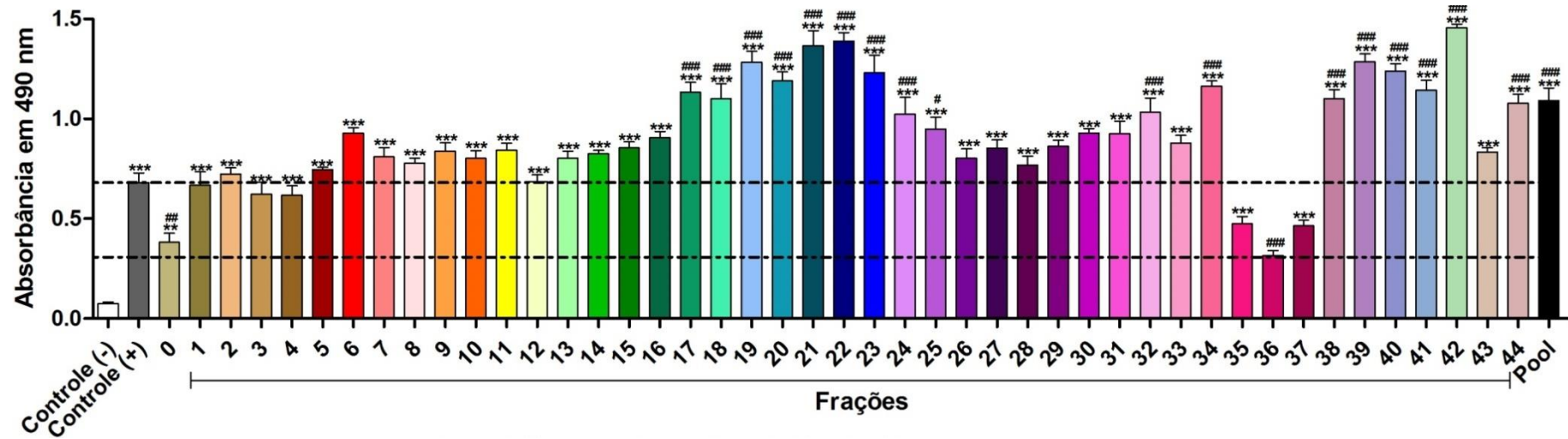


Figura 19. Análise do reconhecimento das peçonhas e das frações eluídas pelo soro anticrotálico comercial através do método de ELISA. As 22 peçonhas foram incubadas com soro anticrotálico comercial, a fim de avaliar a capacidade do soro em reconhecer as peçonhas, e anticorpos policlonais anti-cavalo marcados com peroxidase, para realização do método de ELISA, tendo como controle positivo (+) poços sensibilizados com imunoglobulina heteróloga contra peçonha de *Crotalus* e como controle negativo (-), poços não sensibilizados. (A) Peçonhas; (B) Frações; * $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo (-); ** $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo (-); *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo (-); # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo (+); ## $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo (+); ### $p < 0,0001$ quando comparado ao controle positivo (+).

B



4.3. Determinação da atividade enzimática de hialuronidase nas peçonhas de *C. d. collilineatus*

Boldrini-França e colaboradores (2007) afirmaram que, dentre as peçonhas botrópicas e crotálicas, a peçonha de *C. d. collilineatus* possui maior atividade enzimática de hialuronidase. Essa enzima possui aproximadamente 70 kDa e é expressa na peçonha desta subespécie em quantidades muito pequenas, em torno de 0,21% (CASTANHEIRA; BRANDEBURGO, 2008). Na peçonha de *C. d. terrificus* a porcentagem de recuperação desta proteína foi 0,23% (BORDON et al., 2012), enquanto na peçonha laquética, este valor chega a ser ainda menor, sendo 800 vezes menor que o valor encontrado da peçonha de *C. d. terrificus* (WIEZEL et al., 2015).

Devido a sua baixa expressão nas peçonhas em comparação aos outros componentes (FOX, 2013), essa proteína tem poucos estudos até o momento. Técnicas de biologia molecular podem permitir que estudos de toxinas animais pouco expressas sejam realizados, visto que a toxina pode ser produzida por expressão heteróloga através da tecnologia do DNA recombinante (AMORIM, 2015).

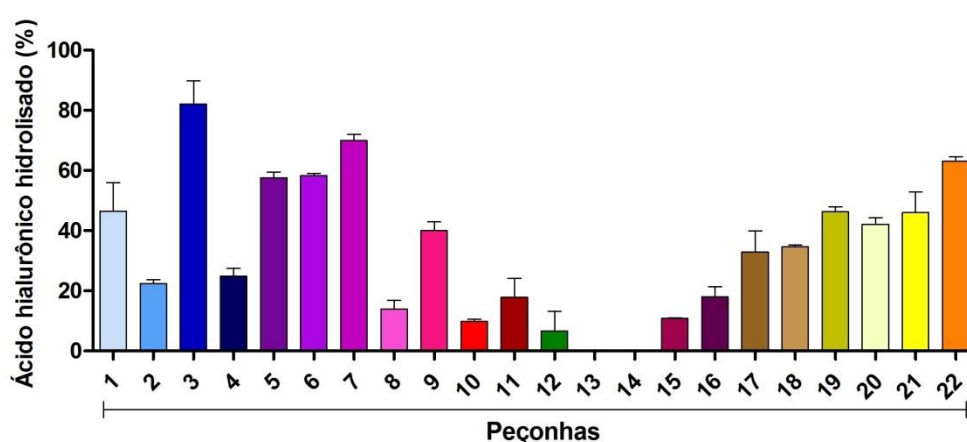
Os resultados do estudo proteômico obtidos neste trabalho identificaram a hialuronidase nas frações 38, 39, 40, 41 e 42 (Tab. 8), que estão presentes em quase todas as peçonhas. No entanto, a peçonha 2 não apresenta as frações 38 e 41, a peçonha 5 não apresenta a fração 41 e a peçonha 10 não apresenta as frações 38, 39 e 40 (Tab. 6). Adicionalmente, a partir do ensaio enzimático para determinação da atividade da enzima, verificou-se que algumas peçonhas apresentam atividade hialuronidásica, enquanto que em outras não foi detectada atividade enzimática. Isso foi observado para as peçonhas 13 e 14. A não detecção de atividade hialuronidásica pode ser explicada pela baixa quantidade da enzima expressa pela glândula (menor que a capacidade de detecção do ensaio) ou pela ausência da mesma na peçonha (Fig. 20).

Embora algumas peçonhas não tenham apresentado tal atividade enzimática, ou apresentem de forma muito baixa, algumas peçonhas apresentam uma atividade muito maior, considerando que todo o ensaio foi realizado com a mesma quantidade de peçonha, no caso 5 µg. Como exemplo pode-se citar a peçonha 3, que foi capaz de hidrolisar aproximadamente 80% de ácido hialurônico e as peçonhas 5, 6, 7 e 22 foram capazes de hidrolisar mais que 50% do ácido hialurônico utilizado. Essas peçonhas podem causar envenenamentos mais severos, tendo em vista que a hialuronidase é capaz de degradar o ácido hialurônico, o maior

glicosaminoglicano da matriz extracelular (KREIL, 1995), sendo assim capazes de acelerar a difusão e absorção da peçonha (PUKRITTAYAKAMEE et al., 1988).

Quando a quantidade de peçonha utilizada no ensaio foi reduzida pela metade, verifica-se que não foi possível detectar a hidrólise do ácido hialurônico, como é caso das peçonhas 4, 10, 11, 12 e 15. Desta forma, pode ser que estas peçonhas apresentem quantidades, realmente, muito baixas de hialuronidase. Assim, com essa quantidade de amostra, o ensaio não foi capaz de evidenciar a presença de tal enzima.

