UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento
endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus
durissus collilineatus***

Isabela Gobbo Ferreira

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento
endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus*
*durissus collilineatus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Isabela Gobbo Ferreira

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

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 11/08/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

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.

Ferreira Gobbo, Isabela

Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, 2017.

103 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. VEGF. 2. *Crotalus durissus collilineatus*. 3. Peçonha de serpente 4. Angiogênese. 5. Espectrometria de massas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabela Gobbo Ferreira

Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha família,
Jarbas, Marta e Fernando
por ser meu alicerce, pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder a vida com saúde para poder batalhar por este sonho.

A minha família maravilhosa, meus tesouros: meus pais! Vocês são minha inspiração, agradeço pelo amor infinito, educação, carinho, compreensão e paciência. Ao meu querido irmão, Fernando, pela paciência e companheirismo. Vocês são meu porto seguro, amo muito vocês!

Ao meu querido Matheus, meu amigo, companheiro, meu amor. Agradeço pela paciência, compreensão e, principalmente, por me incentivar a batalhar por mais este sonho. Obrigada por estar ao meu lado sempre que precisei. Te amo!

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes, dona de um enorme coração, uma segunda mãe para todos do Laboratório de Toxinas Animais. Obrigada pela oportunidade de ser sua orientada, obrigada pelas inúmeras palavras de incentivo, pelo amor, educação. Durante os anos que estive no laboratório, a senhora sempre me incentivou, orientou, consolou e ensinou muito. Espero um dia, me tornar a metade da mulher e profissional que a senhora é. Muito obrigada por tudo!

À Prof^a. Dr^a. Manuela Berto Pucca pela paciência nas inúmeras explicações, pela amizade, e pelas considerações com relação ao trabalho, sempre muito enriquecedoras! Muito obrigada!

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 ex-técnica Cirlei Vanni e demais membros do Centro de Química de Proteínas, muito obrigada.

À Prof^a. Dr^a. Vera Lucia de Campos Brites, coordenadora do setor de Manutenção de Répteis da UFU-MG, pela colaboração e concessão das peçonhas utilizadas neste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, coordenadora do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais da UFU-MG e à pós-doutoranda Daiana Silva Lopes, pela colaboração, pela atenção, educação e profissionalismo. Agradeço imensamente pela disponibilidade e carinho todas as vezes que precisei.

Ao Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho, do Laboratório de Inflamação e Dor da FMRP-USP, e ao pós-doutorando André Luis Lopes Saraiva pela colaboração com o ensaio funcional de migração celular. Agradeço a oportunidade de trabalhar com pessoas tão dedicadas e atenciosas, muito obrigada!

À Dr^a. Karla de Castro Figueiredo Bordon, colaboradora deste trabalho, muito obrigada por toda paciência, compreensão, explicações e aprendizados. Você sempre esteve disposta a me auxiliar no que eu precisasse, desde o primeiro dia que entrei no laboratório, somos parceiras de dia de aniversário, geminianas. Muito obrigada por tudo!

À querida técnica do laboratório, Iara Aimê Cardoso, presente em quase todos os meus experimentos, com sua calma e serenidade sempre pronta para ajudar, explicar, dar atenção. A sua ajuda foi fundamental em muitos momentos, muito obrigada Iara!

À minha querida amiga Isadora, par de vaso, obrigada por compartilhar todos os dias essa alegria e simpatia que você tem, agradeço pela paciência, pela amizade, pelos conselhos profissionais e pessoais, sempre presente nos momentos bons e ruins. Muito obrigada, você é muito especial!

Aos demais amigos do Laboratório de Toxinas Animais, Ernesto, Fran, Johara, Anna Laura, Felipe e Fernando pela amizade no dia a dia, por tornar momentos pesados e difíceis em momentos mais leves e alegres. À amiga Gisele, pela enorme paciência em inúmeras explicações sobre espectrometria de massas, pelos conselhos, ideias, pela persistência, muito obrigada a todos vocês!

À pós-doutoranda do laboratório, Camila agradeço muito pela atenção e disponibilidade em ensinamentos diversos, muito obrigada!

À Dr^a. Fernanda Gobbi Amorim, pela disposição em me ajudar nos momentos que mais precisei, você com sua calma e atenção sempre me acolheu, sou muito grata por você estar presente, mesmo longe, sempre fará parte da família do LTA, muito obrigada!

Aos amigos que a pós-graduação me presenteou, Ana Carolina, Paula, João, Cecília e Andréia, que sempre se fizeram presentes nos momentos bons e difíceis, muito obrigada!

Por fim, agradeço à CAPES, FAPESP, CNPq, ao projeto Temático (nº do processo: 2011/23236-4) e ao NAP-TOXAN-USP pelo apoio financeiro fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

FERREIRA, I. G. **Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus***. 2017. 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As peçonhas de serpentes são consideradas ricas fontes de componentes com importantes ações farmacológicas. Estudar seus componentes permite esclarecer a patogenia do envenenamento e identificar moléculas com potenciais aplicações biotecnológicas. As serpentes da espécie *Crotalus durissus* habitam diversas regiões do Brasil e suas peçonhas são compostas de grande quantidade de proteínas (cerca de 95%), carboidratos, cátions metálicos, aminas biogênicas, nucleosídeos, componentes não enzimáticos, aminoácidos livres e uma pequena fração lipídica. Muitos componentes ainda não foram isolados, embora alguns já tenham sido identificados em análises ômicas (transcriptoma e proteoma), como é o caso do VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) identificado por estas técnicas na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* (*C.d.c.*). Os VEGFs são homodímeros não enzimáticos com massas moleculares de 20 a 30 kDa, para o dímero, e de 13 a 16 kDa, para o monômero. Eles desempenham o papel principal na angiogênese (crescimento de novos vasos). No entanto, seu papel no envenenamento ainda não está elucidado. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo isolar e elucidar os aspectos estruturais e funcionais parciais, de um VEGF da peçonha da serpente *C.d.c.*. A peçonha foi inicialmente submetida a uma análise por LC-MS para um conhecimento geral dos seus componentes. Em seguida, foi fracionada por cromatografia líquida de fase reversa em sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) e, posteriormente, todas as 43 frações obtidas foram submetidas ao ELISA para identificação do VEGF. As frações 23, 24 e 25 foram positivas para VEGF e, por isso, escolhidas para serem estudadas. Estas frações foram recromatografadas por meio de três protocolos (troca catiônica, fase reversa e troca aniônica). Após os fracionamentos, todas as subfrações foram submetidas ao ELISA para identificação do VEGF e à eletroforese em gel de poliacrilamida para a análise da composição das mesmas. Em seguida, essas amostras foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina e submetidas a ensaios de espectrometria de massas (ESI-Q-TOF e PMF), para identificar peptídeos tripticos de VEGF e, as que mostraram maior pureza na eletroforese, foram analisadas por sequenciamento amino-terminal, a fim de elucidar sua estrutura primária. Nestes estudos foram identificados um Fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e duas isoformas de VEGF. A cromatografia em coluna de troca iônica (HiTrap QXL) foi a mais efetiva na purificação dos compostos das frações 23, 24 e 25. As 6 subfrações obtidas, após confirmação da presença de VEGF pelo ELISA, eletroforese e espectrometria de massas, foram submetidas a uma análise de reconhecimento do VEGF pelo soro anticrotálico comercial por meio do ELISA e o VEGF foi reconhecido com alta afinidade pelo soro. Em seguida, essas amostras foram analisadas por ELISA com anticorpo anti-FGF a fim de confirmar a presença do FGF, porém, este não foi reconhecido nas amostras pelo anticorpo, nas concentrações utilizadas. As frações contendo VEGF, denominado de *Cdc*VEGF, foram submetidas aos ensaios funcionais. No ensaio de angiogênese *in vitro*, no qual se analisa a indução da formação de tubos em Matrigel® pelas células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs), todas as 6 subfrações induziram a angiogênese, confirmando que mantiveram sua atividade após os fracionamentos e dentre estas, a subfração denominada de 24-QXL3 foi a mais potente, mostrando uma indução da formação dos tubos ainda mais potente que o controle positivo (bFGF). No ensaio *in vitro* de migração de células mononucleares de sangue periférico humano (quimiotaxia em câmara de *boyden*), os *Cdc*VEGFs não alteraram significativamente a migração das células, nas concentrações testadas. Os dados obtidos neste trabalho ampliam o conhecimento sobre a composição da peçonha de *C.d.c.*, além de desenvolver um novo protocolo para isolamento de VEGF e possibilitar sua caracterização. Adicionalmente, foi possível a identificação de um novo FGF, o qual ainda não havia sido identificado na peçonha de *C.d.c.*

Palavras-chave: VEGF, *Crotalus durissus collilineatus*, peçonha de serpente, angiogênese e espectrometria de massas.

ABSTRACT

FERREIRA, I. G. **Structural and functional characterization of a vascular endothelial growth factor, VEGF, from the snake venom *Crotalus durissus collilineatus***. 2017. 103f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Snake venoms are considered rich sources of a variety of components that displays important pharmacological activities. The study of these diverse components allows the elucidation of envenoming pathology and the identification of molecules with potential biotechnological applications. The snakes of *Crotalus durissus* species inhabit various regions of Brazil and their venoms are a complex mixture of proteins (around 95%), carbohydrates, metal cations, biogenic amines, nucleosides, non-enzymatic components, free amino acids and a small lipid fraction. Many components have not yet been isolated, although some of them have already been identified in omics analysis (transcriptome and proteome), like the VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) identified by these techniques in the *Crotalus durissus collilineatus* (*C.d.c*) venom. VEGFs are non-enzymatic homodimers with molecular weights varying from 20 to 30 kDa for the dimer and 13 to 16 kDa for the monomer. They have a central role in angiogenesis (growth of new vessels) but their role in the envenoming pathophysiology is not elucidated. This study aimed to isolate and perform the elucidation of the structural and functional aspects of a VEGF from *C.d.c* snake venom. Initially, the venom was submitted to a LC-MS analysis for the global knowledge of its components. Then, it was fractionated by reversed phase chromatography on FPLC system (*Fast Protein Liquid Chromatography*) and later all the fractions collected were submitted to an ELISA for identification of VEGF. The fractions 23, 24 and 25 proved being positive for VEGF and therefore, were chosen to be studied. These fractions were rechromatographed by three different protocols (cation exchange, reversed phase and anionic exchange). All the subfractions obtained by these chromatographies were analyzed by ELISA for the confirmation and identification of VEGF and by an SDS-PAGE for the analysis of their composition. These subfractions were then reduced, alkylated and digested with trypsin and submitted to spectrometry analysis (ESI-QTOF and PMF) in order to identify tryptic peptides of VEGF and the ones that presented a higher level of purity in the electrophoresis, were analyzed by amino-terminal sequencing to elucidate its primary structure. In these studies were identified an FGF and two isoforms of VEGFs. The chromatography on ion-exchange column (HiTrap QXL column) was the most effective in purifying the compounds of fractions 23, 24 and 25. The six subfractions obtained, after confirmation of the presence of VEGF by the ELISA, electrophoresis and mass spectrometry, were analyzed by another ELISA with anticrotalic serum and the VEGF was recognized with high affinity by the serum, indicating that the molecule is immunogenic. Subsequently, another ELISA was performed with a FGF-antibody to confirm the presence of FGF in the samples. However, the antibody was not able to recognize it in the concentrations used of the fractions. The VEGF found in all six subfractions was denominated as *Cdc*VEGF and submitted to functional analysis. In the *in vitro* angiogenesis assay, which analyzes the induction of tube formation in Matrigel® by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) cells, all 6 subfractions induced angiogenesis, confirming that they maintained their activities after the fractionations. Among those, the subfraction 24-QXL3 showed a more potent response, demonstrating a tube formation even more significant than the positive control (bFGF). In the *in vitro* assay for the migration of human peripheral blood mononuclear cells (chemotaxis technique in boyden chamber), the *Cdc*VEGFs did not significantly alter cell migration at the concentrations tested. The data obtained in this study amplify the knowledge about the composition of *C.d.c* venom and the development of a new isolation protocol for VEGF, possibiliting its characterization. Additionally, it was possible to identify a new FGF, which had not yet been identified in *C.d.c* venom.

Key words: VEGF, *Crotalus durissus collilineatus*, snake venom, angiogenesis and mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Serpente da família Viperidae.	2
Figura 2. Distribuição geográfica das serpentes do gênero <i>Crotalus</i> pelo Brasil.	4
Figura 3. Representação esquemática da interação dos diferentes tipos de VEGFs a seus receptores e os efeitos decorrentes dessa interação.	15
Figura 4. Etapas principais para o isolamento e caracterização do VEGF presente na peçonha da serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i> .	21
Figura 5. Perfil cromatográfico do fracionamento do <i>pool</i> de peçonhas de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> por FPLC com fase reversa.	41
Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE para proteínas de ultrabaixo peso molecular das frações obtidas do <i>pool</i> de peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> .	44
Figura 7. Detecção de VEGF nas 43 frações pelo anticorpo anti-VEGF-F comercial através do método de ELISA indireto.	45
Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE das frações 23, 24 e 25.	46
Figura 9. Fracionamento da fração 23 em coluna de troca catiônica Mono-S 5/50.	48
Figura 10. Eletroforese SDS-PAGE da cromatografia de troca catiônica da fração 23.	48
Figura 11. Perfil cromatográfico de fracionamento das frações 23, 24 e 25 em sistema FPLC.	50
Figura 12. SDS-PAGE dos fracionamentos das frações 23, 24 e 25 em coluna de fase reversa.	51
Figura 13. SDS-PAGE para identificação de glicoproteínas pelo reagente de Schiff.	53
Figura 14. Perfil cromatográfico de fracionamento das frações 23, 24 e 25 em coluna de troca aniônica.	56
Figura 15. SDS-PAGE dos fracionamentos das frações 23, 24 e 25 em coluna de troca aniônica	57
Figura 16. Análise do reconhecimento de VEGF nas subfrações pelo anticorpo anti-VEGF-F comercial através do método de ELISA	59
Figura 17. PMF da subfração FR3 da fração 23 após digestão com tripsina	66
Figura 18. PMF da subfração FR2 da fração 24 após digestão com tripsina	67
Figura 19. PMF da subfração FR2 da fração 25 após digestão com tripsina	68
Figura 20. Determinação da massa molecular das subfrações por MALDI-TOF	73
Figura 21. Alinhamento dos fragmentos de VEGF da fração 23	76

Figura 22. Alinhamento dos fragmentos de VEGF da fração 24	77
Figura 23. Alinhamento dos fragmentos de VEGF da fração 25	78
Figura 24. Reconhecimento do VEGF pelo soro anticrotálico comercial	80
Figura 25. Detecção de FGF nas amostras por ELISA indireto utilizando anticorpo anti-FGF	81
Figura 26. Angiogênese <i>in vitro</i>	83
Figura 27. Ensaio de migração celular <i>in vitro</i>	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acidentes ofídicos no Brasil entre os anos de 2013 e 2015.	4
Tabela 2. Outros tipos de VEGFs.	13
Tabela 3. VEGFs identificados em peçonhas de serpentes.	14
Tabela 4. Receptores para VEGFs.	16
Tabela 5. Identificação de proteínas encontradas no <i>pool</i> de peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> pela técnica de LC-MS.	38
Tabela 6. Volume de retenção e recuperação em termos de absorbância em 214 nm cromatográficas obtidas do <i>pool</i> de peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> .	42
Tabela 7. Massas moleculares aproximadas das bandas proteicas das frações 23, 24 e 25 em SDS-PAGE.	47
Tabela 8. Massas moleculares aproximadas das bandas proteicas das subfrações de fase reversa em SDS-PAGE.	52
Tabela 9. Massas moleculares aproximadas das bandas proteicas das subfrações de troca aniônica em SDS-PAGE.	58
Tabela 10. Identificação de proteínas por UPLC-ESI-QTOF da fração 23 obtida por fracionamento do <i>pool</i> de peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> por RP-FPLC.	60
Tabela 11. Identificação de proteínas por UPLC-ESI-QTOF das subfrações MS1, MS2 e MS3 obtidas na cromatografia da fração 23 em coluna de troca catiônica Mono-S.	62
Tabela 12. Identificação de proteínas por UPLC-ESI-QTOF das subfrações obtidas pelo fracionamento das frações 23, 24 e 25 em cromatografia de troca aniônica.	64
Tabela 13. Cobertura das sequências encontradas no PMF das três subfrações analisadas por MALDI-TOF/TOF.	69
Tabela 14. Identificação de proteínas por meio do sequenciamento amino-terminal	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
Anti-VEGF-F	Anticorpo contra VEGF-F
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AV	Antiveneno
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
<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. ruraima</i>	<i>Crotalus durissus ruraima</i>
<i>C. d. terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<i>C. d. trigonicus</i>	<i>Crotalus durissus trigonicus</i>
<i>C. horridus</i>	<i>Crotalus horridus</i>
CK	Creatinoquinase
CRISP	Proteína secretória rica em cisteína (<i>Cysteine-Rich Secretory Protein</i>)
DHB	2,5-ácido dihidroxidobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Ionização por Eletrospray (<i>Eletrospray Ionization</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
fMLP	<i>N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine</i>
FPLC	Cromatografia líquida rápida de proteínas (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
GtVF	<i>Gloydius tsushimaensis</i> Vascular Factor
HF	<i>Hypotensive factor</i>

HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSCI	<i>Human Stem Cell Institute</i>
HUVEC	Célula endotelial de veia umbilical (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IAA	Iodocetoamida
ICPP	<i>Increasing Capillary Permeability Protein</i>
IC 1 e 2	<i>Increasing capillary 1 e 2</i>
IgG	Imunoglobulina G
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
LDH	Lactato desidrogenase
MALDI	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MM	Massa molecular
MPBS	<i>Milk PBS</i>
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
MMS	<i>Methyl Methanesulfonate</i>
MTT	<i>((3-4,5-Dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide))</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGF	Fator de crescimento neural (<i>Nerve Growth Factor</i>)
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NLM	<i>National Library of Medicine</i>
OPD	Ortofenilenodiamina (<i>o-phenylenediamine</i>)
<i>p</i>	Nível de significância
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pI	Ponto isoelétrico
PBS-T	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) Tween
PLA ₂	Fosfolipase A ₂ (<i>Phospholipase A₂</i>)
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
Pm-VEGF	<i>Protothrops mucrosquamatus</i> VEGF

TC	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 dodecil sultafo de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SINAN	Sistema Informações de Agravos de Notificação
svVEGF	<i>Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor</i>
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TjsvVEGF	<i>Probothrops jerdonii</i> VEGF
TfsvVEGF	<i>Probothrops flavoviridis</i> venom VEGF
TOF	<i>Time Of Flight</i>
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR	Receptores para VEGF

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. Introdução	1
1.1. Serpentes do Brasil	2
1.2. A espécie <i>C. durissus</i>	3
1.3. Epidemiologia e envenenamento por <i>C. durissus</i>	4
1.4. A peçonha de <i>C. durissus</i>	5
1.5. A produção do soro anticrotático	6
1.6.2. Fator de crescimento neural (NGF- <i>Nerve growth factor</i>)	9
1.6.3. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - <i>Vascular endothelial growth factor</i>)	10
1.7. Angiogênese e vasculogênese	14
1.8. Receptores para VEGF (VEGFR)	15
1.9. Aplicações biotecnológicas de VEGFs.....	16
1.10. Importância de estudar novos componentes	17
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e métodos.....	20
3.2. Análise da peçonha por LC – MS.....	22
3.3. Fracionamento da peçonha de <i>C. d. collilineatus</i>	23
3.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para VEGF	24
3.5. Estudo das frações da peçonha que apresentam VEGF.....	24
3.5.1. Cromatografia de troca catiônica.....	25
3.5.2. Cromatografia de fase reversa	25

3.5.3. Cromatografia de troca aniônica.....	25
3.6. Dosagem estimada da concentração proteica das frações obtidas.....	26
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (SDS-PAGE).....	26
3.8. Caracterização estrutural	28
3.8.1. Espectrometria de massas	28
3.8.2. Determinação da massa molecular por MALDI-TOF	29
3.8.3. Identificação de glicoproteínas por SDS-PAGE	30
3.8.4. Sequenciamento amino-terminal	30
3.10. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para FGF	31
3.11. Caracterização funcional do VEGF	32
3.11.1. Ensaio de angiogênese <i>in vitro</i>	32
3.11.2. Ensaio de migração celular <i>in vitro</i>	33
3.12. Análise estatística dos resultados	35
4. Resultados e Discussão	36
4.1. Análise da peçonha de <i>C.d.collilineatus</i> por LC-MS	37
4.2. Fracionamento da peçonha de <i>C. d. collilineatus</i>	40
4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para VEGF	45
4.4. SDS-PAGE das frações 23, 24 e 25	46
4.5. Estudo das frações 23, 24 e 25	47
4.5.1. Protocolo 1 – Cromatografia de troca catiônica	47
4.5.2. Protocolo 2 – Cromatografia de fase reversa.....	49
4.5.3. Identificação de glicoproteínas	52
4.5.4. Protocolo 3 – Cromatografia de troca aniônica	54
4.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para reconhecimento de VEGF.....	58
4.7. Caracterização estrutural	59
4.7.1. Espectrometria de massas	59
4.7.2. <i>Peptide mass fingerprinting</i> (PMF).....	65

4.7.3. Sequenciamento amino-terminal	69
4.7.4. Determinação da massa molecular do VEGF.....	71
4.7.5. Análise das sequências obtidas.....	75
4.8. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para verificar o reconhecimento do VEGF pelo soro anticrotálico comercial	79
4.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para verificar a presença de FGF	80
4.10. Caracterização funcional do <i>Cdc</i> VEGF	81
4.10.1. Ensaio de angiogênese <i>in vitro</i>	81
4.10.2. Ensaio de migração celular <i>in vitro</i>	84
5. Conclusões	87
6. Referências	89

ANEXOS

ANEXO A - Certificado de Regularidade do Setor de Manutenção de Répteis (UFU-MG) para utilização de venenos animal emitido pelo IBAMA.....	102
ANEXO B - Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)	103

1. Introdução

1.1. Serpentes do Brasil

A classificação das serpentes é essencial para o reconhecimento das espécies de importância médica, o que facilita os estudos toxicológicos. As serpentes pertencem à classe Reptilia, ordem Squamata (Opell, 1811) e subordem Serpentes (CALDWELL et al., 2015). Esta subordem é composta de aproximadamente 3.000 espécies, 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, até o momento, foram catalogadas 10 famílias, 75 gêneros, compreendendo 392 espécies (BÉRNILS e COSTA, 2015) e apenas três famílias são consideradas peçonhentas, a Elapidae, Colubridae e Viperidae. Dentre estas, estão incluídas um total de 62 espécies que causam acidentes de importância médica (CAMPBELL e LAMAR, 1989; LIRA-DA-SILVA et al., 2009; BERNARDE, 2014).

As serpentes da família Viperidae apresentam cabeça triangular recoberta por escamas pequenas, com aspecto semelhante às outras escamas do seu corpo (Fig. 1). Possuem um aparelho inoculador solenóglifo (as maxilas possuem apenas um par de dentes funcional agudo e oco) (MELGAREJO et al., 2003). Em associação ao aparato inoculador, estão presentes as glândulas de peçonha na região pós-orbital e, quando comprimidas por músculos acessórios, secretam seu conteúdo (JACKSON, 2007; FRY et al., 2008; VONK et al., 2008).

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

A subfamília Crotalinae, incluída na família Viperidae, apresenta um par de fosseta loreal, um órgão que é termorreceptor e se encontra localizado entre a narina e o olho da serpente. Este órgão é capaz de detectar pequenas flutuações de radiações termais, identificando as presas endotérmicas e a direção delas (BULLOCK e COWLES, 1952; BAKKEN e KROCHMAL, 2007). Esta subfamília é composta por diferentes gêneros que se diferenciam pela cauda: *Bothrops* (FENWICK et al., 2009), *Crotalus* (WÜSTER e BERNILS, 2011) e *Lachesis* (FERNANDES et al., 2004).

O gênero *Bothrops* possui uma cauda simples, sem alterações, apenas com escamas subcaudais em pares (MELGAREJO et al., 2003); o gênero *Crotalus*, apresenta uma estrutura denominada de guizo ou chocalho, localizada na parte final da cauda, que produz um ruído quando a serpente se encontra pronta para o ataque ou irritada; já o gênero *Lachesis* apresenta as últimas escamas subcaudais eriçadas e modificadas, terminando em um espinho (MELGAREJO et al., 2003).

Mais recentemente, os gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* foram diferenciados por meio de sua filogenia, porém, em estudos prévios foi demonstrado que esta diferenciação não é muito clara, o que pode levar a incertezas na nomenclatura de espécies que poderiam ser de importância médica (CARRASCO et al., 2016).

Neste trabalho, apenas a peçonha de serpente do gênero *Crotalus* será objeto de estudo.

1.2. A espécie *C. durissus*

No Brasil, existe somente uma espécie pertencente ao gênero *Crotalus* (popularmente conhecidas como cascavéis) denominada *Crotalus durissus*. No entanto, ela é subdividida em 6 subespécies: *C. d. colillineatus*, encontrada no centro-oeste do país, Minas Gerais e norte do estado de São Paulo; *C. d. terrificus*, encontrada na região meridional e oriental, nas zonas altas e secas; *C. d. marajoensis*, exclusiva da região da Ilha de Marajó; *C. d. ruruima*, encontrada no norte do país; e *C. d. cascavella*, comum em regiões da caatinga do nordeste do país (CAMPBELL e LAMAR, 1989; PINHO e PEREIRA, 2001). Existe também na região norte do país, mais especificamente no estado de Roraima, duas outras subespécies: *C. d. trigonicus* e *C. d. ruruima* (CAMILLO, 1998; AUTO, 2005). Estas distribuições geográficas estão exemplificadas na figura 2.

Figura 2. Distribuição geográfica das serpentes do gênero *Crotalus* pelo Brasil. Os dados foram obtidos com base nos trabalhos de Campbell e Lamar (1989), Pinho e Pereira (2001) e Camillo (1998).

1.3. Epidemiologia e envenenamento por *C. durissus*

Com relação aos acidentes ofídicos, verifica-se que existe uma subnotificação dos acidentes em todas as partes do globo terrestre. Isto se deve ao fato de que, ainda existe falha nas notificações uma vez que os pacientes não procuram atendimento médico ou ainda, muitas vezes, são atendidos e transferidos, não sendo registrados pelo sistema de saúde (CUPO, 2015).

Os dados epidemiológicos obtidos através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) entre os anos de 2013 e 2015 demonstra que é perceptível a oscilação entre os números de acidentes ofídicos sendo registrados, até o momento, 18.165 casos (os dados entre os anos de 2013 e 2015 ainda estão sujeitos à revisão). Com relação aos acidentes crotálicos, estes oscilam entre 1.400 a 1.900 casos notificados por ano (Tabela. 1).

Tabela 1 - Acidentes ofídicos no Brasil entre os anos de 2013 e 2015.

Ano	<i>Crotalus</i>	<i>Bothrops</i>	<i>Lachesis</i>	<i>Micrurus</i>	Não-peçonhentas	Não identificadas	Total
2013	1.934	20.530	939	252	1.376	3.363	28.394
2014	1.911	19.404	835	213	1.403	3.404	27.170
2015	1.422	13.373	524	139	897	2.210	18.565

Fonte: Sistema de Informações de Agravos de Notificação Os dados estão sujeitos à revisão

O envenenamento crotálico é caracterizado principalmente por sua ação neurotóxica. Este fato se deve à ação de neurotoxinas como a crotoxina, que atua tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Sua ação é semelhante à do curare¹, induzindo uma paralisia através da inibição da liberação de acetilcolina na fenda sináptica (TOKARNIA et al., 2014). Os principais sinais e sintomas são ptose palpebral, parestesia de músculos faciais (face miastênica) e paralisia gradual dos músculos respiratórios (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

Além disso, a crotamina e crotoxina da peçonha causam efeitos miotóxicos, levando a uma lesão tecidual sistêmica de músculos esqueléticos e, conseqüentemente, ao processo de rhabdomiólise seguido de mioglobínúria (TOKARNIA et al., 2014). A vítima pode apresentar um quadro de dor difusa e valores aumentados de algumas enzimas bioquímicas como lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), aldolase e creatina cinase (CK) (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

Adicionalmente, já foi relatado que a peçonha crotálica consome os fatores de coagulação, semelhante à ação da trombina, principalmente o fibrinogênio, resultando em um quadro de hipofibrinogenemia, deixando o sangue do indivíduo envenenado incoagulável (THOMAZINI e BARRAVIERA, 1994).

A lesão tubular renal também é comum, sendo causada pela mioglobínúria, o que pode levar a uma insuficiência renal aguda (IRA), uma das grandes responsáveis pelos casos de óbito (TOKARNIA et al., 2014).

1.4. A peçonha de *C. durissus*

A peçonha de *C. durissus collilineatus*, objeto de estudo dessa dissertação, é composta majoritariamente por proteínas (90 - 95%), enzimas como por exemplo L-aminoácido oxidase, 5'- nucleotidase, proteases, fosfodiesterase, embora também apresente carboidratos, cátions metálicos, aminas biogênicas, nucleosídeos e uma pequena fração de lipídios e aminoácidos livres (ARAÚJO et al., 2016). Dentre os componentes proteicos, a crotoxina corresponde a maior fração da peçonha, sendo responsável por cerca de 65 % do total da peçonha, além de ser classificada como o principal componente tóxico. Esta proteína é composta de duas subunidades, uma básica (fosfolipase A₂) que apresenta ações miotóxica e neurotóxica e outra ácida (crotapotina), capaz de inibir a atividade enzimática e aumentar a letalidade da fosfolipase A₂ quando complexada com esta (CLISSA, 1997; CUNHA e MARTINS, 2012).

¹ **Curare**: preparação indígena de mistura de componentes extraídos de cascas e folhas que induz paralisia muscular na presa.

Outra importante proteína presente nesta peçonha é a crotamina (GONÇALVES e VIERA, 1950), a qual apresenta ação tóxica em membranas de fibras musculares - miotoxicidade (OGUIURA et al., 2005). A giroxina também está presente na peçonha crotálica e seu nome é em alusão ao seu efeito em modelos animais (o animal envenenado gira em torno de seu próprio eixo). Além disso, essa proteína apresenta efeito sobre proteínas plasmáticas levando a distúrbios hematológicos (ALEXANDER et al., 1988).

Ainda, na peçonha crotálica, podemos encontrar metaloproteases, peptídeos natriuréticos, convulxinas, proteínas semelhantes à lectinas tipo-C, L-aminoácido oxidases, desintegrinas e peptídeos potencializadores de bradicinina (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009), além de outros componentes com ações farmacológicas já conhecidas e descritas, como a crotalina (KONNO et al., 2008) e a hialuronidase (BORDON et al., 2012). Os componentes não enzimáticos presentes nas peçonhas de serpentes como fatores de crescimento neural e endotelial vascular, também apresentam interesse científico. Esses compostos, apesar de serem pouco estudados, contribuem significativamente para o quadro de envenenamento crotálico.

1.5. A produção do soro anticrotálico

O único tratamento específico existente para acidentes ofídicos é o soro antiofídico, composto por imunoglobulinas obtidas a partir de animais imunizados com um *pool* de peçonhas específicas (WHO, 2007).

A história da soroterapia antiofídica se iniciou em 1894 na França com o Dr. Albert Calmette, o qual produziu o primeiro soro contra a cobra *Naja tripudians*, denominando-o antiveneno. Paralelamente, no Brasil, o médico Vital Brazil Mineiro da Campanha iniciou seus estudos na produção de antivenenos e, trabalhando com serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, produziu os primeiros antivenenos do país (HAWGOOD, B. J., 1992; HAWGOOD, BARBARA J, 1992; CRAPS, 1993). Assim, por mais de um século, a soroterapia é considerada o tratamento específico para o envenenamento ocasionado por animais peçonhentos.

Atualmente, no Brasil, três instituições são as principais responsáveis pela produção dos soros antiofídicos: Instituto Vital-Brazil, Instituto Butantan e Fundação Ezequiel Dias, as quais distribuem o soro para instituições de saúde (WEN et al., 2015).

Brevemente, para a produção de antivenenos um *pool* de peçonhas (de vários indivíduos de uma mesma espécie) é inoculado em doses crescentes em animais de grande porte, no país em cavalos, através do processo de hiperimunização. Posteriormente, os anticorpos que

constituirão o soro heretólogo² específico são obtidos através de plasmaferese dos animais (PARRA et al., 2009).

Embora a soroterapia tenha provado a sua eficiência na redução da mortalidade em casos de acidentes ofídicos, a produção do soro para o tratamento destes acidentes ainda possui alguns problemas:

- 1) dificuldade em se obter grande quantidade da peçonha que é a matéria prima para a produção do soro antiofídico;
- 2) grande variação intraespécie das peçonhas (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010), o que resulta em variações da eficiência do lote de soro, visto que esta depende das amostras utilizadas para a hiperimunização e, dependendo do conteúdo da peçonha da serpente que ofendeu a vítima;
- 3) alto custo na produção do soro, principalmente na manutenção dos cavalos, além do tempo de vida desses animais ser reduzido drasticamente (de 25 para 5 anos) devido à alta toxicidade da peçonha e utilização dos adjuvantes (MARCUSI et al., 2011);
- 4) 70% dos anticorpos do soro são não-neutralizantes, ou seja, são anticorpos específicos para antígenos de patógenos que o cavalo entrou em contato durante sua vida, sendo considerados não neutralizantes (LAUSTSEN et al., 2015).
- 5) os anticorpos de cavalo, que são heterólogos para humanos, podem causar reações de hipersensibilidade, como anafilaxia (CUPO et al., 1991; LEON et al., 2013) e doença do soro (CUNNINGHAM et al., 1987; SOFER et al., 1994; DESCOTES e CHOQUET-KASTYLEVSKY, 2001).

Até o momento, cinco tipos de soros antiofídicos (ou antivenenos – AV) são produzidos no Brasil: anti-botrópico (*Bothrops* AV), anti-elapídico (*Micrurus* AV), anti-botrópico/crotálico (*Bothrops-Crotalus* AV), anti-botrópico/laquétrico (*Bothrops-Lachesis* AV) e anticrotálico (*Crotalus* AV), sendo que este último é produzido por peçonhas de *C. d. terrificus* (50%) e *C. d. collilineatus* (50%) (HUI WEN et al., 2015).

² **Soro heterólogo:** soro produzido em uma espécie e administrado em outra (ex. soro anticrotálico produzido em cavalos e administrado em humanos).

1.6. Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento estão associados com o crescimento e proliferação celular. Eles constituem a principal classe de proteínas envolvidas com a angiogênese, vasculogênese, proliferação e sobrevivência de células endoteliais vasculares. Ainda são poucos os relatos de literatura descrevendo a presença e o isolamento destes compostos em peçonhas de serpentes. Elas são consideradas moléculas minoritárias presentes nas peçonhas de serpentes (BOLDRINI-FRANCA et al., 2016).

Diversos tipos de fatores de crescimento identificados em humanos e mamíferos já foram estudados e seu papel elucidado e existem depositados em banco de dados (*UniProt databank - Universal protein resource knowledge database*) vários tipos de fatores de crescimento: fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*), interferon (IF), fator de crescimento epidermal (EGF – *Epidermal growth factor*), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF – *Platelet-derived growth factor*), fator de necrose tumoral (TNF – *Tumor necrosis factor*), fator de crescimento de insulina-like proteína 5 (IGF – *Insulin-like growth factor-binding protein 5*), fator de crescimento de fibroblasto (FGF – *Fibroblast growth factor*), fator de crescimento neural (svNGF – *Snake venom nerve growth factor*) e fator de crescimento endotelial vascular (svVEGF – *Snake venom vascular endothelial growth factor*).

No presente trabalho serão citados três fatores de crescimento, considerados os mais estudados em peçonhas de serpentes: o fator de crescimento neural, fator de crescimento de fibroblasto e o fator de crescimento endotelial vascular, sendo este último, o principal objeto de estudo do referido trabalho.

1.6.1. Fator de crescimento de fibroblasto (FGF- *Fibroblast growth factor*)

Esta classe de fatores de crescimento foi descrita em 1974 em extratos da glândula pituitária e no cérebro. Os estudos demonstraram que essas moléculas possuem ação mitogênica de fibroblastos do tipo 3T3, estimulando sua proliferação. O grupo de pesquisa identificou nessas amostras duas moléculas nomeadas de acordo com seu ponto isoelétrico: aFGF (*acidic fibroblast growth factor*) também denominado de FGF-1 e o bFGF (*basic fibroblast growth factor*) também denominado de FGF-2 (GOSPODAROWICZ, 1974).

Os FGFs são polipeptídeos de cadeia única que, em sua maioria, possuem na região amino-terminal um peptídeo sinal que facilita sua secreção por meio de mecanismos clássicos. Atuam por interagirem com diferentes receptores para FGF (FGFR – *Fibroblast growth factor*

receptor) que as células expressam. Os FGFs necessitam de cofatores para que o complexo de sinalização entre eles e seu receptor ocorra, além de estes cofatores também serem necessários para a sinalização de sua ação. Dentre eles está o quimicamente heterogêneo sulfato de heparan e, no caso de FGFs envolvidos com metabolismo estão os cofatores *Klotho* (LI et al., 2016).

Até hoje, estão descritos em literatura 22 tipos de FGFs (LI et al., 2016) sendo que os FGFs dos tipos 19, 21 e 23 são descritos como moléculas *hormone-like*, envolvidos no metabolismo de glicose, lipídeos, vitamina D e fosfatos. Porém, o mecanismo pelo qual medeiam essas ações ainda não está totalmente elucidado (KHARITONENKOV, 2009). Em peçonhas de serpentes, até o momento, o FGF só foi identificado no estudo do genoma da serpente *Ophiophagus hannah* (VONK et al., 2013).

1.6.2. Fator de crescimento neural (NGF- *Nerve growth factor*)

Os NGFs são homodímeros ligados não covalentemente, denominados neurotrofinas, que participam do processo de crescimento, diferenciação, sobrevivência e neuroproteção de células neuronais do sistema nervoso central e periférico (REICHARDT, 2006). Também possuem ação em células não neuronais como, células do sistema hematopoiético, células de rins e fígado (KOSTIZA e MEIER, 1996).

O primeiro NGF foi identificado como um fator estimulante de células de sarcoma (COHEN et al., 1954). Exercem sua função através de ligação a dois tipos de receptores: receptor do tipo tirosina quinase denominado de tropomiosina quinase (Trk), o qual após ter o NGF ligado, sofre uma dimerização e ativação. O outro tipo é o receptor p75^{NTR} de baixa afinidade, que leva a regulação da sobrevivência de células neuronais e sua diferenciação. Ambos os receptores atuam em sinergismo para aumentar a afinidade dos sítios de ligação do NGF (OSIPOV et al., 2014; SKAPER, 2017).

Em peçonhas de serpentes, os NGFs correspondem a cerca de 0,1 a 0,5 % e, portanto, também são considerados minoritários (BOLDRINI-FRANCA et al., 2016), tornando seu isolamento e purificação muito mais desafiadores. O NGF de peçonha de serpente mais descrito é o cvNGF (*cobra venom NGF*), isolado da peçonha de *Naja kaouthia*. Foi descrito em modelos *in vitro* e *in vivo*, por suprimir o crescimento do carcinoma de ascite de Ehrlich por meio de um mecanismo indireto, em que os receptores de tropomiosina quinase do tipo A (TrkA) estão envolvidos (OSIPOV et al., 2013; OSIPOV et al., 2014).

Interessantemente, este fator de crescimento está relacionado com a angiogênese pois existem relatos que o descrevem como um ativador indireto do crescimento de células

endoteliais por meio da estimulação da liberação de outros fatores de crescimento. Também pode agir como pró-angiogênico de acordo com estudos pré-clínicos e clínicos, que demonstraram que NGFs têm propriedades de curar feridas. Sendo assim, eles podem ser considerados como promissores medicamentos ou ferramentas moleculares (CALZA et al., 2001; SKAPER, 2017).