A



B

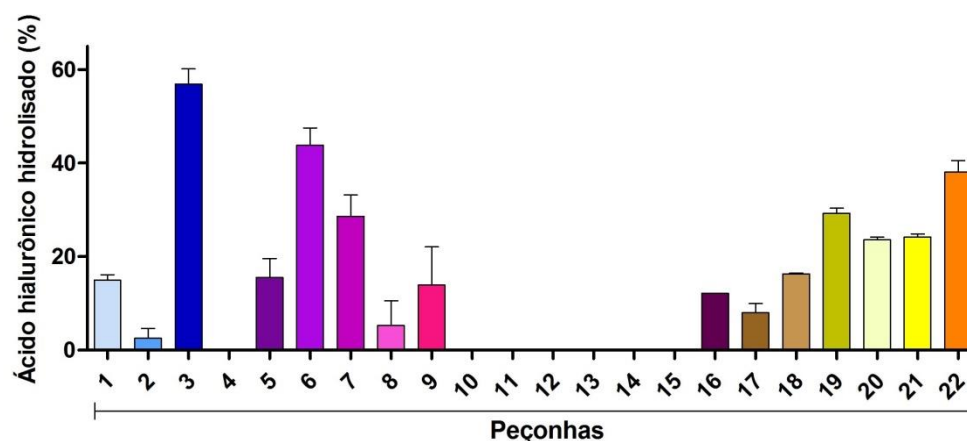


Figura 20. Determinação da atividade hialuronidásica nas peçonhas de *C. d. collilineatus*. As 22 peçonhas de *C. d. collilineatus* foram incubadas a 37 °C por 45 minutos com o ácido hialurônico (0,5 mg/mL). A reação foi interrompida com a adição brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) 2,5% (m/V) em hidróxido de sódio (NaOH) 2% (m/V). A leitura da placa foi realizada em até 10 minutos após o fim da reação em de leitor de ELISA, sob comprimento de onda de 400 nm. (A) 5 µg de peçonha; (B) 2,5 µg de peçonha.

4.4. Ensaios *in vivo*

Como as 22 peçonhas utilizadas apresentaram diferenças intraespecíficas evidentes no presente estudo, foi sugerido a avaliação das diferenças bioquímicas e imunológicas que as peçonhas poderiam causar durante o acidente ofídico. Assim, para esta avaliação, as 5 peçonhas que mostraram diferenças mais relevantes em relação a coloração (Fig. 3), perfis eletroforéticos (Fig. 4) e cromatográficos foram utilizadas para simular o acidente crotálico em camundongos machos Balb/c, como descrito no item 3.10.3. O *pool* de peçonhas também foi avaliado, pois este possui todos os componentes das 22 peçonhas.

As peçonhas escolhidas para este ensaio foram:

- Peçonha 3 – única peçonha que apresenta as frações 1, 2 e 3, que contém a toxina crotamina (Fig. 8 e Tab. 8) e que apresentou a maior porcentagem de atividade da enzima hialuronidase (Fig. 20);
- Peçonha 10 – apresenta, entre as peçonhas, grande quantidade de fração 25 (1,36%), no caso, serinoprotease, e de fração 41 (1,32%), sendo composta por fosfodiesterase, 5'-nucleotidase, convulxina, hialuronidase, serinoprotease, metaloprotease, LAAO e glutathiona peroxidase (Fig. 11 e Tabs. 6 e 8);
- Peçonha 12 – apresenta uma banda eletroforética entre 20 kDa e 14 kDa (Fig. 4) e as frações de 35, 36 e 37 mais evidentes (Fig. 12), que apresentam as toxinas convulxina, serinoprotease, 5'-nucleotidase, metaloprotease, glutathiona peroxidase, carboxipeptidase, LAAO, fosfolipase A₂ e fosfodiesterase (Tab. 8);
- Peçonha 16 – apresenta maiores quantidades das frações entre 10 a 16, no caso, a crotóxina A (Fig. 14 e Tabs. 6 e 8);
- Peçonha 21 – apresenta a cor muito amarela (Fig. 3) e, em relação as outras peçonhas, esta apresenta uma banda eletroforética entre 45 kDa e 66 kDa, diferente das demais peçonhas (Fig. 4), além de apresentar a maior quantidade da fração 38 (0,84%), que contém as toxinas serinoprotease, convulxina, LAAO, fosfodiesterase, glutathiona peroxidase, fosfolipase A₂, hialuronidase, carboxipeptidase, 5'-nucleotidase e metaloprotease (Tabs. 6 e 8).

Além da escolha das peçonhas, para este ensaio determinou-se o local da injeção, que foi uma das patas traseiras dos animais, pois na maioria dos acidentes ofídicos, a picada ocorre nos membros inferiores (BOCHNER; STRUCHINER, 2003), de forma intramuscular.

4.4.1. Padronização da dose

Para a realização deste ensaio, era necessário saber qual dose seria ideal para que não houvesse morte dos animais, mas que eles apresentassem os sinais clínicos mais frequentes no envenenamento crotálico, como edema, prostração, sudorese, sonolência, inquietação e ptose palpebral unilateral ou bilateral (PINHO; PEREIRA, 2001), como descrito em 3.10.2.

Para a peçonha de *C. d. collilineatus*, a literatura aponta que a dose letal média (DL₅₀) é de 0,0866 µg/g de animal, quando a peçonha é injetada intraperitonealmente (SANTORO et al., 1999). Baseado nesses dados, foi definido que as doses de 0,01, 0,02 e 0,04 µg/g de animal seriam testadas (doses 8,66, 4,33 e 2,165 vezes menores que a DL₅₀, respectivamente) e as peçonhas seriam injetadas intramuscularmente, ao invés de intraperitonealmente, pois esta última apresenta uma rápida absorção, tendo em vista que a área de absorção é grande (VASQUEZ et al., 2009). Desta forma, as doses de escolha não eram letais aos animais.

A simulação do envenenamento foi realizada com o *pool* de peçonhas, pois este contém todos os componentes das 22 peçonhas, e 9 horas após a inoculação da peçonha, somente os animais que receberam a maior dose, ou seja, 0,04 µg/g de animal, apresentaram paralisia das patas traseiras. Desta forma, a dose 0,04 µg/g de animal foi selecionada para a realização das análises bioquímicas e imunológicas deste estudo.

4.4.2. Análise bioquímica laboratorial do envenenamento crotálico

Durante o processo do envenenamento crotálico, os componentes da peçonha podem causar lesões no fígado e nos rins (AMORA, 2005). Assim, os componentes enzimáticos podem aumentar ou diminuir sua liberação no plasma, indicando processos patológicos (MOTTA, 2000).

No presente estudo, foram avaliadas as diferenças bioquímicas laboratoriais que as peçonhas mais distintas poderiam causar, como descrito em 3.10.4. A partir dos resultados obtidos, os níveis de ácido úrico, creatinina, glicose e uréia não apresentaram alterações significativas, em relação ao controle. Em relação a uréia, ácido úrico e creatinina, sabe-se que esses analitos apresentam elevado aumento na fase oligúrica da IRA, ou seja, de 6 a 24 horas após o acidente ofídico (LEIS; CHEBABO, N/A; PINHO; PEREIRA, 2001), desta forma, os animais foram eutanasiados antes que estes analitos sofressem grandes alterações.

Entretanto, os níveis séricos dos analitos, creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST, transaminase glutâmica-oxalacética, GOT), alanina aminotransferase

(ALT, transaminase glutâmica-pirúvica, GPT) e lactato desidrogenase (LDH) apresentaram-se significativamente aumentados em relação ao controle (Fig. 21).

O aumento significativo dessas proteínas corroboram com achados laboratoriais de estudos anteriores, o que pode sugerir um quadro de miotoxicidade (FERNANDES; AGUIAR; DAHER, 2008; LOPES et al., 2012; SANTOS et al., 2013), pois o aumento destas enzimas está relacionado a lesões da musculatura esquelética.

Interessantemente, os valores de CK dos animais injetados com a peçonha 3, quando comparados ao controle, foram mais elevados, seguido do *pool* de peçonhas, peçonhas 10 e 16. Este resultado pode ser devido à presença da proteína crotamina na peçonha 3, seguido do *pool* de peçonhas, enquanto nas outras peçonhas testadas, esta toxina não é encontrada. A proteína crotamina, como já dito anteriormente, juntamente à crotoxina, causa a miotoxicidade observada no envenenamento crotálico, com consequente aumento dos níveis de CK (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003; TOKARNIA et al., 2014). Estes resultados indicam que a miotoxicidade produzida pela peçonha 3, seguida do *pool* de peçonhas, deve ser muito mais severa do que a miotoxicidade produzida pelas outras peçonhas testadas.

Curiosamente, todos os resultados laboratoriais significativos da peçonha 12, CK, LDH, AST e ALT, foram inferiores aos encontrados nas outras peçonhas. Este fato pode estar relacionado à ausência da fração 21 na peçonha 12 (Tab. 6), fração que apresenta a crotoxina B, de forma que a miotoxicidade foi menos agressiva, quando comparada às outras peçonhas.

Estes resultados mostram que as variações intraespecíficas causam diferenças quanto ao quadro clínico do envenenamento crotálico.

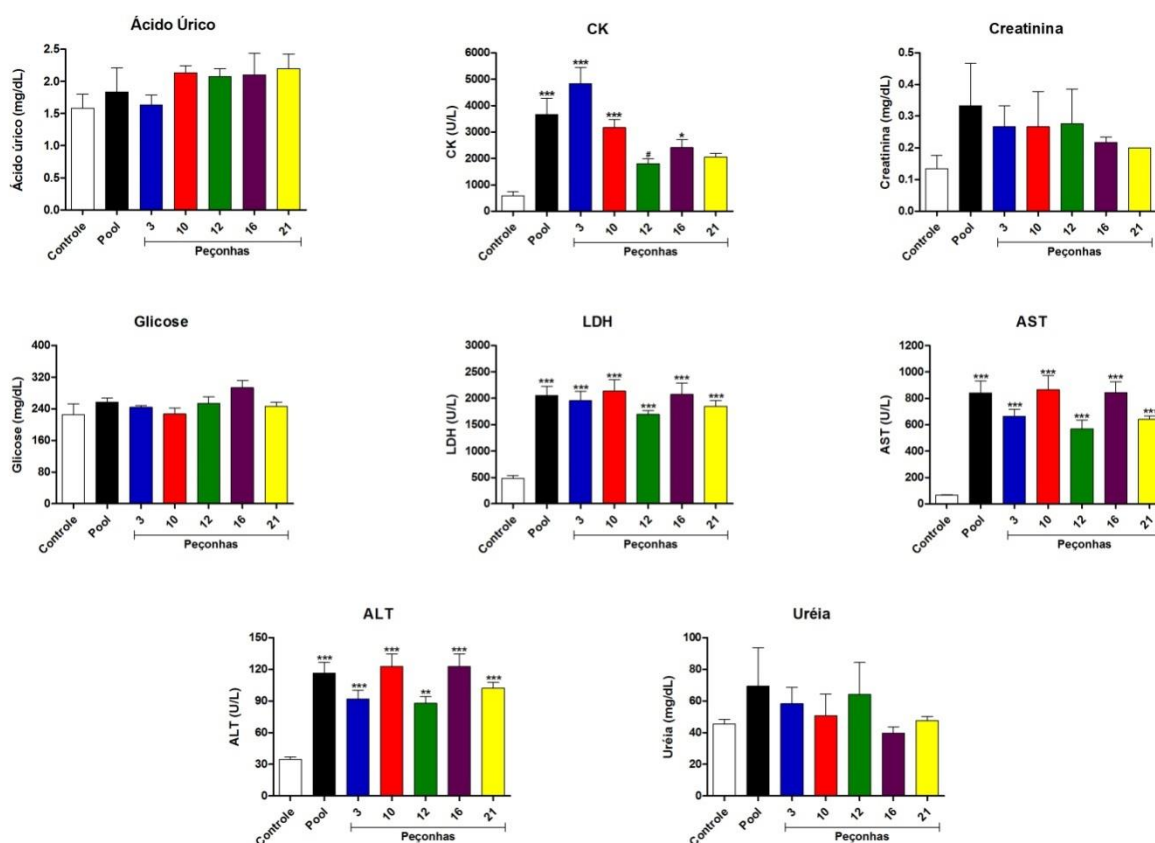


Figura 21. Avaliação bioquímica laboratorial do envenenamento crotálico. A análise bioquímica foi realizada por quimioluminescência, em até 24 horas após o experimento, utilizando o analisador bioquímico CT600i (Wiener Laboratórios) e os kits: URICOSTAT enzimático AA, CK- NAC UV AA líquida, CREATININA Cinética AA líquida, GLICEMIA Enzimática AA líquida, LDH-P UV AA líquida, GOT (AST) UV AA líquida, GPT (ALT) UV AA líquida e UREIA UV Cinética AA (Wiener Laboratórios, Rosário, Argentina). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$). Como controle, foi inoculada apenas solução salina nos animais. ; $p < 0,05$ quando comparado ao controle; $*p < 0,01$ quando comparado ao controle; $***p < 0,0001$ quando comparado ao controle; $#p < 0,05$ quando comparado ao *pool* de peçonhas; $##p < 0,01$ quando comparado ao *pool* de peçonhas; $###p < 0,0001$ quando comparado ao *pool* de peçonhas.

4.4.3. Avaliação de citocinas e óxido nítrico no envenenamento crotálico

As peçonhas ofídicas são conhecidas, também, por induzir o processo inflamatório, levando a produção de citocinas e causando morte celular (RIBEIRO et al., 2014).

Citocinas são mediadores proteicos ou polipeptídeos que, durante o processo inflamatório, são sintetizados e liberados por células do sistema imunológico, sendo capazes de regular a resposta inflamatória. As citocinas podem ser divididas em interleucinas, interferonas, quimiocinas e fatores estimuladores de colônia (RANG et al., 2011).

Esses mediadores podem levar a alterações na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular imunológica, podendo influenciar na produção e atividade de outras citocinas, aumentando, tendo uma resposta pró-inflamatória ou Th1, ou diminuindo,

caracterizando a resposta anti-inflamatória ou Th2 (OLIVEIRA et al., 2011). As citocinas que regulam a resposta Th1 são IL – 1, IL – 2, IL – 6, IL – 7 e TNF, enquanto as citocinas da resposta Th2 são IL – 4, IL – 5, IL – 10 e IL – 13 (MOSMANN; COFFMAN, 1989; CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; SOMMER; WHITE, 2010).

No presente estudo foi avaliado o perfil de citocinas de animais envenenados, como descrito em 3.10.5. As citocinas IL - 1 β , IL - 2, IL - 4, IL - 10, IL - 13, IL - 17a, TNF – α e IFN – γ dos animais envenenados não apresentaram alterações significativas em relação aos animais controle (Fig. 22).

Estudos anteriores mostram que os níveis de TNF – α e IFN – γ eram muito altos em camundongos Balb/c envenenados com peçonha de *C. d. terrificus*, mas estes valores diminuíram após duas horas da inoculação da peçonha. O mesmo aconteceu com as citocinas IL – 4 e IL – 10, porém os valores diminuíram após 4 horas da inoculação (HERNANDEZ CRUZ et al., 2008). No presente estudo, pode ser que os níveis de citocinas tenham diminuído, tendo em vista que os animais foram eutanasiados 6 horas após a inoculação da peçonha. Entretanto, estes resultados corroboram com estudos anteriores, que mostraram que a peçonha de *C. d. collilineatus* não foi capaz de induzir a produção de IL – 2, IL – 4 e IFN – γ *in vitro* (RIBEIRO et al., 2014).

Em relação a citocina IL – 6, os animais injetados com o *pool* das peçonhas e as peçonhas 3 e 10 mostraram diferenças significativamente maiores em relação ao controle. Por outro lado, os animais injetados com a peçonha 12 apresentaram níveis significativamente menores desta citocina quando comparados aos animais injetados com o *pool* de peçonhas. Este resultado pode estar relacionado à crotovina, já que em estudos anteriores, esta toxina demonstrou elevar os níveis séricos desta interleucina (CARDOSO et al., 2001). Esta citocina faz parte da resposta Th1, podendo ser induzida por IL – 1 e TNF – α , sendo capaz de promover a maturação de macrófagos e neutrófilos, sendo este último também ativado, levam a diferenciação e manutenção de linfócitos T citotóxicos e células *natural killer*. Após o processo de lesão, o pico plasmático dessa citocina ocorre em até 6 horas (OLIVEIRA et al., 2011). Dessa forma, no presente estudo, a concentração plasmática aumentada desta citocina ainda pode ser detectada.

Já a citocina IL – 5 apresentou diferença significativa em relação ao controle somente nos animais injetados com a peçonha 16. Os valores obtidos foram menores que o controle. Esta interleucina faz parte da resposta Th2 (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Assim, aparentemente, a resposta Th1 estava desencadeada, de forma que a resposta Th2 ainda não havia sido iniciada.

E por último, os níveis séricos de IL - 12p70 dos animais injetados com as peçonhas 16 e 21 foram significativamente menores que o controle. Até o momento, não existem estudos relacionando a peçonha crotálica com esta interleucina. Porém, existem estudos mostrando que a peçonha botrópica é capaz de aumentar os níveis séricos dessa interleucina em 4 horas após a inoculação da peçonha (MOREIRA et al., 2012). Quanto à IL-12, foi demonstrado que a crotoxina poderia diminuir seus níveis séricos (RICARDI, 2010).

A partir desses resultados, observa-se que a resposta Th1 foi desencadeada após a inoculação das peçonhas e pode-se inferir que as peçonhas crotálicas podem modular a resposta imune, sendo que esta também pode variar de acordo com a variabilidade dos componentes ofídicos.