1.6.3. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - *Vascular endothelial growth factor*)

O primeiro VEGF foi descoberto há mais de 25 anos, identificado em humanos, denominado de VEGF-A (LEUNG et al., 1989). Foi inicialmente denominado de fator de permeabilidade vascular (VPF), devido à indução de extravasamento de líquido vascular que este promovia (TOMANEK e SCHATTEMAN, 2000).

Os VEGFs são reconhecidos como fatores específicos para células endoteliais vasculares. São glicoproteínas homodiméricas ligadas não covalentemente com massa molecular de 45 kDa, com duas subunidades de massas de 23 kDa cada. Possuem oito resíduos de cisteínas conservados na mesma posição, os quais funcionam como um dímero, uma vez que dois de seus resíduos de cisteínas geram pontes dissulfeto inter e intra cadeias (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997). Sua expressão é regulada em diferentes tecidos por diversos fatores, como hipóxia, liberação de citocinas, hormônios, oncogenes e genes supressores, no caso de tumores (FERRARA, 2004).

Eles são essenciais em processos de angiogênese e vasculogênese, sejam eles fisiológicos ou patológicos. A indução de proliferação de células endoteliais é realizada por meio de interação com dois receptores de tirosina quinase: VEGFR-1 (*Vascular endothelial growth factor receptor 1*) e VEGFR-2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*). Também estimulam a linfangiogênese por meio de interação com um terceiro tipo de receptor de tirosina quinase, o VEGFR-3 (*Vascular endothelial growth factor receptor 3*).

Atualmente, existem sete famílias de VEGFs: VEGFs de humanos, que incluem os tipos A, B, C e D, e os exógenos, que incluem o tipo E (vírus Orf) e o F, encontrado nas peçonhas de serpentes que será detalhado no item 1.7.3.1 (NAKAMURA et al., 2014).

O VEGF é produzido em diversos tipos celulares como células endoteliais, células de músculo liso, macrófagos, linfócitos T ativados, fibroblastos, monócitos e neutrófilos. Estas células expressam, pelo menos, nove diferentes isoformas de VEGF-An onde, “n” pode ser 121, 145, 165, 183, 189 e 206 e representa o número de aminoácidos que compõe a proteína. Essa

grande diversidade ocorre devido a um *splicing* alternativo de um único gene (FERRARA et al., 2003; ANCELIN et al., 2004; TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005; OTROCK et al., 2007).

No entanto, embora exista esta grande diversidade de VEGFs, as células têm uma preferência pela expressão de VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₈₉ e, principalmente, VEGF-A₁₆₅, sendo esta a isoforma mais estudada. As diversas isoformas muitas vezes acabam apresentando a mesma função, como por exemplo, indução de permeabilidade vascular, estimulação da proliferação, migração de células endoteliais, assim como promoção da sobrevivência das células (FERRARA, 2004).

O VEGF-A já demonstrou induzir, em estudos *in vitro*, o crescimento de células endoteliais derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos e a promoção de angiogênese por induzir células endoteliais microvasculares a invadir géis com colágeno e formar estruturas capilares (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997).

Além de promover a angiogênese, foi comprovado que o VEGF-A pode induzir quimiotaxia de monócitos através da modulação da migração transendotelial. Este mecanismo pode ocorrer ou por meio da produção de quimiocinas pelas células ou por meio de ligação do VEGF a receptores para VEGF que as células possam expressar (ANCELIN et al., 2004).

Embora o VEGF-A seja o principal e o mais estudado, outros tipos de VEGFs (Tab. 2) também são bem descritos, porém são menos relevantes (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005).

Tabela 2 - Outros tipos de VEGFs.

Tipo de VEGF	Distribuição	Ação
VEGF-B	Tecidos, músculo esquelético e miocárdio	Ligação no VEGFR-1 com indução de proliferação celular e angiogênese
VEGF-C	Produzido como uma pré-proteína	Ligação no VEGFR-2 e 3 com indução de proliferação e migração de células endoteliais e linfangiogênese
VEGF-D	Produzido como uma pré-proteína	Ligação no VEGFR-2 e 3 com indução de proliferação e migração de células endoteliais e linfangiogênese
VEGF-E	Genoma do vírus parapoxi Orf	Ligação no VEGFR-2 com indução de proliferação celular e angiogênese

1.6.3.1 VEGFs de peçonhas de serpentes (svVEGFs – *Snake venom vascular endothelial growth factors* ou VEGF-F)

Após a descoberta do primeiro VEGF de serpente isolado da peçonha de *Vipera aspis aspis*, um fator com alta atividade hipotensora, denominado de HF (*hypotensive factor*), os VEGFs

se tornaram proteínas não enzimáticas com uma grande importância em peçonhas de serpentes (KOMORI et al., 1999).

O termo svVEGFs foi primeiramente proposto em 2001 pelo grupo de Junqueira de Azevedo, o qual descreveu a primeira biblioteca de DNA complementar (cDNA) da glândula da peçonha da serpente *Bothrops insularis* no qual foi descrito o cDNA que codifica o VEGF.

Desde então, diversos VEGFs isolados e/ou identificados em peçonhas de serpentes de diferentes espécies por meio de técnicas distintas já foram descritos, e eles se encontram resumidos na tabela 3.

No geral, os svVEGFs são proteínas homodiméricas com um domínio de ligação à heparina. Possuem massa molecular que varia entre 20 e 30 kDa em condições nativas e entre 13 e 16 kDa em condições reduzidas. Reconhecem seletivamente receptores para VEGFs dos tipos VEGFR-1 e 2. O motivo de cisteína (*cysteine knot motif*) característico da família de VEGF é completamente conservado e, sua estrutura primária possui cerca de 50% de homologia quando comparada com a do VEGF-A₁₆₅ de humanos. Os svVEGFs possuem uma região C-terminal mais curta com relação à região C-terminal de VEGFs de humanos (YAMAZAKI, Y. et al., 2003; TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005; YAMAZAKI et al., 2005).

Existem relatos que a região C-terminal de svVEGFs funciona como um sítio de ligação à heparina e, especificamente, inibe a atividade biológica do VEGF-A₁₆₅. Este dado foi comprovado pelo grupo de Yamazaki em 2005. O grupo demonstrou que, este sítio de ligação localizado na região C-terminal do svVEGF denominado Vammin (isolado da peçonha da serpente *Vipera ammodytes ammodytes*) conseguiu inibir a atividade biológica do VEGF-A₁₆₅ *in vitro* e *in vivo* (YAMAZAKI et al., 2005).

Tabela 3 - VEGFs identificados em peçonhas de serpentes.

VEGF	Espécie de serpente	Técnica	Referência
HF	<i>Vipera aspis aspis</i>	Isolado da peçonha	KOMORI et al., 1999
VEGF	<i>Bothrops insularis</i>	Clonagem e expressão	JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2001
ICPP	<i>Daboia deserti</i>	Isolado da peçonha	GASMI et al., 2002
Vammin	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	Isolado da peçonha	YAMAZAKI, Y. et al., 2003
VR-1	<i>Daboia russelli russelli</i>	Isolado da peçonha	YAMAZAKI, YASUO et al., 2003
TfsvVEGF	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	Isolado da peçonha	TAKAHASHI et al., 2004
VEGF	<i>Bothrops erythromelas</i>	Clonagem e expressão	JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE et al., 2004
Pm-VEGF	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	Isolado da peçonha	CHEN et al., 2005
IC 1 e 2	<i>Macrovipera lebetina</i>	Isolado da peçonha	ALLOUI et al., 2009
VEGF	<i>Crotalus atrox</i>	Transcriptoma	YAMAZAKI et al., 2009
VEGF	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	Transcriptoma Proteoma	BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009 BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010
VEGF	<i>Crotalus tigris</i>	Proteoma	CALVETE et al., 2012
GtVF	<i>Gloydius tsushimaensis</i>	Isolado da peçonha	NAKAMURA et al., 2014
VEGF	<i>Crotalus oreganus helleri</i>	Transcriptoma	SUNAGAR et al., 2014
TjsvVEGF	<i>Protobothrops jerdonii</i>	Isolado da peçonha	ZHONG et al., 2015
VEGF	<i>Crotalus horridus</i>	Transcriptoma	ROKYTA et al., 2015
VEGF	<i>Dispholidus typus</i>	Transcriptoma	PLA et al., 2017

Baseando-se em suas atividades de induzir um aumento da permeabilidade vascular, existem especulações que esta classe de proteínas possa contribuir para o aumento da toxicidade durante o envenenamento, por meio do extravasamento de líquido decorrente desse aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, aumento do influxo de toxinas e outras proteínas presentes na peçonha (TAKAHASHI et al., 2004).

Diversos svVEGFs já isolados tiveram sua atividade testada em relação à proliferação de células endoteliais. Em sua maioria, esta atividade, quando comparada a um VEGF humano (VEGF₁₆₅), é mais potente (KOMORI et al., 1999; YAMAZAKI, Y. et al., 2003; CHEN et al., 2005). Mas existem casos contraditórios em que o svVEGF testado, quando comparado ao VEGF₁₆₅, demonstrou ter uma atividade de proliferação muito menor, podendo ter uma outra função primordial no envenenamento, ao invés de atuar como um fator para a angiogênese e/ou aumento de permeabilidade vascular (TAKAHASHI et al., 2004).

1.7. Angiogênese e vasculogênese

Angiogênese e vasculogênese são fenômenos regulados por meio de fatores de crescimento e seus receptores de tirosina quinase. Angiogênese é a formação de novos capilares de vasos sanguíneos a partir de microvasos já existentes e envolve o recrutamento de células de suporte a diferentes segmentos da vasculatura, com ações na ativação, migração e proliferação de células endoteliais (PANDYA et al., 2006).

A angiogênese pode ocorrer de duas maneiras, fisiológica ou patológica, e sua distinção é baseada nos diferentes tipos de vasos que cada uma induz. A angiogênese fisiológica tem seu início no desenvolvimento fetal e continua após o nascimento para a formação de vasos sanguíneos normais em tecidos adultos. Esta se mantém em equilíbrio com a ativação de moléculas indutoras, como fatores de crescimento endoteliais vasculares ou inibidoras (TOMANEK e SCHATTEMAN, 2000; PANDYA et al., 2006). A angiogênese do tipo patológica é iniciada por algum tipo de disfunção, como tumores ou infarto do miocárdio, fazendo com que apareçam vasos sanguíneos distribuídos de maneira não uniforme e estrutural e funcionalmente heterogêneos, devido à ativação do fator de crescimento endotelial vascular (DVORAK, 2005).

A angiogênese patológica foi inicialmente proposta com base na resposta neovascular potente induzida por tumores. Posteriormente, foi demonstrado que tecidos normais também são fontes de atividade angiogênica e que diversas moléculas estão envolvidas neste processo. Dentre elas destacam-se as reguladoras positivas de angiogênese, como por exemplo, fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento transformador α e β , fator de crescimento do hepatócito, fator de necrose tumoral, angiogenina, interleucina-8 (IL-8) e angiopoietinas (FOLKMAN, 1992; YANCOPOULOS et al., 2000).

Adicionalmente, tem sido demonstrado que algumas proteínas encontradas nas peçonhas de serpentes são capazes de induzir o crescimento de células endoteliais e também ativar a angiogênese. Tais proteínas são correlacionadas com os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs- *Vascular Endothelial Growth Factor*) de humanos e com os fatores de crescimento de fibroblasto de humanos (FGF- *Fibroblast Growth Factor*). Essas moléculas possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, o que pode facilitar o acesso de outras proteínas e toxinas presentes na peçonha aos seus alvos finais. Com isso, estas proteínas podem ser utilizadas como ferramentas para o estudo de angiogênese e vasculogênese assim como para o tratamento de doenças isquêmicas (ALLOUI et al., 2009).

A família dos fatores de crescimento, mais especificamente, a dos VEGFs e FGFs é de reconhecida importância para a angiogênese e vasculogênese. Sua importância deriva de suas especificidades pelas células endoteliais vasculares, atuando na regulação da proliferação e sobrevivência de células endoteliais vasculares de artérias, veias, vasos linfáticos e fibroblastos (DVORAK, 2005; PANDYA et al., 2006).

1.8. Receptores para VEGF (VEGFR)

Os VEGFs se ligam e ativam diferentes receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase (Fig. 3). Essa ligação do VEGF aos seus diferentes receptores inicia vias de sinalização intracelular distintas levando a uma dimerização do receptor e, em seguida, uma autofosforilação de resíduos de tirosina. Estes, por sua vez, conduzem a uma ativação de transdução de sinal de moléculas específicas para que, no fim, ocorra o aumento da permeabilidade vascular, angiogênese, migração celular e proliferação de células endoteliais vasculares, linfáticas, macrófagos, monócitos e células do sistema hematopoiético (CAPP et al., 2009). Os tipos de receptores para VEGF pertencentes à família de tirosina quinase estão listados e detalhados na tabela 4.

Figura 3. Representação esquemática da interação dos diferentes tipos de VEGFs a seus receptores e os efeitos decorrentes dessa interação. Adaptado de (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005).

Além dos receptores de tirosina quinase, existem ainda dois tipos de co-receptores para VEGF: as neuropilinas (NRP) dos tipos 1 e 2. Estas possuem um papel na modulação da ligação do VEGF aos outros receptores levando a um aumento da afinidade dessa ligação (LEE et al., 2002; HICKLIN e ELLIS, 2005; TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005).

Tabela 4 - Receptores para VEGFs.

Receptor	Afinidade	Tipos de células que os expressam	Efeitos
VEGFR-1	VEGFs A, B e F	Monócitos envolvidos com quimiotaxia, células endoteliais vasculares	Angiogênese, aumento de permeabilidade vascular, proliferação e migração
VEGFR-2	VEGFs A, C, D, E e F	Células endoteliais vasculares e do sistema hematopoiético	Aumento permeabilidade vascular, angiogênese e mitogênese
VEGFR-3	VEGFs C e D	Células endoteliais linfáticas	Linfangiogênese, migração e proliferação de células endoteliais vasculares

1.9. Aplicações biotecnológicas de VEGFs

O banco de dados *Clinical Trials*, que é mantido pelos órgãos *National Library of Medicine* (NLM) e *National Institutes of Health* (NIH) em conjunto com o *Food and Drug Administration* (FDA), reúne os estudos clínicos em andamento, concluídos ou em recrutamento do mundo todo. A busca de estudos clínicos neste banco de dados utilizando como descritor VEGF resultou em 1830 estudos, sendo que desses 293 se encontram abertos com recrutamento. Como exemplos de aplicações terapêuticas do uso de VEGFs e anti-VEGFs destacam-se a neovascularização intraocular, edema macular ocasionado pela diabetes, degeneração macular, tratamento de câncer e isquemias (U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2017).

Ainda, é importante destacar que já existem drogas comerciais envolvendo esta molécula, como é o caso do Neovasculgen® (Regenera Global) - medicamento desenvolvido pelo órgão *Human Stem Cell Institute* (HSCI), da Rússia. Este medicamento é composto de VEGF-A₁₆₅ acoplado a um vetor de plasmídeo, para ser utilizado em terapia gênica para o tratamento de isquemia arterial periférica. O medicamento atua na estimulação do crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) promovendo um efeito terapêutico prolongado e, conseqüentemente, melhora de vida do paciente (HUMAN STEM CELL INSTITUTE, 2016).

Recentemente, o HSCI iniciou o recrutamento de pessoas para um estudo clínico envolvendo o uso do Neovasculgen® em pacientes com neuropatia diabética para verificar qual o efeito do medicamento nesta patologia (U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015). Assim, medicamentos como o Neovasculgen® podem apresentar diversas aplicações.

1.10. Importância de estudar novos componentes

Embora várias toxinas provenientes da peçonha de *C. durissus collilineatus* já tenham sido estudadas, dados de transcriptoma e proteoma demonstram que este coquetel de moléculas é imensamente maior (Boldrini-França, Rodrigues et al. 2009; Boldrini-França, Corrêa-Netto et al. 2010). Em particular, na subespécie *C. d. collilineatus* foi demonstrada a existência de transcritos para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em análises de transcriptoma e proteoma. No entanto, o VEGF, até o momento, não havia sido isolado da peçonha bruta.

Desta forma, a proposta desse trabalho foi isolar um novo VEGF da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, visto que este já foi identificado em análises ômicas (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Seu estudo estrutural e funcional poderá servir como base para novas pesquisas em que esta molécula possa ser usada como ferramenta molecular para o estudo da angiogênese, principalmente em patologias isquêmicas. Adicionalmente, os resultados obtidos ampliarão o conhecimento sobre a peçonha de *C. d. collilineatus* e o papel do VEGF para o quadro de envenenamento, além de auxiliar na produção de melhores antivenenos.

2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram o isolamento, caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) a partir de um *pool* de peçonhas da serpente *Crotalus durissus collilineatus*.

Para isto, foi realizado o seguinte delineamento experimental:

- Estudo e fracionamento do *pool* de peçonhas da serpente *C. d. collilineatus*;
- Estudo das frações 23, 24 e 25 e fracionamento das mesmas;
- Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das subfrações obtidas em todas as etapas cromatográficas;
- Caracterização estrutural do VEGF;
- Reconhecimento do VEGF nas frações e subfrações por anticorpo específico;
- Avaliação da especificidade do soro anticrotálico comercial produzido no Brasil contra as subfrações contendo o VEGF;
- Caracterização funcional do VEGF por meio de dois ensaios: ensaio de angiogênese *in vitro* e ensaio de migração celular *in vitro*.

3. Materiais e métodos

Figura 4. Etapas principais para o isolamento e caracterização do VEGF presente na peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus*.

3.1. Peçonhas ofídicas

O *pool* das peçonhas das serpentes da subespécie *Crotalus durissus collilineatus* (*C.d.c* ou *C. d. collilineatus*) foi doado pelo setor de répteis da Universidade Federal de Uberlândia (UFU/MG). A extração das peçonhas foi realizada por funcionários especializados do setor de répteis (UFU/MG) através de compressão das glândulas de peçonha. Em seguida, o *pool* foi dessecado a vácuo em temperatura ambiente durante 6 horas e armazenado a -20 °C até o momento do uso. O Anexo A apresenta o Certificado de Regularidade do setor de répteis emitido pelo IBAMA.

3.2. Análise da peçonha por LC – MS

Para essa análise, 3 mg do *pool* de peçonhas brutas foram secos em centrífuga rotatória a vácuo (Speed-Vac, Savant™, Thermo-Fisher®, Waltham, MA, EUA). A essa mistura, foram adicionados 20 µL de uma solução contendo acetonitrila 50% (V/V) (ACN – 9012-03, J. T. Baker®, - Avantor, Center Valley, PA, EUA) em bicarbonato de amônio 0,1 M (NH₄HCO₃ – 11213, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Em seguida, essa solução foi acrescida de mais 2,5 µL de NH₄HCO₃ 1 M e 2,5 µL de hidróxido de amônio 100% (V000637, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). A essa solução, foram adicionados 5 µL de ditiotreitol 45 mM (DTT - 3483-12-3 - 1,4 – Dithiothreitol, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) e a mistura foi incubada a 56 °C, por 1 hora. Após este período, foram adicionados 5 µL de iodoacetoamida 100 mM (IAA - I6125, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) e a mistura foi deixada em repouso, no escuro, a temperatura ambiente, por 3 horas. Em seguida, o volume final foi diluído cinco vezes com NH₄HCO₃ 0,1 M. Os componentes dessa amostra foram digeridos com 10 µL de tripsina (T4799 - Promega®, Madison, Wisconsin, EUA - 0,2 µg/µL) a 37 °C, por 24 horas. Ao final deste processo, a reação de digestão foi interrompida com a adição de 2 µL de ácido fórmico 100 % (V/V) (0128-02, J. T. Baker® - Avantor, Center Valley, PA, EUA) e centrifugada a 8.500 x g, por 5 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante da amostra centrifugada foi adicionada a uma solução contendo 100 µL de formiato de amônio 5mM (J. T. Baker® - Avantor, Center Valley, PA, EUA) pH 3,2 e ACN 20% (V/V). Essa mistura foi injetada automaticamente em uma coluna de troca catiônica (Polysulfoethyl A, 100 mm x 4,6 mm, 5 µm, 200 Å – PolyLC®, Columbia, MD, EUA) acoplada ao sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography* - LKB-LCC 2252 – Pharmacia, Estocolmo, Suécia). A eluição das frações foi realizada com gradiente linear de

formiato de amônio 5 mM e ACN 20% (V/V), pH 3,2, (solução A) a formiato de amônio 500 mM e ACN 20% (V/V), pH 3,2 (solução B), sob vazão de 1 mL/min. A eluição foi realizada por 10 minutos com 0% de B e por 60 minutos de 0% a 60% de B, coletando-se 1 mL/tubo. A absorbância foi monitorada automaticamente em 280 nm.