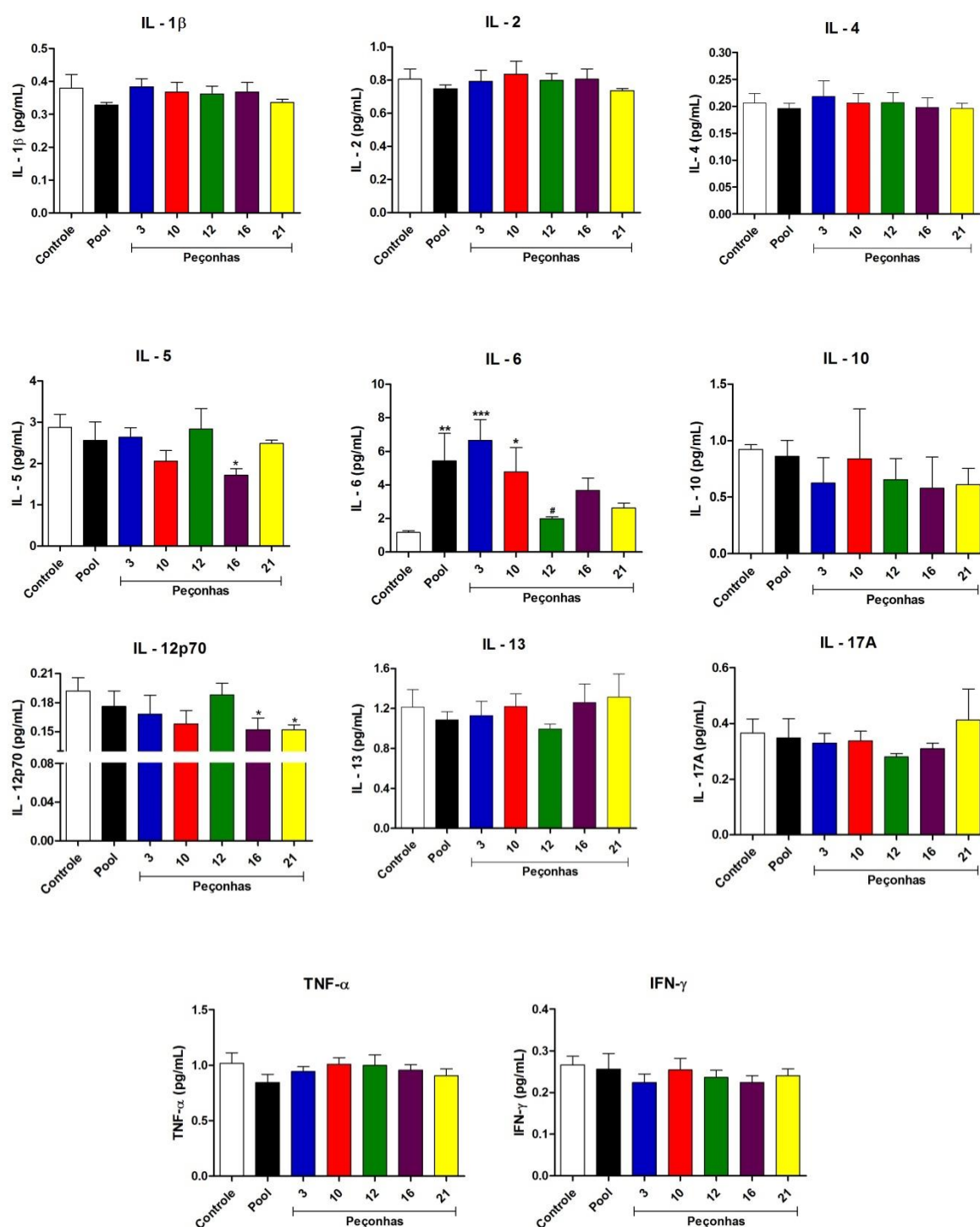


Figura 22. Avaliação de citocinas no envenenamento crotálico. As análises imunológicas foram realizadas utilizando leitor automático de microplacas MAGPIX® Luminex®, seguindo instruções do fabricante, e os kits com microesferas magnéticas conjugadas com anticorpos específicos para cada citocina. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Fisher's LSD ($p < 0,05$). Como controle, foi inoculada apenas solução salina nos animais. ; * $p < 0,05$ quando comparado ao controle; ** $p < 0,01$ quando comparado ao controle; *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle; # $p < 0,05$ quando comparado ao pool de peçonhas; ## $p < 0,01$ quando comparado ao pool de peçonhas; ### $p < 0,0001$ quando comparado ao pool de peçonhas.

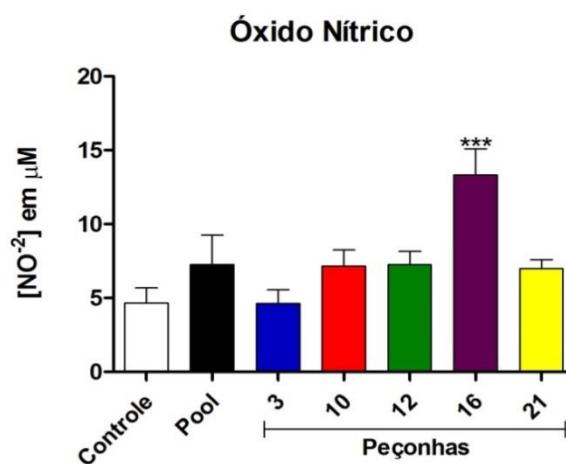
Já foi comprovado que as peçonhas crotálicas são capazes de inibir a difusão e a fagocitose realizada por macrófagos, isto se dá por ação da crotoxina (SAMPAIO et al., 2003), bem como, induzem a produção de óxido nítrico (NO) e H_2O_2 , estimulando o metabolismo de glutamina e glicose e a atividade antimicrobiana, ambas as ações realizadas por essas células (SAMPAIO et al., 2001).

O óxido nítrico é uma molécula incolor, gasosa e inorgânica, que possui um elétron desemparelhado, sendo considerado um radical livre (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Este composto é considerado um relaxador de vasos sanguíneos, além de realizar outras funções, tais como prevenção da agregação plaquetária, regula a pressão sanguínea, inibe a adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Esse mediador é decomposto em nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), em sistema biológico (HERNANDEZ CRUZ et al., 2008), assim, a dosagem desses compostos podem indicar, indiretamente, a concentração de óxido nítrico presente no organismo (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Em relação a dosagem deste fator no presente estudo, apenas animais injetados com a peçonha 16 apresentaram valores de nitrito significativamente maiores que o controle. Não foram evidenciados aumentos significativos de NO em animais injetados com as outras peçonhas (Fig. 23).

Costa e colaboradores (2013) verificaram que a crotoxina foi capaz de aumentar os níveis de NO *in vitro*. No presente estudo, a análise proteômica mostrou que a peçonha 16 apresentou maiores quantidades das frações entre 10 a 16 (34,05%), no caso, a crotoxina A (Fig. 13 e Tabs. 6 e 8). Esta pode ser a explicação para níveis tão aumentados de NO no soro dos animais inoculados com a peçonha 16.

Figura 23. Avaliação de óxido nítrico no envenenamento crotálico. A dosagem de óxido nítrico foi realizada através do método de Griess, determinando a concentração de nitrito por curva padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$) e realizando leitura de absorbância em 540 nm. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$). Como controle, foi inoculada apenas solução salina nos animais; *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle.



As peçonhas de serpentes são compostas por diferentes componentes que agem imobilizando, matando e digerindo presas (FRY et al., 2006). Esses componentes podem sofrer variações entre suas composições e potencialidade, dependendo da família, gênero e espécie de serpente (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; KOPPER et al., 2015). A variabilidade destas peçonhas está relacionada com a complexidade da sintomatologia do envenenamento, despertando o interesse de herpetologistas e toxinologistas (GAO et al., 2014). Tendo em vista que esta variabilidade pode ocorrer entre serpentes de mesma família, gênero, espécie e subespécie (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991), o estudo de variações individuais é essencial para assegurar a eficácia do soro antiofídico e para o tratamento do envenenamento (SAVIOLA et al., 2015).

5. Conclusões

O acidente ofídico é uma das doenças ocupacionais negligenciadas em todo o mundo, em especial no Brasil, onde existe a ocorrência de, aproximadamente, 30 mil casos de envenenamento por ano. Sendo assim, estudos relacionados aos acidentes ofídicos tem se tornado muito relevantes, em relação a melhoria do tratamento e profilaxia destes acidentes, bem como, em relação a busca de novas ferramentas biotecnológicas a partir das peçonhas de serpentes.

O presente estudo fez uso de técnicas ômicas para a identificação de proteínas presentes nas peçonhas de 22 serpentes da subespécie *Crotalus durissus collilineatus*, de forma que o proteoma desses indivíduos foi elucidado, evidenciando proteínas pela primeira vez na peçonha desta subespécie.

Os resultados demonstraram que existem variações intraespecíficas entre os 22 indivíduos desta subespécie, sendo que estas variações são qualitativas, mostrando que apenas dois desses indivíduos apresentaram a proteína crotamina, e quantitativas, as quais mostram que todos os componentes da peçonha variam entre os indivíduos. Estas diferenças podem levar a alterações quanto à toxicidade das peçonhas dessas serpentes, interferindo no tratamento do acidente ofídico.

A toxina hialuronidase, além de apresentar sequências peptídicas que não estão depositadas no banco de dados UniProtKB, também mostrou que diferentes peçonhas podem conter diferenças quantitativas importantes desta enzima. Desta forma, a toxicidade pode também ser diferente.

Apesar de todas as diferenças intraespecíficas, as imunorreatividades do soro anticrotálico do Instituto Butantan com as peçonhas desses 22 indivíduos foram semelhantes, mostrando que o soro produzido por esta instituição é adequado para o tratamento do envenenamento crotálico, pois foi capaz de reconhecer todas as peçonhas. Porém não foi capaz de reconhecer com tanta eficiência todos os componentes das peçonhas.

As análises do soro de animais envenenados por peçonhas de diferentes indivíduos de *C. d. collilineatus* mostraram que estas peçonhas podem produzir diversos efeitos imunológicos e bioquímicos nas vítimas, dependendo da variabilidade dos seus componentes, o que pode interferir na sintomatologia deste tipo de envenenamento.

6. Referências

6. REFERÊNCIAS¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Citocinas. In: ELSEVIER (Ed.). **Imunologia celular e molecular**. 5 ed., 2005.

AL-ABDULLA, I. et al. Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 399 - 404, 2003.

ALAPE-GIRÓN, A. et al. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **J Proteome Res**, v. 7, n. 8, p. 3556 - 3571, 2008.

ALEXANDER, G. et al. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953 - 960, 1988.

ALMEIDA, C. D. et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1 - 19, 2015.

AMARALL, A. **Ofionímia ameríndia na ofiologia brasileira**. 1973.

AMORA, D. N. **Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus***. 2005. 100p (Mestrado). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

AMORA, D. N. et al. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 260 - 264, 2006.

AMORIM, F. G. **Clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase e/ou novas toxinas obtidas a partir do transcriptoma da glândula da peçonha de *Tityus serrulatus***. 2015. 112p (Doutorado). Universidade de São Paulo.

ANDE, S. R. et al. Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Yeast**, v. 25, n. 5, p. 349 - 357, 2008.

ANDRIANI, E. P. **Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas**. 1995. 111p Universidade de São Paulo.

¹As referências utilizadas para a produção do presente trabalho estão citadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 512 - 519, 2012.

AUTO, H. J. F. **Animais peçonhentos**. Maceió: EdUFAL: 1999.

AZEVEDO-MARQUES, M.; HERING, S.; CUPO, P. Acidente crotálico. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, São Paulo, p. 91 - 98, 2003.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 36, n. 2/4, p. 480 - 489, 2003.

BACILA, M. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. Acta Physiologica Latinoamericana, 1961, ASSN LATINOAMER CIENC FISIOL SERRANO 665, 1414, Buenos Aires, Argentina. p. 224.

BAJWA, S. S. et al. Thrombin-like and fibrinolytic enzymes in the venoms from the Gaboon viper (*Bitis gabonica*), eastern cottonmouth moccasin (*Agkistrodon p. piscivorus*) and southern copperhead (*Agkistrodon c. contortrix*) snakes. **Toxicon**, v. 20, n. 2, p. 427 - 432, 1982.

BAKKEN, G. S.; KROCHMAL, A. R. The imaging properties and sensitivity of the facial pits of pitvipers as determined by optical and heat-transfer analysis. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 16, p. 2801 - 2810, 2007.

BALDO, E. C. F. et al. Toad Poison and Drug Discovery. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. (Ed.). **Toxins and Drug Discovery**: Springer Netherlands, 2015. p.1 - 22. (Toxinology). ISBN 978-94-007-6726-3.

BARBOSA, C. F. et al. Determination of the neutralizing potency of horse antivenom against bothropic and crotalic venoms by indirect enzyme immunoassay. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]**, v. 28, n. 10, p. 1077 - 1080, 1995.

BARRABIN, H. et al. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxins: Animals, Plant and Microbial**. New York: Pergamon, p. 113 - 114, 1978.

BARRAVIERA, B.; PERAÇOLI, M. T. S. Soroterapia heteróloga. In: BARRAVIERA, B. (Ed.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas Ltda, 1994.

BARRAVIERA, B. et al. Use of an ELISA assay to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM human antibody levels in serum and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 2, n. 1, p. 14 - 27, 1996.

BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 12, n. 8, p. 553 - 571, 2009.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 5, p. 1424 - 1437, 1996.

BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Rev. bras. Saúde ocup**, v. 12, p. 82 - 96, 1984.

BERNARDE, P. S. **Acidentes fídicos** 2009.

BERNARDE, P. S. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil. 2014.

BIN, A. M. H. et al. 5'-nucleotidases of *Naja naja karachiensis* snake venom: their determination, toxicities and remedial approach by natural inhibitors (medicinal plants). **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 73, n. 3, 2016.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7 - 16, 2003.

BOLAÑOS, R. **Antivenenos. Manual de Procedimientos. Producción y Pruebas de Control en la Preparación de Antisueros Diftérico, Tetánico, Botulínico, Antivenenos y de la Gangrena Gaseosa.** SALUD, O. P. D. L. Washington, DC: 104 - 141 p. 1977.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. **Characterization of Hyaluronidase Activity from Several Viperidae Snake Venoms and Partial Isolation of Hyaluronidase from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom.** XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Salvador, 2007.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, n. 5, p. 586 - 595, 2009.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **J Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758 - 1776, 2010.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9971 - 9986, 2015.

BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta physiologica et pharmacologica latinoamericana: organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y de la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia**, v. 39, n. 4, p. 439 - 448, 1988.

BORDON, K. C. F. et al. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2740 - 2748, 2012.

BORDON, K. C. F. et al. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, n. 1, p. 1, 2015.

BRAZIL, V. **A defesa contra o ophidismo**. Pocaí & Weiss, 1911.

BREGGE-SILVA, C. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1263 - 1276, 2012.

BULLOCK, T. H.; COWLES, R. B. Physiology of an infrared receptor: the facial pit of pit vipers. **Science**, v. 115, n. 2994, p. 541 - 543, 1952.

BUTANTAN, Instituto. Soros. 2016. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/producao/soros/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 7 de setembro.

CALDWELL, M. W. et al. The oldest known snakes from the Middle Jurassic-Lower Cretaceous provide insights on snake evolution. **Nature communications**, v. 6, 2015.

CALVETE, J. J. Brief history and molecular determinants of snake venom disintegrin evolution. In: (Ed.). **Toxins and hemostasis**: Springer, 2010. p. 285 - 300. ISBN 9048192943.

CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Rev Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 739 - 758, 2011.

CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, v. 62, p. 40 - 49, 2013a.

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

CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063 - 1074, 2005.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**, v. 42, n. 11, p. 1405-14, 2007.

CALVETE, J. J. et al. Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. **J Proteome Res**, v. 8, n. 6, p. 3055 - 3067, 2009a.

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS Lett**, v. 583, n. 11, p. 1736 - 1743, 2009b.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **J Proteome Res**, v. 9, n. 1, p. 528 - 544, 2009c.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics and disintegrins: portrait and evolution of a family of snake venom integrin antagonists. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**, p. 337 - 357, 2009d.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest neartic rattlesnake venom. Evolutionary clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms. **J Proteome Res**, v. 11, n. 2, p. 1382 - 1390, 2012.

CAMILLO, M. **Contribuição ao estudo das gioxinas (enzimas semelhantes à trombina) dos venenos das serpentes brasileiras *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus*** 75f. 1998. 75p (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America. 1989.

CANTÚ, M. D. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 669 - 675, 2008.

CAPRONI, P. **Ação da Bothropstoxina-1 e do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiados sobre o sistema imune**. 2009. 60 (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.

CARDOSO, D. F. et al. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators Inflamm**, v. 10, n. 3, p. 125 - 133, 2001.

CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H. Introdução ao ofidismo. In: (Ed.). **Animais peçonhentos do Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, 2003. cap. 1, p.3 - 6.

CARNIELLI, C. M. **Análise proteômica diferencial de proteínas superficiais da membrana de *Xanthomonas spp.* em interação com hospedeiro cítrico**. 2013. 91p (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos.