As frações eluídas foram secas em centrífuga rotatória à vácuo e em seguida, ressuspensas em uma solução contendo 25 µL de ACN 5% (V/V) e ácido fórmico 0,1% (V/V) e foram centrifugadas novamente a 8.500 x g, por 5 minutos. Estas amostras foram colocadas nos *vials* do espectrômetro de massas, o qual contém uma coluna de fase reversa de 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, Reino Unido).

Os espectros obtidos foram analisados *in silico* por meio de interpretação por uma versão licenciada do programa PeaksStudio (<http://www.bioinform.com/peaksstudio.php>), utilizando diferentes bancos de dados criados por meio de sequências depositadas no UniprotKB (Snake venom e Crotalus). A tolerância de massas dos espectros MS/MS foi ajustada para $\pm 0,5$ Da e cisteínas carbamidometiladas foram selecionadas como modificações fixas e metioninas, histidinas e triptofanos oxidados e a ciclização da glutamina e/ou ácido glutâmico em ácido piroglutâmico, como modificações variáveis.

3.3. Fracionamento da peçonha de *C. d. collilineatus*

Inicialmente, 50 mg do *pool* de peçonhas de *C. d. collilineatus* foram ressuspensos em 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA - 302031, Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) 0,1% (V/V) e 20 µL de ácido fórmico 88% (V/V), centrifugados a 13.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O fracionamento do *pool* das peçonhas foi realizado seguindo método previamente proposto (CALVETE et al., 2007), com modificações, em sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Purifier UPC10 (GE Healthcare®, Little Chalfont, Reino Unido), conectado a uma coluna de fase reversa C18 semipreparativa - JUPITER (5 µm 300 Å de 250 x 10,0 mm - Phenomenex®, Torrance, Califórnia, EUA), sob vazão de 5,0 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de TFA 0,1% (solução A) e acetonitrila 80 % + TFA 0,1 % (solução B) realizando medidas de absorbância no comprimento de onda de 214 nm.

3.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para VEGF

A fim de identificar o VEGF nas frações obtidas com o fracionamento do *pool* de peçonhas de *C.d.c*, um ensaio imunoenzimático utilizando anticorpo anti-VEGF-F foi realizado. Poços de uma placa de ELISA (Fundo plano, 96 poços, CLS3596-50EA Sigma-Aldrich, Corning®, St. Louis, MO, EUA) foram sensibilizados com 2 µg do *pool* de peçonhas de *C.d.c* e 2 µg das 43 frações obtidas pelo fracionamento da peçonha bruta. As referidas amostras foram diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 (volume final de 100 µL por poço) e incubadas por uma noite a 4°C. Como controle negativo foram utilizados poços não sensibilizados. Como controle positivo utilizou-se 0,5 µg de VEGF recombinante (AR31064PU-L, Acris®, Herford, Alemanha). O conteúdo dos poços foi descartado no dia seguinte e a placa foi lavada 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS – *phosphate buffered saline*), pH 7,2. Os poços foram bloqueados com 250 µL de leite a 2 % (*Milk* PBS - MPBS 2%) (Molico, São Paulo, SP, Brasil), por 2 horas a 37°C. A placa foi novamente lavada, como anteriormente, e a mesma foi incubada por 1 hora a 37°C com anticorpos anti-VEGF-F diluídos 1:1000 em leite 1 % (MPBS 1%) com volume final de 100 µL por poço. A seguir, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween (PBS-T, Tween 20 - P1379 – Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) 0,05 % e 3 vezes com PBS. Depois da etapa de lavagem, 100 µL de anticorpos policlonais anti-coelho conjugados com peroxidase (anti-rabbit-HRP, 31460, ThermoFisher®, Waltham, MA, EUA) diluídos 1:2000 em leite 1% (MPBS 1%) foram adicionados a cada poço, com volume final de 100 µL. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas como na etapa anterior e foram adicionados a cada poço 100 µL de substrato OPD-H₂O₂ (SLBM4528V, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). O desenvolvimento de cor foi aguardado por 15 minutos com a placa ao abrigo da luz, interrompendo-se a reação com 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M (Merck®, São Paulo, SP, Brasil). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Sunrise-basic Tecan®, Männedorf, Suíça) em comprimento de onda de 490 nm.

3.5. Estudo das frações da peçonha que apresentam VEGF

As frações que evidenciaram a presença de VEGF pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) foram submetidas a diferentes etapas cromatográficas, objetivando identificar e isolar o VEGF. Nesse sentido, diferentes protocolos cromatográficos foram adotados.

3.5.1. Cromatografia de troca catiônica

Para esta cromatografia foi utilizada uma coluna de troca catiônica forte Mono-S 5/50 (10 μ m 5 x 50 mm - Tricorn® GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). A coluna foi conectada ao sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC- *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Pure (GE Healthcare®, Little Chalfont, Reino Unido) sob vazão de 0,5 mL/min. A eluição das subfrações foi realizada com gradiente segmentado de bicarbonato de amônio 0,01 M (Tampão A) e bicarbonato de amônio 1 M (Tampão B) em pH 7,8, realizando medidas de absorvâncias em 214 nm. As subfrações obtidas foram coletadas, congeladas e liofilizadas para posterior análise. Após serem liofilizadas, foram dessalinizadas em coluna de fase reversa C-18 (Supelclean™- LC-18 SPE Tube, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) com gradiente de TFA 0,1% (solução A) e ACN 80% + TFA 0,1% (solução B). As amostras obtidas foram secas em centrífuga rotatória a vácuo (SpeedVac, Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA) para serem analisadas.

3.5.2. Cromatografia de fase reversa

Neste segundo protocolo cromatográfico as frações foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa em uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm, Vydac®, Columbia, MD, EUA). Esta coluna foi conectada ao sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Purifier UPC10, sob vazão de 1,0 mL/min, e a eluição das subfrações foi realizada com gradiente segmentado de acetonitrila de 0% (TFA 0,1% - solução A) a 80% (ACN 80 % em TFA 0,1 % - solução B), realizando medidas de absorvância no comprimento de onda de 214 nm. Todas as subfrações coletadas foram congeladas e liofilizadas para as análises posteriores.

3.5.3. Cromatografia de troca aniônica

Para o terceiro protocolo cromatográfico, as frações foram cromatografadas em uma coluna de troca aniônica (0,7 x 25 cm, HiTrap QXL GE Healthcare®, Little Chalfont, Reino Unido). A coluna foi conectada ao sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC- *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Pure sob vazão de 0,5 mL/min. A eluição das subfrações foi realizada com gradiente segmentado de bicarbonato de amônio 10 mM (Tampão A) a bicarbonato de amônio 1 M (Tampão B), pH 7,8, realizando medidas de absorvâncias em 280 nm. As subfrações obtidas foram coletadas, congeladas e liofilizadas. Posteriormente, as subfrações liofilizadas foram dessalinizadas em uma coluna de exclusão

molecular (1,6 x 2,5 cm, HiTrap Desalting GE Healthcare®, Little Chalfont, Reino Unido). Esta coluna foi conectada ao sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC- *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Pure sob vazão de 1,0 mL/min. A eluição das subfrações foi realizada por meio de método isocrático utilizando solução de TFA 0,1%, com medidas de absorbâncias em 280 nm. As subfrações foram secas em centrífuga rotatória a vácuo para serem analisadas.

3.6. Dosagem estimada da concentração proteica das frações obtidas

Foram utilizados dois métodos para a estimativa da concentração proteica das amostras. Um dos métodos foi a leitura da absorbância utilizando comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, EUA). A outra metodologia foi a determinação das absorbâncias das amostras em 205 e 280 nm, seguindo metodologia previamente descrita (SCOPES, 1974) com modificações. Esta leitura foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi U-2001, Chiyoda, Tóquio, Japão).

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras obtidas do fracionamento da peçonha (item 3.2) foram avaliadas utilizando SDS-PAGE para proteínas de ultrabaixa massa molecular (Shagger e Von Jagow 1987). Foi utilizado gel inferior a 16,5 % de acrilamida (A8887, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e bis-acrilamida (17-1304-01, PlusOne, N, N'- Metylenebisacrylamide, GE Healthcare®, Little, Reino Unido) e um gel superior a 5%. As amostras foram dispersas em água deionizada e a quantidade foi estimada pela absorbância em 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000. Posteriormente, foi adicionado tampão da amostra na presença do agente redutor β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Foi utilizado marcador de ultrabaixa massa molecular (M3546-1VL - 26.6 kDa – 1,060 kDa – Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Dois tampões foram utilizados para a corrida, o tampão do ânodo Tris (T1503, Trizma® base Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) a uma concentração de 0,2 M, pH 8,9 e tampão do cátodo Tris 0,1 M, Tricina (T0377, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) 0,1 M e SDS (*Sodium dodecyl sulfate*, 1650, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) 0,1%, pH 8,25.

Para avaliar as subfrações obtidas pelos três protocolos de fracionamento utilizados, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15 %, seguindo o método proposto por (LAEMMLI, 1970) em condições desnaturantes e reduzidas/desnaturantes. Cada amostra foi dispersa em água deionizada e a quantidade foi estimada pela leitura da absorbância

em 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000. Posteriormente, foi adicionado tampão da amostra na presença e ausência do agente redutor β -mercaptoetanol. Foi utilizado marcador de baixa massa molecular (17-0446-01 - 97,0 kDa – 14,4 kDa - GE Healthcare®, Little, Reino Unido). Para a corrida, foi utilizado o tampão do eletrodo Tris 0,025 M, Glicina (Ácido aminoacético - A1021.02.AH - Synth®, Diadema, São Paulo, Brasil) 0,192 M e SDS 0.1 %, com pH 8,3.

Os géis foram corados com soluções diluídas de *Comassie Brilliant Blue* R-350 (B7920, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) ou *Comassie Brilliant Blue* G-250 (1610803, Bio-Rad®, Santo Amaro, SP, Brasil), segundo metodologia descrita por (GEORGIOU et al., 2008), com modificações. Esses géis foram descorados com solução descorante de ácido acético (9508-02 - J. T. Baker - Avantor®, Center Valley, PA, EUA) 10% (V/V) e água ultrapura, respectivamente. Os géis contendo as subfrações obtidas na cromatografia de troca aniônica foram corados com solução de prata seguindo metodologia descrita por (KAVRAN e LEAHY, 2014) com modificações.

As massas moleculares aproximadas das frações e suas subfrações analisadas foram determinadas através do software Image Lab, versão 5.2.1, utilizando o fotodocumentador Gel Doc XR (BioRad®, California, EUA).

3.8. Caracterização estrutural

3.8.1. Espectrometria de massas

Para a análise por espectrometria de massas, as frações de interesse foram secas em centrífuga rotatória a vácuo, subsequentemente dispersas em 10 µL de água deionizada e fervidas por 5 minutos. A essas amostras foram adicionados 20 µL de uma solução contendo ACN 50% (V/V), 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 iodoacetoamida 100 mM nas amostras, as quais foram incubadas sob agitação, 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 em uma concentração de 0,2 µg/µL 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 88%. Os peptídeos tripticos resultantes foram dessalinizados por *Reversed-phase Zip Tip® C18* (ZTC18S096 – Millipore - Merck®, Darmstadt, Alemanha.). O volume final deste processo (50 µL) foi seco em centrífuga rotatória a vácuo. As amostras foram dispersas em 25 µL de ACN 5% (V/V) em ácido fórmico 0,1% (V/V), centrifugadas e colocadas 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 (ESI), acoplado ao analisador híbrido do tipo QTOF (*Quadrupolo-time of flight*) (API-US, Waters®, Manchester, Reino Unido).

Os espectros obtidos foram analisados *in silico* por meio de interpretação por uma versão licenciada do programa PeaksStudio (<http://www.bioinfor.com/peaksstudio.php>), utilizando diferentes bancos de dados criados por meio de sequências depositadas no UniprotKB (Snake, Snake venom e *Crotalus durissus*). A tolerância de massas dos espectros MS/MS foi ajustada para $\pm 0,5$ Da e cisteínas carbamidometiladas foram selecionadas como modificações fixas e metioninas oxidadas, aspartato metilado e ciclização da glutamina e/ou ácido glutâmico em ácido piroglutâmico como modificações variáveis.

3.8.1.2. Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

Para análise do PMF, as subfrações de interesse obtidas em coluna de fase reversa, foram submetidas à redução, alquilação e digestão enzimática. Para tanto, cada amostra (10 µg) foi ressuspendida em 5 µL de NH_4HCO_3 50 mM. Em seguida, foram reduzidas com 2 µL de DTT 250 mM e incubadas por 1 hora a 57°C. Após essa etapa, as amostras foram alquiladas com 2 µL de iodoacetoamida 500 mM por 45 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram digeridas com tripsina (9508-02 - J. T. Baker® - Avantor, Center Valley, PA, EUA) com uma relação 1:20 (tripsina/proteína m/m), por 4 horas a 37°C.

Após a digestão, a reação foi interrompida com a adição de 10 µL ácido fórmico 1% e as amostras foram submetidas a dessalinização em *Reversed-phase Zip Tip® C18*, com eluição em uma solução de acetonitrila/água/ácido fórmico (49,8/50/0,2; V/V). Estas amostras foram analisadas por espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF com Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*), acoplado ao analisador do tipo TOF (*time of flight*) (Bruker Corporation®, Billerica, MA, EUA), utilizando a matriz 2,5-ácido dihidroxidobenzoico (DHB – 8201346 - Bruker Corporation®, Billerica, Massachusetts, EUA), na concentração de 20 mg/mL em acetonitrila e água deionizada contendo 0,1 % de ácido trifluoroacético na proporção de 3:7 (V/V). O aparelho foi operado no modo positivo refletido. Os peptídeos obtidos foram analisados utilizando os programas *FlexAnalysis 3.0*, *BioTools 3.2* e *Sequence Editor*.

3.8.2. Determinação da massa molecular por MALDI-TOF

A massa molecular da subfração correspondente ao VEGF foi obtida através do espectrômetro de massas MALDI-TOF através da técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*), acoplado ao analisador do tipo TOF (*time of flight*). A matriz utilizada foi o ácido sinapínico (8201345, Bruker Corporation®, Billerica, Massachusetts, EUA) a qual foi preparada em uma solução saturada de acetonitrila e água deionizada contendo 0,1% de ácido trifluoroacético na proporção de 3:7 (V/V) e o aparelho foi operado no modo linear positivo. O aparelho foi calibrado com calibrante de proteína I (Bruker Corporation®, Billerica, Massachusetts, EUA) que contém insulina (m/z 5734.51), ubiquitina (m/z 8565.76), citocromo C (m/z 12360.97), mioglobina (m/z 16952.30), citocromo C [M+2H]²⁺ (m/z 6180.99) e mioglobina [M+2H]²⁺ (m/z 8476.65).

3.8.3. Identificação de glicoproteínas por SDS-PAGE

Para a identificação de glicosilação nas proteínas, seguiu-se metodologia descrita previamente por (DOERNER e WHITE, 1990). Dessa forma, as amostras foram submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE a 15% em acrilamida, como descrito por (LAEMMLI, 1970). Em seguida, o gel ficou incubado em uma solução fixadora contendo ácido acético 10% (V/V) e metanol (9093-03 - J. T. Baker - Avantor, Center Valley, PA, EUA) 35% (V/V) em água por 2 horas. Após esse tempo, o gel foi lavado com água destilada e ficou por 1 hora em solução de ácido periódico (395B – *Periodic Acid-Schiff* (PAS) - Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) 0,7% (m/V) e ácido acético 5% (V/V). Posteriormente, o gel foi lavado com água destilada e deixado em solução de metabissulfito de sódio 0,2% (m/V) (Sódio m-bissulfito - M2.344 – Synth®, Diadema, SP, Brasil) e ácido acético 5% (V/V) por duas vezes de 10 minutos cada. Em seguida, o gel foi colocado na solução corante de ácido periódico - reagente de *Schiff* (PAS stain ou *periodic acid-Schiff stain*) e mantido no escuro por 2 horas. O gel foi lavado com água destilada por múltiplas vezes até que fosse detectada a coloração rósea das bandas proteicas glicosiladas.

A solução corante de ácido periódico - reagente de *Schiff* foi preparada utilizando 1 g de fucsina básica (42510 - Synth® - Diadema, SP, Brasil) adicionada à 200 mL de água fervente. Após 5 minutos de fervura, a solução foi resfriada a 50°C em banho com gelo e filtrada em papel de filtro. Logo em seguida, foram adicionados 20 mL de ácido clorídrico (HCl) (9585-02 – J. T. Baker - Avantor®, Center Valley, PA, EUA) 1N ao filtrado e, ao atingir temperatura ambiente, foi acrescentado 1,7 g de metabissulfito de sódio. A solução ficou em repouso por 16 horas, em temperatura ambiente, em frasco âmbar ao abrigo da luz antes de ser utilizada para corar o gel.

3.8.4. Sequenciamento amino-terminal

As subfrações de interesse obtidas a partir dos protocolos cromatográficos de fase reversa e de troca aniônica foram submetidas ao sequenciamento amino-terminal, de acordo com o método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), em um sequenciador automático de proteínas (PPSQ-33A, Protein Sequencer Shimadzu®, Quioto, Japão), conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram submetidas à análise *in silico*, comparadas com sequências já conhecidas em banco de dados BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), em busca de similaridades.

3.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para verificar o reconhecimento do VEGF pelo soro anticrotálico comercial

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

Para este ensaio, foram utilizadas placas de ELISA, sensibilizadas com 2 µg de cada amostra (*pool* de peçonhas de *C.d.c* e frações ou subfrações contendo o VEGF) diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, com volume total por poço de 100 µL e incubadas por uma noite a 4°C. Como controle do ensaio, foram sensibilizados poços com o soro anticrotálico comercial (lote 1208195, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil). Como controle positivo os poços foram sensibilizados com 2 µg de VEGF recombinante e, como controle negativo poços não sensibilizados. O conteúdo dos poços foi descartado no dia seguinte e a placa foi lavada 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2. Os poços foram bloqueados com 250 µL de leite 2 % diluído em PBS (MPBS 2 %) por 2 horas, a 37°C. A placa foi novamente lavada, como anteriormente, e a mesma foi incubada por 1 hora a 37°C com o soro anticrotálico comercial diluído 1:100 em leite (MPBS 1 %) (volume final de 100 µL por poço). A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T 0,05 % (PBS acrescido de 250 µL de Tween 20%) e 3 vezes com PBS. Depois da lavagem, 100 µL de anticorpos policlonais anti-cavalo conjugados com peroxidase HRP (*Horseradish peroxidase* - A6917, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), diluídos 1:3000 em MPBS 1 % foram adicionados a cada poço. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e foram adicionados a cada poço 100 µL de substrato OPD-H₂O₂ (SLBM4528V, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). O desenvolvimento de cor foi aguardado por 15 minutos com a placa ao abrigo da luz, interrompendo-se a reação com 50 µL de ácido sulfúrico 1 M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 490 nm.