CARRASCO, P. A. et al. Nomenclatural instability in the venomous snakes of the *Bothrops* complex: Implications in toxinology and public health. **Toxicon**, v. 119, p. 122 - 128, 2016.

CASTANHEIRA, L. E.; BRANDEBURGO, M. I. H. Purificação e caracterização enzimática e biológica parciais da hialuronidase presente na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*. **Horizonte Científico**, v. 2, n. 2, 2008.

CERNI, F. A. **Novo método de fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e caracterização eletrofisiológica das toxinas Ts6 e Ts7**. 2012. (Mestrado). Universidade de São Paulo.

CHAN, Y. S. et al. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1 - 17, 2016.

CHANG, C. C.; SU, M. J. A study on the interaction of crotopotin with crotoxin phospholipase A2, notexin and other presynaptic neurotoxins. **British journal of pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 495 - 503, 1981.

CHAPEAUROUGE, A. et al. Interrogating the venom of the viperid snake *Sistrurus catenatus edwardsii* by a combined approach of electrospray and MALDI mass spectrometry. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0092091, 2015.

CHEN, X. et al. Purification and Characterization of 5'-nucleotidase from *Trimeresurus albolabris* Venom. **Zoological Research**, v. 29, n. 4, p. 399 - 404, 2008.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279 - 1303, 1991.

CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, n. 1, p. 1, 2015.

- CHOUMET, V. et al. Snake venom phospholipase A2 neurotoxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 211, n. 1/2, p. 57 - 62, 1993.
- CLISSA, P. B. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de suas propriedades imonológicas**. 1997. 79p (Doutorado). Universidade de São Paulo.
- COSTA, E. S. et al. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon**, v. 74, p. 167 - 178, 2013.
- COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 4, n. 3, p. 75 - 93, 2015.
- CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & Disease**, v. 19, n. 1, p. 42, 2009.
- CUPO, P. Bites and stings from venomous animals: a neglected Brazilian tropical disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 639 - 641, 2015.
- CUPO, P. et al. Immediate hypersensitivity reactions following intravenous use of antivenom sera: predictive value of hypersensitivity skin test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 2, p. 115 - 122, 1991.
- CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 742 - 780, 1997.
- DA-SILVA-FREITAS, D.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; ARANTES, E. C. PEGylation: a successful approach to improve the biopharmaceutical potential of snake venom thrombin-like serine protease. **Protein and peptide letters**, v. 22, n. 12, p. 1133 - 1139, 2015.
- DA SILVA ARAÚJO, L. et al. *Crotalus durissus* venom: biological effects and relevant applications. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 10, n. 1, p. 9 - 21, 2016.
- DA SILVA, M. H.; BIER, O. G. Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by inhibition of phospholipase A2 activity. **Toxicon**, v. 20, n. 3, p. 563 - 569, 1982.
- DA SILVA, N. J.; AIRD, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 128, n. 3, p. 425 - 456, 2001.

DEORAS, P. J. Studies on Bombay snakes; snake farm yield records and their probable significance. In: (Ed.). **Venomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region**: Pergamon Press Oxford, 1963. p. 337.

DHANANJAYA, B. L.; D'SOUZA, C. J. M. An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 1, p. 1 - 6, 2010.

DI FERRANTE, N. Turbidimetric measurement of acid mucopoly-saccharides and hyaluronidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 220, n. 1, p. 303 - 306, 1956.

DIMITROV, G. D.; KANKONKAR, R. C. Fractionation of *Vipera russelli* venom by gel filtration-ii comparative study of yellow and white venoms of *Vipera russelli* with special reference to the local necrotizing and lethal actions. **Toxicon**, v. 5, n. 4, p. 283 - 288, 1968.

DOS SANTOS, M. C. et al. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 31, n. 11, p. 1459 - 1469, 1993.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659 - 665, 2002.

DURBAN, J. et al. Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 435 - 450, 2003.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **European Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 80 - 91, 1967.

EL-CHAMY-MALUF, S. et al. Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. **Peptides**, v. 78, p. 11 - 16, 2016.

FENWICK, A. M.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617 - 640, 2009.

FERNANDES, D. S.; FRANCO, F. L.; FERNANDES, R. Systematic revision of the genus *Lachesis* Daudin, 1803 (Serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, v. 60, n. 2, p. 245 - 260, 2004.

FERNANDES, T. A.; AGUIAR, C. N.; DAHER, E. F. Envenenamento crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 2, p. 1 - 10, 2008.

FERREIRA JÚNIOR, R. S. **Avaliação da resposta humoral e da capacidade de neutralização do soro de camundongos *Swiss* inoculados com venenos nativo e irradiado com cobalto-60 de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni***. 2003. 115p (Mestrado). Universidade Estadual Paulista.

FERREIRA, M. L. et al. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1603 - 1608, 1992.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583 - 2593, 1970.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75 - 82, 2013.

FOX, J. W. et al. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 700 - 714, 2006.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969 - 985, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200 - 209, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1217 - 1228, 1997.

FRY, B. G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **nature**, v. 439, n. 7076, p. 584 - 588, 2006.

FRY, B. G. et al. Evolution of an arsenal structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 215 - 246, 2008.

GALLO, M. A. History and scope of toxicology. In: (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7. New York: McGraw-Hill, 2008. cap. 1, p.3 - 11.

GAO, J. F. et al. Proteomic and biochemical analyses of short-tailed pit viper (*Gloydius brevicaudus*) venom: age-related variation and composition-activity correlation. **J Proteomics**, v. 105, p. 307 - 322, 2014.

GEORGIEVA, D. et al. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus* - Correlation with pharmacological activities. **Journal of Proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2302 - 2316, 2010.

GIRISH, K. S. et al. Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 240, n. 1 - 2, p. 105 - 110, 2002.

GONÇALVES-MACHADO, L. et al. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **J Proteomics**, v. 135, p. 73 - 89, 2016.

GONÇALVES, J. M.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. **An. Acad. Bras. Cienc**, v. 22, p. 141 - 150, 1950.

GRALÉN, N.; SVEDBERG, T. The molecular weight of crotoxin. **Biochemical Journal**, v. 32, n. 8, p. 1375 - 1377, 1938.

GRANDGEORGE, M. et al. Preparation of improved F (ab')₂ antivenoms. An example: new polyvalent anti-European vipers (equine). **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 148 - 148, 1996.

GREEN, L. C.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.

GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional Snakebite poisoning in Latin America and the Caribbean: An integral view from a regional perspective. **Boletín de Malariología Y Salud Ambiental**, v. 51, n. 1, p. 1 - 16, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 4, p. 1 - 19, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. **Biologicals**, v. 39, n. 3, p. 129 - 142, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223 - 1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; PEREAÑEZ, J. A. The need for an integrated approach in confronting snakebite envenoming in Latin America: the relevance of endogenous scientific and technological research. **Vitae**, v. 23, n. 2, p. 103 – 105, 2016.

HAKIM, M. A.; YANG, S.; LAI, R. Centipede venoms and their components: resources for potential therapeutic applications. **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 11, p. 4832 - 4851, 2015.

HAMMOUDA, M. B. et al. Lebein, a snake venom disintegrin, induces apoptosis in human melanoma cells. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 7, p. 1 - 14, 2016.

HART, M. L. et al. Direct treatment of mouse or human blood with soluble 5'-nucleotidase inhibits platelet aggregation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 8, p. 1477 - 1483, 2008.

HAWGOOD, B. J. Crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 21 - 22, 1990.

HECHTER, O. Studies on spreading factors i. The importance of mechanical factors in hyaluronidase action in skin. **The Journal of experimental medicine**, v. 85, n. 1, p. 77 - 97, 1947.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 7, p. 1560 - 1563, 1971.

HERNANDEZ CRUZ, A. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators Inflamm**, v. 2008, p. 874962, 2008.

HIGUCHI, S. et al. A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 107 - 121, 2006.

HSIANG, A. Y. et al. The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record. **BMC evolutionary biology**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015.

HUANG, S. et al. Carboxypeptidase E is a prediction marker for tumor recurrence in early-stage hepatocellular carcinoma. **Tumor Biology**, p. 1 - 9, 2016.

IMIG, J. D. ACE Inhibition and bradykinin-mediated renal vascular responses EDHF involvement. **Hypertension**, v. 43, n. 3, p. 533 - 535, 2004.

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **Biomed Res Int**, v. 2014, 2014.

JACKSON, K. The evolution of venom-conducting fangs: insights from developmental biology. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 975 - 981, 2007.

JIA, L. G. et al. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, v. 34, n. 11, p. 1269 - 1276, 1996.

JOHNSON, E. K.; KARDONG, K. V.; OWNBY, C. L. Observations on white and yellow venoms from an individual southern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1169 - 1180, 1987.

KARDONG, K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. **Mem. Inst. Butantan**, v. 46, p. 105 - 118, 1982.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 265 - 293, 1992.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics – cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497 - 506, 2012.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 24, p. 3030 - 3041, 2006.

KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1293-304, 2008.

KOPPER, R. A. et al. Comparison of total protein and enzyme levels in successive regenerations of venom from individual coralsnakes. **Toxicon**, v. 101, p. 19 - 22, 2015.

KORNALIK, F.; MASTER, R. W. P. A comparative examination of yellow and white venoms of *Vipera ammodytes*. **Toxicon**, v. 2, n. 2, p. 109 - 111, 1964.

KREIL, G. Hyaluronidases - a group of neglected enzymes. **Protein Science**, v. 4, n. 9, p. 1666 - 1669, 1995.

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

LAURIDSEN, L. P. et al. Exploring the venom of the forest cobra snake: Toxicovenomics and antivenom profiling of *Naja melanoleuca*. **Journal of proteomics**, 2016.

LECHT, S. et al. Anti-angiogenic activities of snake venom CRISP isolated from *Echis carinatus sochureki*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 6, p. 1169 - 1179, 2015.

LEE, T. K. et al. An N-terminal truncated carboxypeptidase E splice isoform induces tumor growth and is a biomarker for predicting future metastasis in human cancers. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 3, p. 880 - 892, 2011.

LEIS, L. B.; CHEBABO, A. **Diretrizes Diagnósticas de Acidentes com Animais Peçonhentos**. Serviços de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ. 30 p., N/A. Disponível em: www.hucff.ufrj.br/download-de-arquivos/category/26-dip?download=332:rotinas.

LEMA, T.; ARAUJO, M. L.; AZEVEDO, A. C. P. Contribuição ao conhecimento da alimentação e do modo alimentar de serpentes do Brasil. **Comun. Mus. Ciênc. PUCRS, Sér. Zool**, v. 26, n. 1, p. 41 - 121, 1983.

LIRA-DA-SILVA, R. M. et al. Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

LOMONTE, B. et al. Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. **Journal of proteomics**, v. 105, p. 323 - 339, 2014.

LOMONTE, B. et al. Venom of the coral snake *Micrurus clarki*: proteomic profile, toxicity, immunological cross-neutralization, and characterization of a three-finger toxin. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 5, p. 1 - 15, 2016.

LOPES, C. T. A. et al. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento crotálico experimental em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 843 - 849, 2012.

LOURENÇO, A., JR. et al. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. **Toxicon**, v. 69, p. 75 - 81, 2013.

MACARTNEY, J. M. Diet of the Northern Pacific rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*, in British Columbia. **Herpetologica**, v. 45, n. 3, p. 299 - 304, 1989.

MARGRES, M. J. et al. Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **Journal of proteomics**, v. 96, p. 145 - 158, 2014.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749 - 1800, 1998.

MARLAS, G. Isolation and characterization of the α and β subunits of the platelet-activating glycoprotein from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Biochimie**, v. 67, n. 12, p. 1231 - 1239, 1985.

MARTINS, A. M. C. et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1165 - 1171, 2002.

MASSEY, D. J. et al. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2576 - 2587, 2012.

MCCLEARY, R. J. R. et al. Proteomic comparisons of venoms of long-term captive and recently wild-caught Eastern brown snakes (*Pseudonaja textilis*) indicate venom does not change due to captivity. **Journal of proteomics**, p. 51 - 62, 2016.

MELANI, R. D. et al. Seeing beyond the tip of the iceberg: a deep analysis of the venome of the Brazilian rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **EuPA Open Proteomics**, v. 8, p. 144 - 156, 2015.

MELGAREJO, A. R.; CARDOSO, J. L. C. Serpentes peçonhentas do Brasil. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, p. 33 - 61, 2003.

MENDELSON III, J. R.; JENNINGS, W. B. Shifts in the relative abundance of snakes in a desert grassland. **Journal of Herpetology**, p. 38 - 45, 1992.

MENDOZA, J. et al. Patrones electroforéticos de los venenos de serpientes peruanas de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. **Revista de la Sociedad química del Perú**, v. 75, n. 2, p. 235 - 242, 2009.

MÉNEZ, A.; STÖCKLIN, R.; MEBS, D. 'Venomics' or: the venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 255 - 259, 2006.

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304 - 312, 2006.

MIR, R. et al. Conotoxins: Structure, therapeutic potential and pharmacological applications. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 5, p. 582 - 589, 2016.

MOREIRA, V. et al. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12 - 20, 2012.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in immunology**, v. 46, p. 111 - 147, 1989.

MOTTA, V. T. Enzimas. In: MASSAU, M. (Ed.). **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**, 2000.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Evolution of disintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. **Journal of molecular evolution**, v. 43, n. 3, p. 263 - 269, 1996.

NASCIMENTO, C. N. G.; DE OLIVEIRA RAMOS, M.; LICHTENSTEIN, A. Símbolo da medicina. **Revista de Medicina**, v. 85, n. 2, p. 66 - 70, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: LTDA, A. E. (Ed.). **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6 ed., 2014. p. 75 - 114.

NESVIZHSKII, A. I.; AEBERSOLD, R. Interpretation of shotgun proteomic data the protein inference problem. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 1419 - 1440, 2005.

NG, K. K. F.; VANE, J. R. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. **nature**, v. 216, n. 5117, p. 762 - 766, 1967.

NOVOA-HERRÁN, S. S.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. Obtención de un sub-proteoma de citoplasma de una línea celular de trofoblasto mediante fraccionamiento con detergentes. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 35, n. 136, p. 277 - 285, 2011.

OGAWA, T. et al. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 1 - 14, 2005.

OGUIURA, N. et al. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **The Journal of antibiotics**, v. 64, n. 4, p. 327 - 331, 2011.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363 - 370, 2005.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255 - 265, 2011.

ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125 - 135, 2015.

OUYANG, C.; HUANG, T. F. Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Toxicon**, v. 21, n. 4, p. 491 - 501, 1983.

PARRA, A. C. et al. Alterações hematológicas durante a imunização e após a sangria e plasmaferese em equinos de produção de soro hiperimune anticrotálico. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1225 - 1230, 2009.

PAWLAK, J.; KINI, R. M. Snake venom glutaminyl cyclase. **Toxicon**, v. 48, n. 3, p. 278 - 286, 2006.

PEIGNEUR, S. et al. Crotamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. **Mol Pharmacol**, v. 82, n. 1, p. 90 - 96, 2012.

PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande**, v. 5, n. 1, p. 57 - 65, 2003.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 47, n. 1, p. 24 - 29, 2001.

PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 875 - 887, 1981.

PRATES, P. R. Do bastão de Esculápio ao caduceu de Mercúrio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 434 - 436, 2002.

PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. The hyaluronidase activities of some southeast asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629 - 637, 1988.

RÁDIS-BAPTISTA, G. et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 44, n. 3, p. 412 - 423, 2006.

RADVANYI, F. et al. Binding of crotoxin, a presynaptic phospholipase A₂ neurotoxin, to negatively charged phospholipid vesicles. **Journal of neurochemistry**, v. 53, n. 4, p. 1252 - 1260, 1989.

RANDOLPH, A. et al. Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **Protein Science**, v. 1, n. 5, p. 590 - 600, 1992.

RANG, H. P. et al. Hormônios locais: citocinas, lipídeos biologicamente ativos, aminas e peptídeos. In: ELSEVIER (Ed.). **Farmacologia**. Rio de Janeiro, 2011. cap. 17, p. 778.

RAW, I. et al. **Antivenins in Brazil: Preparation**. HANDBOOK OF NATURAL TOXINS. T, T. A. New York: 557 - 581 p. 1991.

RIBEIRO, C. B. et al. *Crotalus durissus collilineatus* venom induces TNF- α and IL-10 production in human peripheral blood mononuclear cells. **ISRN Inflamm**, v. 2014, p. 1 - 7, 2014.

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

RICARDI, R. **Estudo dos mecanismos de supressão da resposta imune induzida pela crotocina do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 2010. (Doutorado). Universidade de São Paulo.

ROJAS, G.; JIMÉNEZ, J. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. **Toxicon**, v. 32, n. 3, p. 351 - 363, 1994.

ROKYTA, D. R. et al. A high-throughput venom-gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 657 - 671, 2011.

ROKYTA, D. R. et al. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC genomics**, v. 13, n. 1, 2012.