3.10. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para FGF

A fim de identificar a presença de FGF nas frações e subfrações de interesse um ensaio imunoenzimático utilizando anticorpo anti-FGF foi realizado. Poços de uma placa de ELISA (Fundo plano, 96 poços, CLS3596-50EA Sigma-Aldrich, Corning®, St. Louis, MO, EUA) foram sensibilizados com 2 µg do *pool* de peçonhas de *C.d.c* e 2 µg das frações e subfrações de interesse. As referidas amostras foram diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH

9,6 (volume final de 100 μ L por poço) e incubadas por uma noite a 4°C. Como controle negativo foram utilizados poços não sensibilizados. Como controle positivo utilizou-se 2 μ g de FGF 10 humano recombinante (CYT-303, ProsPec®, Ness-Ziona, Israel). O conteúdo dos poços foi descartado no dia seguinte e a placa foi lavada 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS – *phosphate buffered saline*), pH 7,2. Os poços foram bloqueados com 250 μ L de leite a 2 % (Milk PBS - MPBS 2%) (Molico, São Paulo, SP, Brasil), por 2 horas a 37°C. A placa foi novamente lavada, como anteriormente, e a mesma foi incubada por 1 hora a 37°C com anticorpos anti-FGF (ORB10654, Biorbyt®, EUA) diluídos 1:1000 em leite 1 % (MPBS 1%) com volume final de 100 μ L por poço. A seguir, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,05% (Tween 20 - P1379 – Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e 3 vezes com PBS. Depois da etapa de lavagem, 100 μ L de anticorpos policlonais anti-coelho conjugados com peroxidase (anti-rabbit-HRP, 31460, ThermoFisher®, Waltham, MA, EUA) diluídos 1:2000 em leite 1% (MPBS 1%) foram adicionados a cada poço, com volume final de 100 μ L. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas como na etapa anterior e foram adicionados a cada poço 100 μ L de substrato OPD-H₂O₂ (SLBM4528V, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). O desenvolvimento de cor foi aguardado por 15 minutos com a placa ao abrigo da luz, interrompendo-se a reação com 50 μ L de ácido sulfúrico 1 M (Merck®, São Paulo, SP, Brasil). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Sunrise-basic Tecan®, Männedorf, Suíça) em comprimento de onda de 490 nm.

3.11. Caracterização funcional do VEGF

3.11.1. Ensaio de angiogênese *in vitro*

Foram utilizadas células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs - *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) obtidas com a ATCC (*American Type Culture Collection*), cultivadas em camadas únicas em estufa umidificada contendo 5% CO₂ a 37°C. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) contendo: 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina (56859 - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), 2 mM de piruvato de sódio (P2256 - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), 1 mM de aminoácidos não essenciais (M7145 - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (P4333 - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

O efeito da indução da formação de vasos (angiogênese) pelo VEGF foi avaliado por meio do ensaio de formação de tubos no Matrigel® (GRANT et al., 1989; YEH et al., 2001). Primeiramente, foi realizada uma curva dose-resposta com as concentrações de 20, 40 e 60

ng/mL de VEGF e, como a menor concentração (20 ng/mL) já foi suficiente para indução da angiogênese, esta foi escolhida para este ensaio e para os ensaios funcionais subsequentes. Desta forma, as células (2×10^4 células/poço) foram pré-incubadas por 30 minutos a 37°C com: meio de cultura (controle negativo), 20 ng/mL de bFGF recombinante (*basic fibroblast growth factor* ou fator de crescimento de fibroblasto básico - 13256029 – Thermo Fisher Scientific® - Waltham, Massachusetts, EUA), usado como controle positivo, 20 ng/mL de VEGF recombinante e 20 ng/mL das subfrações correspondentes ao VEGF isolado. Após a incubação, as células foram aderidas a uma câmara de cultura revestida com 50 µL de Matrigel 5,25 mg/mL (Corning® Matrigel® Matrix, Tewksbury, MA, EUA), por 18 horas. Após esse tempo, as células foram fotografadas com microscópio invertido (Nikon® Eclipse TS-100, Tóquio, Japão) em objetiva de 20 x e o número de vasos formados foram contados.

3.11.2. Ensaio de migração celular *in vitro*

3.11.2.1. Obtenção de células mononucleares do sangue total

Foram coletados 10 mL de sangue periférico de 2 indivíduos saudáveis em tubos contendo EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético ou *Ethylenediamine tetraacetic acid*) 5%, de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O anexo B apresenta o ofício de aprovação do referido projeto no comitê de ética em pesquisa.

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas utilizando-se a metodologia de gradiente de Percoll® (Percoll P-1644, Hanks-Hanks *Balanced Salt Solution* 1X - H9394 e Hanks-Hanks *Balanced Salt Solution* 10X- H4385 - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Para isso, partes iguais de 4 soluções com diferentes concentrações de Percoll® (72, 63, 54 e 42%) foram adicionadas a tubos de 15 mL. A seguir, 2 mL do sangue foram colocados na parte superior do tubo contendo as soluções de Percoll formando 5 gradientes de densidades. Essa solução foi ajustada a uma densidade de $1.130 \pm 0,005$ g/mL a fim de facilitar a recuperação de um grande número de células mononucleares.

Em seguida, essa suspensão (sangue e solução de Percoll®) foi centrifugada (*Centrifuge* 5702 – Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) a $650 \times g$ por 30 minutos a temperatura ambiente, com aceleração e desaceleração. Assim, as soluções com densidades diferentes permitem a formação de camadas distintas facilitando a recuperação de um grande número de células mononucleares viáveis. Após a centrifugação, as células de interesse foram retiradas com a

ajuda de uma pipeta de *Pasteur* (K30-300S, Kasvi®, Curitiba, PR, Brasil) e o sangue não utilizado foi descartado devidamente.

As células mononucleares foram colocadas em outro tubo de 15 mL acrescidos de 12 mL de uma solução de lise (Cloreto de amônio 0,8% + EDTA 0,1 mM - 07800, StemCell®, Vancouver, Canadá). Após homogeneização da mistura, esta foi centrifugada a $400 \times g$ por 8 minutos a 12°C. As células foram então ressuspensas com meio de cultura RPMI (R6504 – Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) suplementado com BSA 0,1% e centrifugadas novamente nas mesmas condições descritas acima, com aceleração e desaceleração. Após esse procedimento, as células foram ressuspensas com mais 1 mL do meio de cultura RPMI suplementado com BSA 0,1% e foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer (K5-0111, Kasvi®, Curitiba, PR, Brasil), em que, uma alíquota de 10 µL da suspensão de células foi misturada com igual volume de líquido de Turk (00066 - Sabre Safety®, Rio das Ostras, RJ, Brasil). O número destas células foi ajustado para $1 \times 10^6/\text{mL}$ em meio de cultura RPMI suplementado com BSA (12657029 - *Bovine Serum Albumin*, Invitrogen Brasil®, São Paulo, SP, Brasil) a 0,1% para que fossem utilizadas no ensaio de migração *in vitro* para análise de quimiotaxia.

3.11.2.2. Migração *in vitro*

No compartimento inferior de uma câmara de quimiotaxia (Kit AP48 - *Boyden chamber*, Neuro Probe®, Warwick, Reino Unido) foram adicionados 28,6 µL (em triplicata) dos seguintes compostos: subfrações contendo VEGF e VEGF recombinante em duas diferentes concentrações (20 e 180 ng/mL). Como controle positivo foi utilizado fMLP, um agente quimiotático (N- *Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine* - 3506 – Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) para células mononucleares a uma concentração de 0,001 µM. Como controle negativo, foi utilizado apenas meio de cultura RPMI suplementado com BSA 0,1%.

Sobre este compartimento inferior foi colocada uma membrana de policarbonato (PCT5013100 – Sterlitech Corporation®, Kent, Washington, EUA) onde as células ficam alojadas em caso de migração no sentido do quimio-atraente e, sobre esta membrana foi posicionada uma membrana de polietileno (provida pelo kit), para que houvesse a vedação do sistema. Por fim, a parte superior da câmara foi montada por meio do encaixe de parafusos contidos no kit da placa. Neste compartimento superior, nos poços, foram adicionados 50 µL da suspensão de células mononucleares (1×10^6 células/mL). Por fim, a câmara ficou incubada

durante 2 horas a 37° C em atmosfera 5% CO₂ (Forma Series II Water Jacket CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific® - Waltham, Massachusetts, EUA).

Após este período, a membrana de polycarbonato foi retirada e corada com o kit de coloração *Differential Quick Stain Kit* (Diff-Quick - 26096-25 – Electron Microscopy Sciences® - EMS, Hatfield, PA, EUA) e o excesso de corante foi retirado com solução salina 0,9 % (0010175 – Laboratório Sanobiol®, Pouso Alegre, MG, Brasil). A membrana corada, foi fixada em uma lâmina de vidro para a contagem das células que migraram, ou seja, para a avaliação da quimiotaxia induzida pelo VEGF. A contagem das células foi realizada em microscopia óptica.

3.12. Análise estatística dos resultados

A análise da variância estatística (ANOVA) seguida de uma análise *post hoc* por meio dos testes de *Tukey*, *Bonferroni's* e *Dunnett's* ($p < 0,05$) foi realizada com auxílio do programa *GraphPad Prism*, versão 5.0 (GraphPad Programa Inc®. San Diego – EUA).

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise da peçonha de *C.d.collilineatus* por LC-MS

Nesta técnica, a identificação de proteínas e peptídeos é realizada a partir de uma mistura complexa, digerida com uma enzima, como a tripsina, sem a necessidade de conhecimento prévio da composição desta mistura, sendo possível, obter uma visão geral dos componentes da amostra (NESVIZHSKII e AEBERSOLD, 2005). Esta abordagem se dá pelo uso de duas técnicas cromatográficas, iniciando-se pela cromatografia de troca catiônica e em seguida, por uma cromatografia de fase reversa. Após a separação, a amostra é transferida para o espectrômetro de massas e a análise é realizada com posterior busca em banco de dados (CARNIELLI, 2013).

Desta forma, considerando a eficácia desta técnica em analisar misturas complexas, o *pool* de peçonhas brutas de *C.d.c* foi submetido a esta análise, como descrito no item 3.2 e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.

Com os resultados obtidos, foi possível ter uma visão geral sobre as proteínas que fazem parte da composição deste *pool* no qual foram identificadas 7 principais classes proteicas diferentes: serinoproteases, L-aminoácido oxidase (LAAO), fosfolipases A₂ (PLA₂), hialuronidases, glutaminil ciclotransferase e, ainda, o VEGF, objeto de estudo deste trabalho. Observa-se que o peptídeo tríptico identificado deste, tem homologia com VEGFs de peçonhas de diferentes subespécies de serpentes do gênero *Crotalus*, como *Crotalus horridus*, *Crotalus atrox* e *Crotalus oreganus helleri*. Este resultado confirma a presença do VEGF no *pool* das peçonhas de *Crotalus durissus collilineatus* sendo possível, portanto, fracionar o *pool* e analisá-lo, visando isolar e caracterizar o VEGF.

Tabela 5 - Identificação de proteínas encontradas no pool de peçonhas de *C. d. collilineatus* por LC-MS.

Classe de proteína (espécie)	Acesso	MM ^a Proteína (Da)	Cobertura	Peptídeos	MM ^a peptídeo (Da)	Carga	Banco de dados ^b
L-aminoácido oxidase (<i>Crotalus horridus</i>)	K9N7B7	56,685	3%	NNPGILEYPVKPSEEGK	1869.9471	2+	A/B
L-aminoácido oxidase (<i>Crotalus atrox</i>)	P56742	58,767	3%	NNPGILEYPVKPSEEGK	1869.9471	2+	A/B
L-aminoácido oxidase (<i>Crotalus adamanteus</i>)	F8S0Z5	58,767	3%	NNPGILEYPVKPSEEGK	1869.9471	2+	A/B
Serinoprotease (<i>Sistrurus catenatus tergeminus</i>)	A0A194ASH9	27,682	5%	KDDVLDKDIMLIK	1544.8484	2+	A
Serinoprotease (<i>Crotalus atrox</i>)	Q8QHK2	27,909	5%	KDDVLDKDIMLIK	1544.8484	2+	A
Serinoprotease (<i>Crotalus horridus</i>)	T1DH10	27,840	5%	KDDVLDKDIMLIK	1544.8484	2+	A
Serinoprotease (<i>Crotalus adamanteus</i>)	F8S116	28,023	5%	KDDVLDKDIMLIK	1544.8484	2+	A
Serinoprotease (<i>Crotalus durissus durissus</i>)	Q2QA04	28,271	8%	DILVLLGVHR DDEKDKDIMLIR	1133.6920 1505.7395	2+ 3+	B
Fosfolipase A ₂ (<i>Crotalus horridus</i>)	A0A0K8RSA2	15,446	12%	CYCGAGGQGWPQDASDR	1883.7314	2+	A/B
Fosfolipase A ₂ homóloga à cadeia ácida (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	P08878	15,273	12%	CYCGAGGQGWPQDASDR	1883.7314	2+	B

Fator de crescimento endotelial vascular - VEGF (<i>Crotalus atrox</i>)	C0K3N3	16,126	13%	EMLVSILDEYPSEVAHLFR	2263.1194	3+	A/B
Fator de crescimento endotelial vascular - VEGF (<i>Crotalus oreganus helleri</i>)	T1DE66	16,037	13%	EMLVSILDEYPSEVAHLFR	2263.1194	3+	B
Fator de crescimento endotelial vascular - VEGF (<i>Crotalus horridus</i>)	T1DGZ4	15,995	13%	EMLVSILDEYPSEVAHLFR	2263.1194	3+	A/B
Hialuronidase (<i>Crotalus horridus</i>)	T1D6Q3	52,503	3%	DLHPELSEDEIKR	1579.7842	3+	A/B
Glutaminil ciclotransferase (<i>Daboia russelli</i>)	M9NCG3	42,116	7%	LQGLQAGWLVEEDTFQSHTPYGYR	2794.3350	3+	A
Glutaminil ciclotransferase (<i>Crotalus atrox</i>)	M9NCI8	42,229	7%	LQGLQAGWLVEEDTFQSHTPYGYR	2794.3350	3+	B

^aMM: Massa molecular **Banco de dados**^b: (A) Snake venom (B) *Crotalus*

4.2. Fracionamento da peçonha de *C. d. collilineatus*

A peçonha de *C. d. collilineatus* é rica em compostos com diferentes estruturas e funções, majoritariamente representados por proteínas e peptídeos em uma mistura complexa, como foi demonstrado no estudo do *pool* pela técnica de LC-MS. No entanto, muitos destes compostos ainda não foram isolados e/ou caracterizados, como é o caso do VEGF, o qual foi, até o momento, apenas identificado em análises de transcriptoma e proteoma (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

Foram obtidas 43 frações (Fig. 5) sendo que, no início deste estudo, a fração 23 foi considerada a de maior interesse. Este interesse se deve ao fato de que em um estudo anterior realizado pelo grupo (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010), foi identificada a presença de VEGF em uma fração eluída nesta região do cromatograma em fracionamento realizado em condições semelhantes. No entanto, as análises descreveram a presença de três proteínas nesta fração: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína secretória rica em cisteína (CRISP) e fosfolipase A₂ (PLA₂) ácida, indicando que seriam necessárias outras etapas cromatográficas para o isolamento do VEGF. Ainda, pode-se observar que as frações 24 e 25, correspondentes a 1,69 e 0,87 % da peçonha, respectivamente (Tab.6), eluem muito próximas à fração 23, podendo indicar uma possível presença de VEGF nestas frações.

O perfil cromatográfico obtido evidenciou que a fração 23, correspondente a 2,83 % da peçonha, apresenta pico de absorbância assimétrico, ou seja, trata-se de uma fração heterogênea, indicando que esta deve ser composta por proteínas com hidrofobicidade semelhantes e que novas etapas cromatográficas seriam necessárias para o isolamento do VEGF.

Figura 5. Perfil cromatográfico do fracionamento do *pool* de peçonhas de *Crotalus durissus collilineatus* por FPLC em coluna de fase reversa. (A) Perfil cromatográfico do fracionamento do *pool* de peçonhas com valores de absorvâncias até 2500 mAU. **(B)** Perfil cromatográfico ampliado e numerado do *pool* de peçonhas com valores de absorvâncias até 500 mAU. A peçonha bruta (50 mg) foi aplicada em uma coluna C-18 semipreparativa, e o fracionamento foi realizado utilizando TFA 0,1% (V/V) como solução A, e ACN 80% (V/V) em TFA 0,1% (V/V), como solução B. A eluição foi realizada sob a vazão de 5,0 mL/min e a leitura realizada em 214 nm.

Tabela 6 - Volume de retenção e recuperação em termos de absorbância em 214 nm das frações obtidas da peçonha de *C. d. collilineatus*.

Fração	Retenção (mL)	Recuperação (%)
1	17,31	3,72
2	129,93	0,35
3	164,01	0,49
4	164,94	0,72
5	172,66	0,74
6	191,70	0,60
7	216,46	0,94
8	264,52	4,52
9	267,98	3,23
10	273,84	2,56
11	275,83	3,68
12	285,29	1,21
13	299,40	1,89
14	305,39	3,42
15	325,62	0,66
16	334,14	1,05
17	349,45	0,33
18	404,30	5,92
19	417,08	31,52
20	438,25	11,25
21	450,23	1,11
22	493,09	0,58
23	552,47	2,83
24	557,92	1,69
25	592,14	0,87
26	628,21	0,78
27	648,58	0,33
28	662,83	0,40
29	688,92	0,40
30	709,29	0,46
31	760,81	0,28
32	764,13	2,53
33	779,18	0,83
34	809,53	1,30
35	814,32	0,56
36	824,17	0,46
37	840,95	0,70
38	891,13	0,44
39	913,77	0,86
40	924,95	0,39
41	954,50	0,51
42	959,29	0,99
43	974,07	1,91
		100,00

Após o fracionamento do *pool* de peçonhas, as 43 frações foram avaliadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de ultrabaixa massa molecular (Fig. 6).

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 16,5 % (Fig. 6A → E). Nesta concentração de acrilamida, os poros que são formados pela malha do polímero são menores e dessa forma, a resolução é melhor para proteínas que apresentam massas moleculares pequenas, inferiores a 20 kDa (SHAGGER e VON JAGOW, 1987), possibilitando a análise de peptídeos e proteínas em todas as frações.

Pode-se observar que a fração de interesse (número 23) apresenta 2 bandas proteicas com massa molecular aproximada de 14 kDa, o que indica a possível presença de um VEGF e/ou PLA₂ nesta fração. Em condições reduzidas (monômero) os svVEGFs apresentam massa molecular entre 13 e 16 kDa (TAKAHASHI et al., 2004; TOKUNAGA et al., 2005; ALOUI et al., 2009; NAKAMURA et al., 2014; ZHONG et al., 2015). Nesta etapa, especulou-se que a primeira banda proteica correspondia à PLA₂ ácida, a qual apresenta massa molecular aproximada de 14.2 kDa (PONCE-SOTO et al., 2007).

Na eletroforese do *pool* de peçonhas, uma banda bastante relevante e correspondente à massa molecular das bandas da fração 23 também pode ser observada. Assume-se que esta seja referente principalmente a uma PLA₂ ácida já descrita pelo grupo nas análises proteômicas (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Este dado já era esperado, visto que esta é uma das proteínas mais abundantes desta peçonha.

As frações 24 e 25 também foram avaliadas e apresentaram uma banda proteica de massa molecular semelhante na eletroforese (cerca de 14 kDa), que pode corresponder a um svVEGF. Diante disso, iniciou-se o estudo das três frações em conjunto.

Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE para proteínas de ultrabaixa massa molecular das frações obtidas do *pool* de peçonhas de *C. d. collilineatus*. Eletroforese a 16,5 % em condições desnaturantes e redutoras. (A) Frações de 1 a 4; (B) Frações de 5 a 15; (C) Frações de 16 a 21; (D) Frações de 22 a 31; (E) Frações de 32 a 43. P1 – Padrão de ultrabaixa massa molecular (26.6 a 1.060 kDa); P2 – Padrão de baixa massa molecular (97.0 a 14.4 kDa); *pool* – mistura de peçonhas de *Crotalus durissus collilineatus*. Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue R-350* e descorados com ácido acético a 10%.

4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para VEGF

A metodologia do ELISA é muito utilizada por ser uma técnica de fácil execução e com uma alta sensibilidade. Com o intuito de detectar a presença do VEGF no *pool* de peçonhas de *C.d.c* e nas 43 frações obtidas com o seu fracionamento, foi realizado um ELISA indireto utilizando um anticorpo comercial específico para VEGF-F (Fig. 7), conforme descrito no item 3.4.

Figura 7. Detecção de VEGF nas 43 frações por ELISA indireto utilizando anticorpo anti-VEGF-F. As frações e o *pool* de peçonhas de *C. d. collilineatus* foram incubadas com o anticorpo anti-VEGF-F comercial, a fim de avaliar a capacidade dele em reconhecer o VEGF presente nessas frações. Controle positivo (+) foram os poços sensibilizados com VEGF recombinante comercial e como controle negativo (-), poços não sensibilizados. Os resultados expressam as médias $\pm$ DP, os quais foram analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey ($n = 3$). *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo (-); * $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo (-).

A partir desse resultado, pode-se afirmar que o VEGF está presente no *pool* de peçonhas, porém, em baixa proporção e isto já era esperado visto que esse componente é minoritário na peçonha. O anticorpo foi capaz de identificar VEGF na fração 22, porém pelo fato desta fração eluir próxima à fração 20, correspondente a uma PLA₂ (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010) ela não foi escolhida para ser estudada.

O VEGF também foi identificado nas frações 23, 24 e 25, com maior reconhecimento na fração 23. Esses dados estão de acordo com os resultados de literatura, como já citado acima. Desta forma, as três frações foram submetidas a uma eletroforese e a uma sequência de estratégias cromatográficas. As frações 16, 28 e 40 também foram positivas para a presença do VEGF. No entanto, de acordo com os resultados da eletroforese, por apresentarem múltiplas bandas proteicas, não se tornaram objeto de estudo.

4.4. SDS-PAGE das frações 23, 24 e 25

Para avaliar a heterogeneidade e confirmar a presença do VEGF como proteína dimérica nas frações 23, 24 e 25 foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15 % (Fig. 8), em condições desnaturantes (com SDS) e desnaturantes/redutoras (com SDS e β -mercaptoetanol), como descrito no item 3.7.

Pode-se observar que as três frações apresentam bandas proteicas com massa molecular aproximada de 14 kDa, em condições desnaturantes/redutoras e, bandas proteicas com massas moleculares próximas à 30 kDa em condições desnaturantes. Esses dados corroboram com dados de literatura, que descrevem os svVEGFs como homodímeros ligados covalentemente e, conseqüentemente, apresentando massas moleculares distintas nas eletroforeses em condições redutoras e não redutoras (KOMORI et al., 1999; NAKAMURA et al., 2014; ZHONG et al., 2015). Dessa forma, confirma-se a presença de VEGF nessas três amostras. As massas moleculares aproximadas (Tab.7) foram calculadas como descrito no item 3.7.

Figura 8. SDS-PAGE das frações 23, 24 e 25. Eletroforese a 15 % em acrilamida. (A) Condições desnaturantes/redutoras. (B) Condições desnaturantes. (P2) Padrão de baixa massa molecular (17-0446-01 - 97,0 kDa – 14,4 kDa). O gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue G-250* e descorado com água ultrapura.

Tabela 7 - Massas moleculares aproximadas das bandas proteicas das frações 23, 24 e 25 em SDS-PAGE.

Frações (FPLC)	Massas moleculares aproximadas (kDa*)	
	Condições Desnaturantes/redutoras	Condições Desnaturantes
23	21,4	37,1
	14,4	11,2
24	14,8	39,0
		11,4
25	37,1	42,6
	11,2	34,6

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

4.5. Estudo das frações 23, 24 e 25

Como observado nos resultados prévios de eletroforese e ELISA, as três frações (23→25) apresentam VEGF. Objetivando realizar um fracionamento adequado e, conseqüentemente, obter as proteínas com elevado teor de pureza, foram abordados três protocolos cromatográficos distintos para o estudo destas amostras.

4.5.1. Protocolo 1 – Cromatografia de troca catiônica

Apenas a fração 23 foi submetida a uma cromatografia de troca catiônica forte em coluna Mono-S (Fig. 9). A fração foi ressuspensa em 1 mL de bicarbonato de amônio 0,01 M e a concentração de proteínas foi estimada utilizando leitura de absorbância em 280 nm.

Foram evidenciadas 4 subfrações denominadas de MS (Mono-S) e seu respectivo número em ordem de eluição. Esta coluna foi a primeira abordagem de escolha devido ao fato de que, na eletroforese da fração 23, pode-se observar uma banda proteica de massa molecular aproximada de 14,43 kDa, em condições redutoras/desnaturantes, e de 11,1 kDa em condições desnaturantes, o que poderia corresponder à presença de uma PLA₂ básica, a qual possui massa molecular entre 9 e 14 kDa e pI básico (PONCE-SOTO et al., 2002; FAURE et al., 2011).

Figura 9. Perfil cromatográfico da fração 23 em coluna de troca catiônica Mono-S 5/50. A cromatografia foi executada utilizando gradiente segmentado de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) de 0,01 M (Tampão A) a 1 M (Tampão B), em pH 7,8. A eluição foi realizada sob vazão de 0,5 mL/min. Leituras de absorbâncias foram realizadas em 214 nm.

Em seguida, as 3 primeiras subfrações foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condições desnaturantes e reduzidas/desnaturantes para a verificação da pureza das subfrações (Fig. 10).

Figura 10. SDS-PAGE das subfrações da cromatografia de troca catiônica da fração 23. Eletroforese a 15 % em acrilamida. (P2) Padrão de baixa massa molecular (17-0446-01 - 97,0 kDa – 14,4 kDa); (pool) 2 μg de uma mistura de peçonhas de *C. d. collilineatus*. O gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue* R-350 e descorado com ácido acético a 10%.

A eletroforese (Fig. 10) demonstra que a fração 23 apresenta banda correspondente à presença do svVEGF de aproximadamente 14 kDa (poços: 2→5) em condições redutoras/desnaturantes e 30 kDa (poços: 6→8) em condições desnaturantes, o que já havia sido evidenciado na outra eletroforese dessa fração (Fig. 8). Estas bandas também foram identificadas no *pool* de peçonhas.

No entanto, a fração 23 também apresentou bandas com massas moleculares próximas a 30 kDa em condições desnaturantes e, uma outra banda com massa molecular de 17 kDa em condições redutoras/desnaturantes, podendo indicar a presença de outra proteína, evidenciando a heterogeneidade da fração bruta.

Os dados obtidos com essa eletroforese corroboram com os dados obtidos no estudo do proteoma realizado da peçonha da serpente *C.d.c* (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010), no qual se identificou um VEGF com massa molecular aproximada de 25.8 kDa, na fração correspondente à fração 23 deste estudo. Ainda, os achados corroboram com dados de literatura que descrevem os svVEGFs como sendo proteínas diméricas, apresentando massas moleculares distintas nas eletroforeses em condições redutoras e desnaturantes (NAKAMURA et al., 2014; ZHONG et al., 2015).

4.5.2. Protocolo 2 – Cromatografia de fase reversa

As três frações (23, 24 e 25) foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa em coluna C-18. Esta estratégia foi escolhida pela facilidade de manipulação das amostras em fase reversa, aliada a ausência da etapa de dessalinização, necessária em colunas de troca iônica, resultando em menor perda da quantidade das amostras. Desta forma, as subfrações obtidas foram apenas liofilizadas e utilizadas posteriormente para análise estrutural.

As três frações foram ressuspensas em água deionizada e a concentração de proteínas foi estimada utilizando espectrofotômetro. Os perfis cromatográficos evidenciaram diferenças nítidas entre as três frações, em especial para a fração 23, indicando a heterogeneidade das frações. As subfrações foram nomeadas de FR (Fase Reversa) e seu respectivo número, de acordo com a ordem de eluição (Fig.11).

Figura 11. Perfil cromatográfico das frações 23, 24 e 25 em coluna de fase reversa C18. (A) Fração 23. (B) Fração 24. (C) Fração 25. As cromatografias foram realizadas utilizando gradiente segmentado de 0% (TFA 0,1 %; Solução A) a 80% de acetonitrila (ACN 80% + TFA 0,1%; Solução B). As eluições das frações foram realizadas sob vazão de 1,0 mL/min e as leituras de absorvâncias foram realizadas em 214 nm.

Após esta etapa cromatográfica, as subfrações foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliácridamida a 15 % em condições desnaturantes e reduzidas/desnaturantes (Fig. 12). As massas moleculares aproximadas foram calculadas como descrito no item 3.7 e estão descritas na tabela 8.

Figura 12. SDS-PAGE das subfrações das cromatografias das frações 23, 24 e 25 em coluna de fase reversa. Eletroforese a 15 % em acrilamida. (P2) Padrão de baixa massa molecular (17-0446-01 - 97,0 kDa – 14,4 kDa). (A) Perfil eletroforético das subfrações da fração 23 em condições desnaturantes/redutoras. (B) Perfil eletroforético das subfrações da fração 23 em condições desnaturantes. (C) Perfil eletroforético das subfrações 24 e 25. (a) Condições desnaturantes/redutoras (b) Condições desnaturantes. Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue G-250* e descorados com água ultrapura.

Com esses perfis eletroforéticos do fracionamento das três frações, pode-se observar uma grande heterogeneidade nas subfrações, principalmente na subfração FR3 da fração 23. Nesta, destacam-se pelo menos 3 bandas proteicas na eletroforese em condições desnaturantes, as quais possuem massa molecular aproximada entre 20, 30 e 11 kDa. Foram identificadas 2 bandas proteicas em condições redutoras/desnaturantes, com massas moleculares entre 20 e 14 kDa e abaixo de 14 kDa (Tab.8), demonstrando que esse protocolo abordado não foi eficiente para o fracionamento e purificação dos componentes presentes nessa fração 23.

Com relação às subfrações das frações 24 e 25 (Fig. 12 C), esse protocolo demonstrou ser mais eficiente do que com relação à fração 23. Nessa eletroforese observam-se bandas proteicas com poucos contaminantes nas subfrações FR2 das duas frações. Nestas não foram identificadas bandas proteicas próximas de 14 kDa em condições desnaturantes. Este resultado indica a ausência de PLA₂ nestas amostras, demonstrando uma eficiência maior desse protocolo no fracionamento e purificação do VEGF nas frações 24 e 25.

Tabela 8 - Massas moleculares aproximadas das bandas proteicas das subfrações de fase reversa em SDS-PAGE.

Fração (FPLC)	Subfrações (FPLC)	Massas moleculares aproximadas na eletroforese (kDa*)	
		Condições Desnaturantes/redutoras	Condições Desnaturantes
23	FR1	15,2	26,7
			12,0
	FR2	15,2	28,1
			11,9
	FR3	16,2 11,3	30,4
			19,5 12,2
24	FR1	14,5	33,7
			38,5
			31,7
25	FR2	14,3	33,7
	FR1	14,4	38,5
			31,7
	FR2	14,4 9,4	37,7
			31,3

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

4.5.3. Identificação de glicoproteínas

As amostras resultantes desse protocolo 2, além das três frações brutas, foram submetidas à uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% com coloração pelo reagente de Schiff (Fig. 13) para a identificação de possíveis glicosilações, visto que, VEGFs de humanos se apresentam como glicoproteínas, apresentando sítios de glicosilação nos dois monômeros (CLAFFEY et al., 1995; KECK et al., 1997).

No caso de svVEGFs, existem relatos de polimorfismos moleculares e, alguns autores postulam que este polimorfismo pode ser devido a clivagens que possam ocorrer durante o processo de purificação/estoque da peçonha, ou podem ser ocasionados por diferenças na estrutura primária e até modificações pós traducionais, como glicosilações (KOMORI et al., 1999; ALOUI et al., 2009).

Figura 13. SDS-PAGE para identificação de glicoproteínas pelo reagente de Schiff. Eletroforese a 15 % em acrilamida. (P2) Padrão de baixa massa molecular (17-0446-01 - 97,0 kDa – 14,4 kDa). **(A)** Perfil eletroforético das subfrações correspondentes à fração 23. **(B)** Perfil eletroforético das subfrações das frações 24 e 25. Foram aplicados 2 µg de todas as amostras. Os géis foram corados com reagente de Schiff.

De acordo com o perfil eletroforético apresentado, é possível identificar bandas proteicas coradas pelo reagente de Schiff, demonstrando presença de glicosilações nestas proteínas. Na figura 13A, pode-se observar que a subfração FR3 da fração 23, a qual deve ser composta pelo VEGF, apresenta banda proteica fortemente corada pelo reagente tanto em condições redutoras/desnaturantes quanto em condições desnaturantes, confirmando a glicosilação nestas proteínas. Ainda nesta eletroforese, nota-se que a subfração FR1 aparece corada apenas nas condições desnaturantes, podendo também ser composta por um VEGF, visto que, nestas condições, a banda proteica aparece com massa molecular próxima à 30 kDa.

Não é possível observar banda corada na subfração FR2, constatando a ausência de glicosilação nesta proteína, a qual se especula ser uma PLA₂, de acordo com os dados obtidos com a eletroforese dessa subfração (Fig. 12), na qual ela aparece como banda intensa na faixa de massa molecular entre 11 e 15 kDa.

Pode-se observar na figura 13B, que as três frações brutas apresentaram bandas proteicas glicosiladas, porém, a fração 23 aparece pouco corada (Fig. 13 B – poço 2). As duas subfrações FR2 das frações 24 e 25, as quais se supõe ser VEGFs apresentaram bandas proteicas glicosiladas.

4.5.4. Protocolo 3 – Cromatografia de troca aniônica

Com o intuito de melhorar o fracionamento e, conseqüentemente, purificar o VEGF das três frações do estudo, elas foram submetidas a um terceiro protocolo por meio de uma cromatografia de troca aniônica com leitura de absorbância em 280 nm (Fig. 14). As amostras foram ressuspensas em água deionizada e a concentração de proteínas foi estimada utilizando espectrofotômetro. As subfrações foram nomeadas de QXL (nome da coluna) e seu respectivo número, de acordo com a ordem de eluição.

Com o perfil cromatográfico obtido, é possível observar um melhor fracionamento e separação dos componentes das amostras, principalmente com relação às frações 24 e 25, demonstrando a presença de 7 e 9 subfrações, respectivamente, quando comparada a estratégia de cromatografia em fase reversa. Pode-se confirmar que este foi o melhor protocolo escolhido para o fracionamento e estudo das três frações.

Após esta etapa cromatográfica, foram retiradas alíquotas de 100 µL de todas as subfrações e estas foram secas em centrífuga rotatória à vácuo para serem submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condições desnaturantes e reduzidas/desnaturantes (Fig. 15). As massas moleculares aproximadas foram calculadas como descrito no item 3.7 e estão apresentadas na tabela 9.

De acordo com o perfil eletroforético, pode-se observar que apenas algumas subfrações apareceram. Com relação às subfrações da fração 23, apenas as bandas proteicas das subfrações QXL 3 e 5 foram identificadas. Em condições reduzidas/desnaturantes, é possível observar a presença de bandas proteicas com massas moleculares aproximadas de 14 kDa para a QXL3 e de 20 kDa para a QXL5. Com as amostras preparadas em condições desnaturantes, a subfração QXL3 apresentou banda proteica com massa molecular aproximada de 31,81 kDa indicando a presença de um VEGF, pois apresentou massas moleculares distintas nas duas condições. Ainda, a subfração QXL5 apresentou massa molecular aproximada de 13,85 kDa quando em condições desnaturantes, podendo corresponder à uma PLA₂.

Com relação à fração 24, as subfrações QXL3, 4 e 6 foram identificadas na eletroforese. Nas subfrações QXL3 e 4, observam-se bandas proteicas com massa molecular aproximada de 16 kDa em condições desnaturantes/reduzidas e, massas moleculares próximas a 33 kDa em condições desnaturantes, indicando a presença de isoformas de VEGF. Ainda nessa condição, observa-se uma banda proteica na subfração QXL6 com massa molecular aproximada de 16 kDa, podendo indicar a presença de PLA₂, visto que esta fração elui próxima à 23 (composta por PLA₂).

Com relação à fração 25, é possível verificar uma diferença com relação à quantidade de subfrações obtidas com seu fracionamento nessa coluna de troca aniônica quando comparada ao fracionamento das frações 23 e 24 na mesma coluna, demonstrando que este protocolo foi o mais adequado para seu fracionamento. Pelo perfil eletroforético é possível observar nas bandas proteicas das subfrações QXL3, 4 e 5 proteínas diméricas sendo que, dessas, apenas a QXL3 se encontra com uma pureza maior, com massa de 33,76 kDa (desnaturantes) e 14,88 kDa (reduzidas). Nas subfrações 4 e 5, em condições desnaturantes, é possível observar pelo menos 3 bandas proteicas, demonstrando uma maior heterogeneidade. Porém, existem bandas mais intensas na faixa de massa molecular próxima a 35 kDa, indicando presença de VEGF.

Assim, estas subfrações apresentaram bandas proteicas com massas moleculares entre 20 e 35 kDa nas condições desnaturantes e 11 a 16 kDa em condições reduzidas e resultados semelhantes foram encontrados para outros VEGFs, como por exemplo, ICPP de *Vipera lebetina* com 27 kDa (desnaturantes) e 16 kDa (reduzidas), TfsvVEGF de *Trimeresurus flavoviridis* com 25 kDa (desnaturantes) e 14 kDa (reduzidas), GtVF de *Gloydius tsushimaensis* com 26 kDa (desnaturantes) e 13 kDa (reduzidas) e TjsvVEGF de *Trimeresurus jerdonii* com 29 kDa em condições desnaturantes e 14 kDa em condições reduzidas (GASMI et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2004; NAKAMURA et al., 2014; ZHONG et al., 2015).

Figura 14. Perfil cromatográfico de fracionamento das frações 23, 24 e 25 em coluna de troca aniônica. (A) Fração 23. (B) Fração 24. (C) Fração 25. As cromatografias foram executadas utilizando gradiente segmentado de bicarbonato de amônio 10 mM (Tampão A) a 1M (Tampão B). As eluições das frações foram realizadas sob vazão de 1,0 mL/min e as leituras de absorbâncias foram realizadas em 280 nm.

Figura 15. SDS-PAGE das subfrações das frações 23, 24 e 25 em coluna de troca aniônica. Eletroforese SDS-PAGE 15 %. (P2) Padrão de baixa massa molecular (17-0446-01 - 97,0 kDa – 14,4 kDa). (A) Perfil eletroforético das subfrações QXL1 a 5 da fração 23 em condições desnaturantes e redutoras; (B) Perfil eletroforético das subfrações QXL1 a 5 da fração 23 em condições desnaturantes; (C) Perfil eletroforético das subfrações QXL1 a 7 da fração 24 em condições desnaturantes e redutoras; (D) Perfil eletroforético das subfrações QXL1 a 7 da fração 24 em condições desnaturantes; (E) Perfil eletroforético das subfrações QXL3 a 9 da fração 25 em condições desnaturantes e redutoras; (F) Perfil eletroforético das subfrações QXL3 a 9 da fração 25 em condições desnaturantes. (G, H e I) Curva do padrão de massa molecular. Os géis foram corados com solução de prata.

Tabela 9 - Massas moleculares aproximadas das bandas proteicas das subfrações de troca aniônica em SDS-PAGE.

Fração (FPLC)	Subfrações (FPLC)	Massas moleculares aproximadas na eletroforese (kDa*)	
		Condições Desnaturantes/redutoras	Condições Desnaturantes
23	QXL3	16,39	31,83
	QXL5	25,08	13,42
24	QXL3	16,02	32,88
	QXL4	16,28	33,87
25	QXL3	14,88	33,76
	QXL4	15,16	52,17
		11,20	37,58
		14,88	33,55
		14,88	54,19
	QXL5	11,56	22,98

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

4.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para reconhecimento de VEGF

A presença de VEGF nas subfrações obtidas dos três diferentes protocolos cromatográficos foi confirmada utilizando o método de ELISA indireto com o anticorpo específico anti-VEGF-F (Fig.16).

Estes resultados demonstram que o anticorpo anti-VEGF-F foi capaz de reconhecer a presença de VEGF em todas as subfrações testadas e também nas frações brutas 23, 24 e 25, comprovando ser específico e eficaz. Esses dados corroboram com os dados de eletroforese dessas subfrações pois, foram identificadas bandas de proteínas diméricas e que, agora pode-se atestar serem correspondentes a VEGFs, com a hipótese de serem diferentes isoformas. Desta forma, pelo fato de todas essas subfrações serem compostas por VEGFs, todas foram posteriormente analisadas para estudo da caracterização estrutural do VEGF.

Figura 16. Análise do reconhecimento de VEGF nas subfrações pelo anticorpo anti-VEGF-F comercial através do método de ELISA. (A) Pool de peçonhas de *C. d. collilineatus*, frações 23, 24 e 25, e as subfrações obtidas com o protocolo 1 – MS1 a 3 e protocolo 2 – FR3 (Fr.23) e FR2 (Fr. 24 e 25). **(B)** Pool de peçonhas de *C. d. collilineatus*, frações 23, 24 e 25, e as subfrações obtidas com o protocolo 3 – QXL3 (Fr.23); QXL3 e 4 (Fr. 24) e QXL3, 4 e 5 (Fr.25). O controle positivo (+) foi considerado como os poços sensibilizados com VEGF recombinante comercial e como controle negativo (-), poços não sensibilizados. Os resultados expressam as médias $\pm$ DP, os quais foram analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey ($n = 3$). *** $p < 0.001$ quando comparado ao controle negativo (-); ** $p < 0.01$ quando comparado ao controle negativo (-); * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo; ### $p < 0.001$ quando comparado ao controle positivo (+); ## $p < 0.01$ quando comparado ao controle positivo (+); # $p < 0.05$ quando comparado ao controle positivo (+).

4.7. Caracterização estrutural

4.7.1. Espectrometria de massas

De acordo com dados de literatura, VEGFs de peçonhas de serpentes geralmente possuem o resíduo amino-terminal bloqueado por piroglutâmico (KOMORI et al., 1999; GASMI et al., 2002; NAKAMURA et al., 2014; ZHONG et al., 2015). Assim, devido ao baixo rendimento das subfrações e a possibilidade do resíduo amino-terminal estar bloqueado, a técnica de sequenciamento dos peptídeos trípticos por meio de espectrometria de massas foi a escolhida.

Para o conhecimento sobre a composição da fração 23 e para a confirmação da presença de VEGF, já foi identificado por meio da técnica do ELISA, essa fração foi submetida à redução, alquilação e digestão com tripsina, como descrito no item 3.8.1 e analisada por espectrometria de massas, a fim de obter a sequência de fragmentos da proteína.

Os espectros foram pesquisados contra bancos de dados provenientes do Uniprot (Snake, Snake venom e *Crotalus durissus*), utilizando o *software* PeaKs Studio como mecanismo de busca de homologia. Os resultados estão listados na tabela 10.

Tabela 10 - Identificação de proteínas por UPLC-ESI-QTOF da fração 23 obtida por fracionamento do *pool* de peçonhas de *C. d. collilineatus* por RP-FPLC.

Classe de proteína (espécie)	Acesso	MM ^a Proteína	Cobertura	Peptídeos	MM ^a peptídeo (Da)	Carga	Banco de dados ^b	Modificações
Serinoprotease (<i>thrombin-like 4</i>) Fragmento (<i>Crotalus durissus collilineatus</i>)	C0HK18	7,072	17%	TLCAGILEGGK	1.117,580	2+	A	-
Serinoprotease 4 (<i>Crotalus horridus</i>)	A0A0K8RT82	28,516	4%	TLCAGILEGGK	1.117,580	2+	A	-
Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (<i>Crotalus horridus</i>)	T1DGZ4	16,497	15,5%	~QVMPFMEVYER	1.410,631	2+	A	M (Oxidação)
Fator de crescimento endotelial vascular - VEGF (<i>Crotalus atrox</i>)	C0K3N3	16,126	23,4%	EMLVSILDEYPSEVAH	1.830,871	2+	B	M (Oxidação) D (Metil)
Fosfolipase A ₂ homóloga à cadeia ácida da toxina Mojave (<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>)	P18998	15,211	88,3%	SSYGCYCGAGGQGWPQDASDR LTGCDPTTDVYTYR GCYCGAGGQGWPQDASDR CCFEHDCCYAK	2.277,880 1.660,740 1.940,752 1.548,525	2+ 2+ 2+ 2+	A/B A/B A/B A/B	C (Carbamidometil)
Fosfolipase A ₂ homóloga à cadeia ácida da crotoxina (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	P08878	15,273	121,4%	SSYGCYCGAGGQGWPQDASDR CCFEHDCCYAK LTGCDPTTDVYTYR QEDGEIVCGEDDPCGTQICEC YLQFSPENCQGESQPC	2.277,880 1.548,552 1.660,740 2.713,024 1.942,782	2+ 2+ 2+ 3+ 2+	C C C C C	M (Oxidação) C (Carbamidometil)

^aMM: Massa molecular ^bBanco de dados: (A) Snake venom (B) Snake (C) *Crotalus durissus*

De acordo com os resultados, a fração 23 apresentou peptídeos trípticos de duas fosfolipases, uma denominada de PLA₂ homóloga à cadeia ácida da crotoxina, e outra denominada de PLA₂ homóloga à cadeia ácida da toxina *mojave*, o que corrobora com os resultados de literatura (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010). Também foram identificados peptídeos trípticos de dois tipos de serinoproteases, demonstrando a complexidade e heterogeneidade da fração. Além destes peptídeos, identificaram-se peptídeos trípticos de VEGFs com homologia para VEGFs de duas diferentes subespécies de serpentes (*Crotalus atrox* e *Crotalus horridus*), o que confirma a presença desta proteína na fração 23.

Além da fração 23, suas três subfrações, MS1, MS2 e MS3, obtidas com o fracionamento em coluna de troca catiônica (protocolo 1), foram submetidas à mesma análise por espectrometria de massas e os resultados obtidos são apresentados na tabela 11.

Com relação às subfrações MS1 e MS2, foram identificados peptídeos trípticos de PLA₂ homóloga à cadeia ácida da toxina *mojave*. Este resultado já era esperado visto que esta classe proteica foi identificada na fração bruta. Estas 2 subfrações foram eluídas no início do fracionamento, demonstrando ter uma afinidade menor pela coluna de troca catiônica, pois o pI de uma PLA₂ ácida é ácido (PONCE-SOTO et al., 2007) e, com o uso do tampão bicarbonato de amônio, que possui pH próximo à 8,0 (básico), as proteínas adquiriram maior número de cargas negativas havendo, desta maneira, pouca ou nenhuma interação pela resina da coluna de troca catiônica Mono-S, a qual é carregada negativamente (KOPACIEWICZ et al., 1983; JUNGBAUER e HAHN, 2009).

Ainda nestas subfrações MS1 e MS2, identificaram-se peptídeos trípticos de VEGFs de *Crotalus horridus* e *Crotalus oreganus helleri* demonstrando, desta forma, a ineficácia da escolha do protocolo de fracionamento, o qual não foi capaz de separar os componentes presentes na fração.

Na subfração MS3 foram identificados apenas peptídeos trípticos de VEGF com uma alta porcentagem de cobertura (68%) da sequência de VEGF do banco de dados (VEGF de *Crotalus oreganus helleri*), inclusive peptídeos trípticos da região amino-terminal da proteína, o que contribuiu para a confirmação de VEGF nesta amostra.

Tabela 11 - Identificação de proteínas por UPLC-ESI-QTOF das subfrações MS1, MS2 e MS3 obtidas na cromatografia da fração 23 em coluna de troca catiônica Mono-S.

Subfrações (Mono-S)	Classe de proteína (espécie)	Acesso	MM ^a Proteína (Da)	Cobertura	Peptídeos	MM ^a Peptídeo (Da)	Carga	Banco de dados ^b	Modificações
MS1	Fosfolipase A ₂ homóloga à cadeia ácida da toxina Mojave (<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>)	P18998	15,211	44,1%	GCYCGAGGQGWPDASDR LTGCDPTTDVYTYR	1.940,752 1.640,740	2+ 2+	A/B	C (Carbamidometil)
MS1	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Crotalus horridus</i>)	T1DGZ4	15,995	15,5%	~QVMPFMEVYER	1.426,626	2+	A	M (Oxidação) Q (Pyro-glu)
MS1	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Crotalus oreganus helleri</i>)	T1DE66	16,037	15,8%	~QVMPFMEVYER	1.410,631	2+	C	Q (Pyro-glu)
MS2	Fosfolipase A ₂ homóloga à crotoxina ácida (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	P08878	11,117	36,2%	QEDGEIVCGEDDPCGTQIE ~SGISYYSSYGCYCGAGGQG	2.713,096 2.948,251	3+ 3+	A/B	-
MS2	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Crotalus horridus</i>)	T1DGZ4	15,995	36,7%	~QVMPFMEVYER IEVMQFTEHTECECR	1.426,626 1.967,817	2+ 3+	A	M (Oxidação) Q (Pyro-glu) C (Carbamidometil)
MS2	Fosfolipase A ₂ homóloga à cadeia ácida da toxina Mojave (<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>)	P18998	15,211	19,3%	LTGCDPTTDVYTYR	1.660,740	2+	A	C (Carbamidometil)
MS3	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Crotalus horridus</i>)	T1DGZ4	16,497	36,7%	IEVMQFTEHTECECR ~QVMPFMEVYER	1.967,817 1.410,631	3+ 2+	A A	C (Carbamidometil) M (Oxidação) Q (Pyro-glu)
MS3	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Crotalus atrox</i>)	C0K3N3	16,126	43,7%	IEVMQFTEHTECECR EMLVSILDEYPSEVAH	1.967,817 1830.8710	3+ 2+	A A/B	C (Carbamidometil) D (Metil) Q (Pyro-glu)
MS3	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>)	B0VXV4	16,559	22,3%	IEVMQFTEHTECECR	1.967,817	3+	B	C (Carbamidometil) M (Oxidação)
MS3	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Crotalus oreganus helleri</i>)	T1DE66	16,037	68%	IEVMQFTEHTECECR IEVMQFTEHTECECRPGSTVN ~QVMPFMEVYER	1.426,626	3+	C	C (Carbamidometil) D (Metil) Q (Pyro-glu)

^aMM: Massa molecular ^bBanco de dados^b: (A) Snake venom (B) Snake (C) Crotalus

Como a presença do VEGF já havia sido afirmada nas subfrações QXL, por meio do ELISA com o anti-VEGF, elas também foram analisadas por espectrometria de massas. Os resultados obtidos estão listados na tabela 12.

Os espectros foram pesquisados da mesma forma como citado anteriormente, porém contra um banco de dados a mais (VEGF Crotalus), para que a busca pela proteína de interesse fosse mais precisa. Os resultados demonstraram identificação de peptídeos trípticos de VEGF em todas as subfrações analisadas e estes resultados corroboram com os encontrados no ELISA, em que o VEGF foi detectado em todas as subfrações QXL. Ainda, não houve identificação de peptídeos trípticos de outras proteínas e, para que isto fosse confirmado, foi realizada a busca em bancos de dados gerais e abrangentes (Snake e Snake venom). Com isto, pode-se afirmar novamente, que o protocolo 3 de fracionamento das três frações foi o mais adequado para a separação e purificação dos compostos.

As subfrações QXL5 (Fr.23) e QXL6 (Fr.24) foram analisadas pela técnica do sequenciamento amino-terminal por se apresentarem com bandas únicas nos géis e estes dados serão discutidos posteriormente.

Tabela 12 - Identificação de proteínas por UPLC-ESI-QTOF das subfrações obtidas pelo fracionamento das frações 24 e 25 em cromatografia de troca aniônica.

Fração/Subfração (QXL)	Classe de proteína (Espécie)	Acesso	MM ^a Proteína (Da)	Cobertura	Peptídeos	MM ^a Peptídeo (Da)	Carga	Banco de dados ^b	Modificações
24-QXL3	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (<i>Crotalus oreganus helleri</i>)	T1DE66	16,037	73,4%	KGTSKIEVMQFTEHTECECRPGST EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	2.811,262 3.157,594	4+ 4+	A/C A/C	M (Oxidação) C (Carbamidometil) C (Carbamidometil)
24-QXL3	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (<i>Crotalus atrox</i>)	C0K3N3	16,126	38,8%	EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	3.175,604	4+	B	M (Oxidação) C (Carbamidometil)
24-QXL4	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (<i>Crotalus oreganus helleri</i>)	T1DE66	16,037	34,5%	KGTSKIEVMQFTEHTECECRPGST	2.811,262	4+	A/C	C (Carbamidometil)
25-QXL3	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (<i>Crotalus oreganus helleri</i>)	T1DE66	16,037	38,8%	EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	3.175,604	4+	A/C	M (Oxidação) C (Carbamidometil)
25-QXL3	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (<i>Crotalus atrox</i>)	C0K3N3	16,126	38,8%	EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR	3.175,604	4+	B	M (Oxidação) C (Carbamidometil)
25-QXL4	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Crotalus oreganus helleri</i>)	T1DE66	16,037	27,3%	IEVMQFTEHTECECRPGST	2.309,971	3+	A/C	C (Carbamidometil)
25-QXL5	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Crotalus oreganus helleri</i>)	T1DE66	16,037	34,5%	KGTSKIEVMQFTEHTECECRPGST	2.811,262	4+	A/C	C (Carbamidometil)

^aMM: Massa molecular **Banco de dados^b**: (A) Snake (B) Snake venom (C) VEGF *Crotalus*

4.7.2. Peptide mass fingerprinting (PMF)

Uma das formas de se identificar proteínas em uma amostra é com o uso de técnica de espectrometria de massas e, dentre estas técnicas, se encontra o PMF. Neste ensaio são determinadas as massas moleculares de peptídeos de uma proteína, gerados pela ação proteolítica de uma enzima específica. O resultado obtido é também denominado de impressão digital da proteína (AEBERSOLD e GOODLETT, 2001).

Para peçonhas e venenos, esta técnica do PMF é abordada para obter uma noção geral de compostos que possam estar presentes na peçonha e em suas frações e subfrações. Em um estudo publicado em 2000 (STÖCKLIN et al., 2000), os autores utilizaram o PMF para diferenciar duas espécies da serpente *Naja* (*Naja naja* e *Naja kaouthia*), por meio da identificação de massas das toxinas e seu tempo de retenção na cromatografia de fase reversa. Neste estudo, foram utilizados o mapeamento de massas de toxinas específicas (*mass fingerprinting*) em conjunto com técnicas *off-line* e *on-line* de espectrometria de massas (LC-ESI-MS). Os resultados obtidos foram comparados com sequências de proteínas com padrões de massas moleculares já conhecidas. Por meio destas duas técnicas, os autores identificaram toxinas em comum e também novas toxinas presentes nas duas peçonhas, o que foi necessário para a diferenciação das mesmas (STÖCKLIN et al., 2000).

Desta forma, ensaios de PMF foram utilizados para que fosse possível um maior conhecimento sobre a composição das subfrações FR2 obtidas com o fracionamento das frações 24 e 25 e subfração FR3 do fracionamento da fração 23 em fase reversa (protocolo 2). As amostras foram submetidas à redução, alquilação e digestão com tripsina, de acordo com o item 3.8.3 e o PMF destas amostras foi obtido pelo MALDI-TOF, operado no modo positivo refletido, utilizando DHB como matriz. A análise do PMF foi realizada por meio de três programas em conjunto, o *FlexAnalysis 3.0*, *Sequence Editor* e *BioTools*.

Com os resultados obtidos, (Figs. 17, 18 e 19), nas três subfrações analisadas, identificaram-se peptídeos trípticos de VEGF com uma boa cobertura da sequência de dois VEGFs de duas subespécies diferentes (*Crotalus horridus* e *Crotalus atrox*). Ainda nesses PMFs foram identificados peptídeos trípticos de FGF com homologia ao FGF fragmento 10 de *Ophiophagus hannah*. Os dados de porcentagem da cobertura das sequências estão listados na tabela 13.

Figura 17. PMF da subfração FR3 da fração 23 após digestão com tripsina. Os PMFs foram obtidos por MALDI-TOF e analisados pelos programas *FlexAnalysis 3.0*, *Sequence Editor* e *BioTools*. (A) PMF obtido contra sequência de VEGF de *Crotalus horridus* (T1DGZ4); (B) PMF obtido contra sequência de VEGF de *Crotalus atrox* (C0K3N3) e (C) PMF obtido contra sequência de FGF10 de *Ophiophagus hannah* (V8P4H0). As sequências identificadas são apresentadas em vermelho e destacadas pelas barras em cinza e preto em cada PMF. Os possíveis sítios de glicosilação estão destacados em amarelo.

Figura 18. PMF da subfração FR2 da fração 24 após digestão com tripsina. Os PMFs foram obtidos por MALDI-TOF/TOF e analisados pelos programas *FlexAnalysis 3.0*, *Sequence Editor* e *BioTools*. **(A)** PMF obtido contra sequência de VEGF de *Crotalus horridus* (T1DGZ4); **(B)** PMF obtido contra sequência de VEGF de *Crotalus atrox* (C0K3N3) e **(C)** PMF obtido contra sequência de FGF 10 de *Ophiophagus hannah* (V8P4H0). As sequências identificadas são apresentadas em vermelho e destacadas pelas barras em cinza e preto em cada PMF. Os possíveis sítios de glicosilação estão destacados em amarelo.

Figura 19. PMF da subfração FR2 da fração 25 após digestão com tripsina. Os PMFs foram obtidos por MALDI-TOF/TOF e analisados pelos programas *FlexAnalysis 3.0*, *Sequence Editor* e *BioTools*. (A) PMF obtido contra sequência de VEGF de *Crotalus horridus* (T1DGZ4); (B) PMF obtido contra sequência de VEGF de *Crotalus atrox* (C0K3N3) e (C) PMF obtido contra sequência de FGF 10 de *Ophiophagus hannah* (V8P4H0). As sequências identificadas são apresentadas em vermelho e destacadas pelas barras em cinza e preto em cada PMF. Os possíveis sítios de glicosilação estão destacados em amarelo.

Tabela 13 – Cobertura das sequências encontradas no PMF das três subfrações analisadas por MALDI-TOF/TOF.

Fração bruta/subfração	VEGF do banco de dados	Cobertura da sequência (%)	FGF do banco de dados	Cobertura da sequência (%)
23-FR3	<i>Crotalus horridus</i>	20,5%	<i>Ophiophagus hannah</i>	75,8%
	<i>Crotalus atrox</i>	75,5%		
24-FR2	<i>Crotalus horridus</i>	45,3%	<i>Ophiophagus hannah</i>	30,4%
	<i>Crotalus atrox</i>	47,5%		
25-FR2	<i>Crotalus horridus</i>	42,7%	<i>Ophiophagus hannah</i>	20,8%
	<i>Crotalus atrox</i>	40,8%		

Com esses resultados dos PMFs, foi possível, por meio de mais uma técnica, afirmar a presença de VEGF nas três subfrações analisadas com uma alta cobertura da sequência, sendo que, a presença já havia sido confirmada pelo ensaio de ELISA. Adicionalmente, foi identificado FGF nas amostras, o que é inédito, pois até o momento esta proteína só havia sido identificada no estudo do genoma da serpente *O. hannah* (VONK et al., 2013). Além disso, confirmou-se a não resolução do fracionamento por meio de fase reversa, o que já havia sido constatado com os resultados de eletroforese.

4.7.3. Sequenciamento amino-terminal

As subfrações FR2 obtidas com o fracionamento das frações 24 e 25 e as subfrações 23-QXL5 e 24-QXL6, por apresentarem um bom grau de pureza de acordo com a eletroforese, foram escolhidas para serem sequenciadas por meio do sequenciamento amino-terminal seguindo a metodologia de degradação de Edman (EDMAN e BEGG, 1967), como descrito no item 3.8.4.

Este ensaio se dá pela reação do fenilisotiocianato com o peptídeo em condições alcalinas, o que leva à formação de um aduto de feniltiocarbamoil (PTC) no aminoácido amino-terminal. Em consequência, a ligação peptídica próxima a esse aduto é clivada, resultando em TFA anídrico, ocorrendo a remoção do aminoácido amino-terminal como um derivado anilintiazolinona. Este aminoácido é extraído por solventes orgânicos e, convertido em uma forma mais estável denominada de derivado de feniltiodantoína, em solução aquosa ácida, e por fim, este aminoácido é identificado e sequenciado (NELSON e COX, 2014).

Com os resultados obtidos (Tab.14) foi possível confirmar a presença de VEGF nas duas subfrações. Porém, apesar da eletroforese da subfração FR2 (fração 24) mostrar um bom grau de pureza, foi também identificado nesta, pela primeira vez, na peçonha de *C.d.c.*, o FGF, confirmando os ensaios de PMF. Este fator só havia sido identificado no genoma da serpente *O. hannah* (VONK et al., 2013).

Tabela 14 - identificação de proteínas por sequenciamento amino-terminal.

Fração/ Subfração	Proteína com homologia	N-terminal
		123456789012345678901234567890
24-FR2	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (<i>Crotalus horridus</i>)	QVMPFMEVYERSVCQTREMLVSILDEYPSE VAHLFRPSCVT
24-FR2	Fator de crescimento de fibroblasto fragmento 10 – FGF 10 (<i>Ophiophagus hannah</i>)	QLVEQRG---RETSESEGWRIDDGFTDGRT DGRTRPDRQT
25-FR2	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (<i>Crotalus horridus</i>)	QVMPFMEVYERSVCQTREMLV
25-FR2	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (aa 77 a 98) (<i>Crotalus horridus</i>)	TSKIEVMQFTEHTECECRMN
25-FR2	Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF (aa 102 a 117) (<i>Crotalus horridus</i>)	KRKPEEGEPRAKFPFV
25-FR2	Fator de crescimento de fibroblasto fragmento 10 – FGF 10 (<i>Ophiophagus hannah</i>)	QLVEQRG---RETSESEGWRI
25-FR2	Fosfolipase A ₂ básica – PLA ₂ (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	SLSTYKNEYMFYPKSRCRRPS
23-QXL5	Fosfolipase A ₂ homóloga à cadeia ácida da toxina Mojave (<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>)	SLVEFETLMMKIAGRSGISYSSYGCYCGA GGQGRPRDFADRCFF
24-QXL6	Fosfolipase A ₂ homóloga à crotoxina ácida – crotopotina (<i>Crotalus simus tzabcan</i>)	SLVEFETLMMIIAGRSGISY-S-YGCYCG- G

–: representa aminoácido cuja identificação não foi possível.

Além dos dois fatores de crescimento, na subfração FR2 (fração 25) ainda foram encontradas sequências de fragmentos de VEGF, sendo que um destes fragmentos corresponde ao final da sequência (porção C-terminal). A hipótese levantada para explicar a presença destes fragmentos é que o VEGF pode ter sofrido proteólise parcial pelas enzimas da peçonha, visto que a mesma é rica em serinoproteases e metaloproteases (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Estes fragmentos permaneceram agregados ao dímero VEGF mesmo após o fracionamento da peçonha por cromatografia de fase reversa. Além disto, é possível observar que esta subfração se encontra contaminada com PLA₂ básica, confirmando mais uma vez a ineficiência deste protocolo de fracionamento.

Com relação às sequências de FGF encontradas nas subfrações, observa-se que os aminoácidos correspondentes às posições 8, 9 e 10 da sequência estão representados por um traço, pois, durante o sequenciamento, apareceram com baixo sinal e desta forma não foi possível afirmar a identidade dos mesmos. Por homologia com a sequência de FGF de *Ophiophagus hannah* os aminoácidos que corresponderiam à estas posições seriam MEK (metionina, ácido glutâmico e lisina).

Nas subfrações 24-QXL6 e 23-QXL5 foi identificada uma PLA₂ nova homóloga à crotoxina ácida que ainda não havia sido encontrada na peçonha de *C.d.c.*

4.7.4. Determinação da massa molecular do VEGF

Três análises das subfrações QXL realizadas neste trabalho confirmam serem compostas por VEGFs: as eletroforeses, o ELISA e as análises por espectrometria de massas destas amostras digeridas. Desta forma, para que as massas moleculares pudessem ser confirmadas, estas amostras foram submetidas à uma cocristalização com a matriz ácido sinapínico e posteriormente, analisadas por um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF e os espectros obtidos são apresentados na figura 20. Pode-se observar que as 6 subfrações possuem picos majoritários de massas moleculares aproximadas entre 22 e 25 kDa e estes resultados corroboram com massas moleculares de outros VEGFs de peçonhas de serpentes (KOMORI et al., 1999; GASMI et al., 2002; YAMAZAKI, Y. et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2004; CHEN et al., 2005; ALOUI et al., 2009; NAKAMURA et al., 2014; ZHONG et al., 2015).

Para todas as amostras, as análises foram realizadas utilizando faixas moleculares entre 5 e 50 kDa sendo possível determinar contaminantes, caso houvessem. É possível observar nos 6 espectros, massas moleculares correspondentes à metade da massa da proteína, os quais podem indicar a presença do íon do pico majoritário com dupla carga, uma vez que esse fenômeno é observado em análises de massas íntegras de proteínas por meio de ionização por MALDI (BEAVIS e CHAIT, 1990). Ainda, é possível verificar que nas subfrações QXL3, 4 e 5 da fração 25 (Fig. 20 – D, E e F) picos de baixa intensidade com massas moleculares de 44947.5, 44223.8 e 44843.6 Da. Essas massas moleculares também são observadas nas eletroforeses destas amostras, podendo corresponder ao dímero do VEGF com uma carga.

No espectro da subfração QXL4 da fração 24 (Fig. 20 – C) 4 picos de 22075.3, 22445.3, 23892.5 e 24268.4 Da com diferenças de 370 e 375.9 Da entre eles, sendo o pico de 23892.5 Da o majoritário, demonstrando que esta subfração é composta por espécies moleculares distintas, podendo ser isoformas de VEGFs.

Resultado semelhante foi obtido com a análise de dois VEGFs de *Macrovipera lebetina*, o IC1 e IC2. Nessa análise, os autores determinaram suas massas moleculares por meio de cocristalização com ácido sinapínico e análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Para o IC1 obtiveram 4 picos de massas moleculares (23650.02, 24306.46, 24589.65 e 24718.60) com diferenças de 128.95, 285.14 e 656.46 Da. Sabendo-se que VEGFs são diméricos, os autores supõem que estas diferenças em Da são consistentes com diferenças de pelo menos 3 aminoácidos, explicando a razão de não estarem separados no espectro e poderem ser isoformas. Para o IC2, o mesmo fenômeno foi observado, com a presença de 3 picos com massas moleculares de 25101.12, 25194.98 e 25298.81 Da (ALLOUI et al., 2009).

Outro resultado semelhante foi com o VEGF HF de *Vipera aspis aspis*. Esse VEGF teve sua massa molecular obtida por espectrometria de massas por meio da técnica de ESI. Neste estudo, a massa molecular determinada foi a do pico majoritário de 25071.1 Da, porém, outros 3 picos de massas moleculares de 25168.2, 23752.2 e 23882.0 Da também foram observados no espectro e os autores sugerem ser o VEGF clivado devido à ação de proteases que compõem a peçonha e esta clivagem poderia ter ocorrido durante o processo de purificação do HF (KOMORI et al., 1999).

Os VEGFs de peçonhas de serpentes possuem uma alta similaridade e, portanto, os resultados das massas moleculares encontradas neste trabalho corroboram com os dados de literatura. As massas moleculares de cada subfração ficaram determinadas como sendo o pico majoritário de cada espectro obtido.

Estes resultados indicam que as frações QXL3 das frações 23 (MM 25707,5 Da) e 24 (MM 25705,0) devem ser a mesma molécula. As demais amostras analisadas possuem massas moleculares menores e podem ser isoformas do VEGF da fração 23 ou podem corresponder a dímeros contendo uma das cadeias parcialmente clivada, de acordo com dados obtidos no sequenciamento amino-terminal da FR2 da fração 25 (Tab. 14).

Figura 20. Massa molecular das subfrações determinadas por MALDI-TOF. As amostras foram analisadas no espectrômetro Ultraflex II e o espectro de massas foi obtido no modo linear positivo. As amostras foram cocristalizadas com a matriz de ácido sinapínico. (A) Subfração QXL3 da Fração 23; (B) Subfração QXL3 da Fração 24; (C) Subfração QXL4 da Fração 24; (D) Subfração QXL3 da Fração 25; (E) Subfração QXL4 da Fração 25 e (F) Subfração QXL5 da Fração 25.

4.7.5. Análise das sequências obtidas

As frações 23, 24 e 25 e suas subfrações, obtidas com os três protocolos cromatográficos, foram analisadas por três diferentes ensaios (MS/MS, PMF e sequenciamento amino-terminal) e vários fragmentos foram identificados. As sequências de aminoácidos obtidas de cada fração foram alinhadas com os dois svVEGFs com os quais os fragmentos mostraram maior homologia: o VEGF de *Crotalus horridus* (T1DGZ4) e VEGF de *Crotalus atrox* (C0K3N3). Por meio desse alinhamento foi possível deduzir prováveis sequências para o *Cdc*VEGF e confirmar a existência de pelo menos duas isoformas de svVEGFs presentes nas frações estudadas. Os alinhamentos dos fragmentos de VEGF das frações 23, 24 e 25 estão apresentados nas figuras 21, 22 e 23, respectivamente.

Esses resultados mostram a elevada homologia dos *Cdc*VEGFs com o VEGF de *Crotalus horridus* e o VEGF de *Crotalus atrox*. O VEGF de *C. horridus* não possui os resíduos de aminoácidos nas posições 95, 96 e 97 do alinhamento (destacados em cinza), o que também ocorre nos fragmentos de VEGF das frações 24 e 25 (Figs. 22 e 23). Porém, no VEGF de *C. atrox* e nos fragmentos de VEGF da fração 23 esses resíduos estão presentes (Fig. 21), o que demonstra uma diferença estrutural entre os VEGFs identificados nessas frações. Estes resultados confirmam, portanto, a presença de pelo menos dois *Cdc*VEGFs na peçonha de *C. d. collilineatus*.

As coberturas das sequências dos *Cdc*VEGFs identificados nas frações 23, 24 e 25 foram de 90,10%, 97,26% e 98,17%, respectivamente. Com base nestas análises, o *Cdc*VEGF da fração 25 teve sua sequência quase que completamente determinada. Esses dados das coberturas foram obtidos considerando as prováveis sequências (100%) propostas para os *Cdc*VEGFs (Figs. 21, 22 e 23) e os aminoácidos destacados em cinza como ainda não determinados. Estes fragmentos destacados em cinza foram adicionados na sequência proposta por homologia aos VEGF de outras serpentes.

As diferenças observadas entre a massa teórica da sequência proposta e a massa íntegra obtida com as análises de cada subfração pelo MALDI-TOF (Fig. 20) podem ser explicadas por clivagens proteolíticas de fragmentos de um ou dos dois monômeros do dímero. A identificação de dois fragmentos internos da molécula no sequenciamento amino-terminal da fração 25-FR2 (Tab. 14) suporta esta hipótese. A presença ou não de glicosilação e a formação de homodímeros ou heterodímeros também podem causar alterações na massa molecular dos *Cdc*VEGFs. Estas alterações pós-traducionais podem justificar as massas moleculares distintas observadas nos espectros de massas (Fig. 20).

	10	20	30	40	50	60
T1DGZ4	QVMPFMEVYERSVCQ	TREMLVSI	LDEHPDEVAHLFRPSC	VTVLRCGGCCTDES	LTCTATG	
C0K3N3	QAMSFMEVYERSVCQ	TREMLVSI	LDEYPSEVAHLFRPSC	VTVLRCGGCCTDES	LTCTATG	
PMF 23-FR3-f1	-----	EMLVSI	LDEYPSEVAHLFRPSC	VTVLRCGGCCTDES	LTCTATG	
PMF 23-FR3-f2	-----	-----	-----	-----	-----	
MS/MS 23-MS3-f1	-----	-----	-----	-----	-----	
MS/MS 23-MS3-f2	-----	-----	-----	-----	-----	
MS/MS 23-MS1	QVMPFMEVYER	-----	-----	-----	-----	
MS/MS 23-MS2	QVMPFMEVYER	-----	-----	-----	-----	
MS/MS 23-MS3	QVMPFMEVYER	-----	-----	-----	-----	
Consensus	Q M FMEVYER	-----	-----	-----	-----	
Prim. cons.	QVMPFMEVYERSVCQ	TREMLVSI	LDEYPSEVAHLFRPSC	VTVLRCGGCCTDES	LTCTATG	
	70	80	90	100	110	120
T1DGZ4	KRSVGREIMRVD	PHKGTSKIEVMQFTEHTECECR	-----	RMNNKKHKRKP	EEGEPRAKFPFV	
C0K3N3	KRSVGREIMRVD	PRKGTSKIEVMQFTEHTECECR	PRSTVN	NGKRKKNPKEGE	PRAKFPPLV	
PMF 23-FR3-f1	KRSVGR	-----	-----	-----	-----	
PMF 23-FR3-f2	-----	VDPRKGT	SKIEVMQFTEHTECECR	PRSTVN	NGKRKKNPKEGEPR	-----
MS/MS 23-MS3-f1	-----	-----	IEVMQFTEHTECECR	-----	-----	
MS/MS 23-MS3-f2	-----	-----	IEVMQFTEHTECECR	PGSTVN	-----	
MS/MS 23-MS1	-----	-----	-----	-----	-----	
MS/MS 23-MS2	-----	-----	-----	-----	-----	
MS/MS 23-MS3	-----	-----	-----	-----	-----	
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	
Prim. cons.	KRSVGREIMRVD	PRKGTSKIEVMQFTEHTECECR	PRSTVN	NGKRKKNPKEGE	PRAKFP2V	

Sequência do *Cdc*VEGF da fração 23:

QVMPFMEVYERSVCQ TREMLVSI LDEYPSEVAHLFRPSCVTVLRCGGCCTDES LTCTATG KRSVGREIMR
VDPRKGTSKIEVMQFTEHTECECRPRSTVNNGKRKKNPKEGEPRAKFPPLV

Massa molecular teórica: 27.269,42 Da

Figura 21. Alinhamento dos fragmentos de VEGF da fração 23. Alinhamento dos fragmentos de VEGF identificados na fração 23 com dois svVEGFs: T1DGZ4 (VEGF de *Crotalus horridus*) e C0K3N3 (VEGF de *Crotalus atrox*). Em azul: fragmentos obtidos por PMF; em laranja: fragmentos obtidos do sequenciamento por MS/MS. Os aminoácidos idênticos em todas as sequências foram apresentados em magenta. Os resíduos de cisteína estão destacados em amarelo. Em cinza estão destacados os resíduos de aminoácidos que não foram identificados nos ensaios realizados com as amostras que contêm VEGF. O alinhamento foi realizado pelo programa *Multalin*. São também apresentadas a provável sequência do VEGF e a correspondente massa molecular. Os segmentos destacados em cinza foram adicionados apenas por homologia aos VEGF de outras serpentes.

	10	20	30	40	50	60
T1DGZ4	QVMPFMEVYERSVCQ	TREMLVSILDEHPDEVAHLFRPSCVT	TVLRCGGCCTDES	LTCTATG		
C0K3N3	QAMSFMEVYERSVCQ	TREMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVT	TVLRCGGCCTDES	LTCTATG		
NT 24-FR2	QVMPFMEVYERSVCQ	TREMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVT	-----	-----	-----	-----
MS/MS 24-QXL3-F2	-----	-----	EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVT	TVLR	-----	-----
PMF 24-FR2-f1	-----	SVCQ	TREMLVSILDEHPDEVAHLFR	-----	-----	-----
PMF 24-FR2-f2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MS/MS 24-QXL3-f1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MS/MS 24-QXL4-f1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consensus		EMLVSILDE	P	EV	AHLFR	
Prim.cons.	QVMPFMEVYERSVCQ	TREMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVT	TVLRCGGCCTDES	LTCTATG		
	70	80	90	100	110	120
T1DGZ4	KRSVGREIMRVD	PHKGT	SKIEVMQFTEHTECECR	---	RMNNKKHKR	KPEEGEPRAKFPFV
C0K3N3	KRSVGREIMRVD	PRKGT	SKIEVMQFTEHTECECR	PR	STVNNGKRKK	NPKEGEPRAKFP
NT 24-FR2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MS/MS 24-QXL3-F2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PMF 24-FR2-f1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PMF 24-FR2-f2	-----	-----	GTSKIEVMQFTEHTECECR	---	RMNNKKHKR	-----
MS/MS 24-QXL3-f1	-----	-----	KGTSKIEVMQFTEHTECECR	---	PGST	-----
MS/MS 24-QXL4-f1	-----	-----	KGTSKIEVMQFTEHTECECR	---	PGST	-----
Consensus			GTSKIEVMQFTEHTECECR			
Prim.cons.	KRSVGREIMRVD	P2KGT	SKIEVMQFTEHTECECR	PRS	22NNKKHKR	2P2EGEPRAKFP2V

Sequência do *Cdc* VEGF da fração 24:

QVMPFMEVYERSVCQ TREMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR CGGCCTDES LTCTATG KRSVGREIMRVDPR
 KGTSKIEVMQFTEHTECECR --- RMNNKKHKR NPKEGEPRAKFP

Massa molecular teórica: 26.923,18 Da

Figura 22. Alinhamento dos fragmentos de VEGF da fração 24. Alinhamento dos fragmentos de VEGF identificados na fração 24 com dois svVEGFs: T1DGZ4 (VEGF de *Crotalus horridus*) e C0K3N3 (VEGF de *Crotalus atrox*). Em azul: fragmentos obtidos por PMF; em laranja: fragmentos obtidos do sequenciamento por MS/MS e em roxo: fragmentos obtidos pelo sequenciamento amino-terminal (NT). Os aminoácidos idênticos em todas as sequências foram apresentados em magenta. Os resíduos de cisteína estão destacados em amarelo. Em cinza estão destacados os resíduos de aminoácidos que não foram identificados nos ensaios realizados com as amostras que contêm VEGF. O alinhamento foi realizado pelo programa Multalin. São também apresentadas a provável sequência do VEGF e a correspondente massa molecular. Os segmentos destacados em cinza foram adicionados apenas por homologia aos VEGF de outras serpentes.

	10	20	30	40	50	60
T1DGZ4	QVMPFMEVYERSVCQTREMLVSILDEHPDEVAHLFRPSCVTVLRCGGCCTDES	LTCTATG				
C0K3N3	QAMSFMEVYERSVCQTREMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLRCGGCCTDES	LTCTATG				
PMF 25-FR2-f1	-----EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLRCGGCCTDES	LTCTATG				
MS/MS 25-QXL3	-----EMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLR-----					
NT 25-FR2-f1	QVMPFMEVYERSVCQTREMLV-----					
NT 25-FR2-f2	-----					
PMF 25-FR2-f1	-----					
MS/MS 25-QXL4	-----					
NT 25-FR2-f3	-----					
Consensus						
Prim.cons.	QVMPFMEVYERSVCQTREMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLRCGGCCTDES	LTCTATG				
	70	80	90	100	110	120
T1DGZ4	KRSVGREIMRVDPHKGTSKIEVMQFTEHTECECR---	RMNNKKHKRKPEEGEPRAKFPFV				
C0K3N3	KRSVGREIMRVDPRKGTSKIEVMQFTEHTECECRPRSTVNNNGKRKKNPKEGEPRAKFP	LV				
PMF 25-FR2-f1	KRSVGR-----					
MS/MS 25-QXL3	-----					
NT 25-FR2-f1	-----					
NT 25-FR2-f2	-----TSKIEVMQFTEHTECECR---	RMN-----				
PMF 25-FR2-f1	-----GTSKIEVMQFTEHTECECR---	RMNNKKHKR-----				
MS/MS 25-QXL4	-----KGTSKIEVMQFTEHTECECR---	PGST-----				
NT 25-FR2-f3	-----	-----KRKPEEGEPRAKFPFV				
Consensus						
Prim.cons.	KRSVGREIMRVDPRKGTSKIEVMQFTEHTECECRPRSRMNNKKHKRKPEEGEPRAKFPFV					

Sequência do *Cdc*VEGF da