ROKYTA, D. R. et al. The transcriptomic and proteomic basis for the evolution of a novel venom phenotype within the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). **Toxicon**, v. 98, p. 34 - 48, 2015.

ROKYTA, D. R.; WRAY, K. P.; MARGRES, M. J. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

RUSSELL, F. E. Toxic effects of terrestrial animal venoms and poisons. In: (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6 ed., 2001. cap. 26, p. 945 - 964.

RUSSELL, F. E.; BUSS, F. W.; WOO, M. Y. Zootoxicological properties of venom phosphodiesterase. **Toxicon**, v. 1, n. 3, p. 99 - 108, 1963.

SAMPAIO, S. C. et al. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 4, p. 551 - 558, 2001.

SAMPAIO, S. C. et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 899 - 907, 2003.

SANTORO, M. L. et al. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 61 - 73, 1999.

SANTORO, M. L. et al. NPP-BJ, a nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from *Bothrops jararaca* snake venom, inhibits platelet aggregation. **Toxicon**, v. 54, n. 4, p. 499 - 512, 2009.

SANTOS, W. G. et al. Envenenamento crotálico em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 13, n. supl., p. 5 - 6, 2013.

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

SAVIOLA, A. J. et al. Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab®. **Journal of proteomics**, v. 121, p. 28 - 43, 2015.

SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science (New York, NY)**, v. 129, n. 3359, p. 1361 - 1363, 1959.

SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 235 - 247, 1980.

SELVANAYAGAM, Z. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987–1997). **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 565 - 586, 1999.

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

SHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-SDS-PAGE for the separation of proteins in the 1–100 kDa range. **Anal Biochem**, v. 168, p. 368 - 379, 1987.

SHARMA, M. et al. Unveiling the complexities of *Daboia russelii* venom, a medically important snake of India, by tandem mass spectrometry. **Toxicon**, v. 107, p. 266 - 281, 2015.

SIIGUR, E. et al. Isolation and characterization of nerve growth factor from *Vipera lebetina* (snake) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 211 - 215, 1985.

SILVA, J. A. A. et al. Gyroxin and its biological activity: effects on CNS basement membranes and endothelium and protease-activated receptors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 281 - 291, 2012.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Atualidades proteômicas na sepse. **Rev Ass Med Brasil**, v. 58, n. 3, p. 376 - 382, 2012.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. L. Schlangengifte, III. Mitteil.: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 71, n. 5, p. 1076 - 1081, 1938.

SOMMER, C.; WHITE, F. A. Cytokines, chemokines, and pain. In: PRESS, I. (Ed.). **Pharmacology of Pain**. 1. Seattle, 2010. p. 279 - 302.

STRACK, R. Milestone 9: Solving the primary structure of peptides. **Nature Milestones**, p. 11 - 11, 2015.

SUNAGAR, K. et al. Molecular evolution of vertebrate neurotrophins: co-option of the highly conserved nerve growth factor gene into the advanced snake venom arsenal. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. E81827, 2013.

THEAKSTON, R. D. G.; LLOYD-JONES, M. J.; REID, H. A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. **The Lancet**, v. 310, n. 8039, p. 639 - 641, 1977.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 541 - 557, 2003.

THOMAZINI, I. A.; BARRAVIERA, B.; BARRAVIERA, B. Alterações hematológicas nos acidentes por animais peçonhentos. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, p. 81 - 96, 1994.

TOKARNIA, C. H. et al. Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops spp.* em animais de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 301 - 312, 2014.

TOYAMA, M. H. et al. Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 585 - 591, 2001.

TRUMMAL, K. et al. Phosphodiesterase from *Vipera lebetina* venom - structure and characterization. **Biochimie**, v. 106, p. 48 - 55, 2014.

TRUMMAL, K. et al. 5'-Nucleotidase from *Vipera lebetina* venom. **Toxicon**, v. 93, p. 155 - 163, 2015.

TU, A. T. Chemistry of rattlesnake venoms. In: (Ed.). **Rattlesnakes Venoms: Their Action and Treatment**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1982. p.247 - 312.

UTKIN, Y. N.; OSIPOV, A. V. Non-lethal polypeptide components in cobra venom. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 28, p. 2906 - 2915, 2007.

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Ecologia e nomes populares de *Crotalus durissus collilineatus* (Amaral, 1926) em áreas sob efeito antrópico do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências** v. 14, n. 1, 2, 3, p. 71 - 79, 2012.

VARGAFTING, B. B. et al. Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **European journal of pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 451 - 464, 1980.

VASQUEZ, M. L. M. et al. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO. In: (Ed.). **Medicamentos na prática clínica**, 2009. p. 45 - 59. ISBN 8536323175.

VIALA, V. L. et al. Proteomic analysis of the rare Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis* venom: evidence of a broad arsenal of toxins. **Toxicon**, v. 107, p. 234 - 251, 2015.

VONK, F. J. et al. Evolutionary origin and development of snake fangs. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 630 - 633, 2008.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77 - 88, 2010.

WARRELL, D. A. Venomous bites, stings, and poisoning. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 207 - 223, 2012.

WASIINGER, C. V. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090 - 1094, 1995.

WEN, F. H. et al. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: identifying research priorities for a largely neglected problem. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 5, p. e0003701, 2015.

WHO. **Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a consultative meeting**. World Health Organization, Geneva, 10 de janeiro de 2007. 2007.

WHO. **Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins**. World Health Organization, p. 8 - 9, 2010.

WIEZEL, G. A. et al. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, v. 107, p. 359 - 368, 2015.

WILLEMSE, G. T. Individual variation in snake venom. **Comp Biochem Physiol**, v. 61B, p. 553 - 557, 1978.

WÜSTER, W.; BERNILS, R. S. On the generic classification of the rattlesnakes, with special reference to the Neotropical *Crotalus durissus* complex (Squamata: Viperidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 28, n. 4, p. 417 - 419, 2011.

WÜSTER, W. et al. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 445 - 459, 2008.

YAMAZAKI, Y. et al. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11, p. 2708 - 2715, 2002.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 51985 - 51988, 2003.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p. 9885 - 9891, 2009.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 227 - 231, 2004.

ZHANG, B. et al. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 1 - 11, 2006.



ZHANG, C.; WU, S.; XU, D. Catalytic mechanism of angiotensin-converting enzyme and effects of the chloride ion. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 22, p. 6635 - 6645, 2013.

Anexos

ANEXO A. Certificado de Regularidade do serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) para utilização de diferentes venenos animais emitido pelo IBAMA.

03/10/2016

IBAMA - Serviços On-Line - Certificado de Regularidade

 Ministério do Meio Ambiente Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis			
CADASTRO TÉCNICO FEDERAL CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR			
Registro n.º:	1506748	Data da consulta:	03/10/2016
		CR emitido em:	03/10/2016
		CR válido até:	03/01/2017
Dados básicos			
CNPJ:	03.026.530/0026-62		
Razão social:	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP		
Nome fantasia:	FMRP - CRIADOURO CIENTÍFICO DA USP		
Data de abertura:	21/05/1952		
Endereço			
Logradouro:	AV. BANDEIRANTES 3900	Complemento:	CAMPUS DA USP
N.º:	3900	Município:	RIBEIRAO PRETO
Bairro:	MONTE ALEGRE	UF:	SP
CEP:	14049-900		
Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais – CTF/APP			
Categoria		Detalhe	
20 - Uso de Recursos Naturais	45 - criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa		
20 - Uso de Recursos Naturais	41 - utilização do patrimônio genético natural - coleta de material biológico com finalidade científica ou didática		
<p>Conforme dados disponíveis na presente data, a pessoa jurídica acima possui Certificado de Regularidade em conformidade com as obrigações cadastrais e de prestação de informações ambientais sobre as atividades desenvolvidas sob controle e fiscalização do Ibama, por meio do CTF/APP.</p> <p>O certificado de regularidade emitido pelo CTF/APP não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades.</p> <p>O Certificado de Regularidade do CTF/APP não habilita o transporte e produtos e subprodutos florestais e faunísticos.</p>			
Fechar			

ANEXO B. Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Proteoma de peçonhas de serpentes *Crotalus durissus collilineatus*: análise de variações individuais”, protocolo nº 15.1.1190.60.8, sob a responsabilidade de Isadora Sousa de Oliveira e da Profa. Dra. Eliane Candiane Arantes, que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na data de 12/04/2016.

Vigência do Projeto	Fev/2016 a Dez/16
Espécie/Linhagem	Rato isogênico Balb/c
Nº de animais	62
Peso/Idade	19-25g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central USP RP

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2016.


Prof. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP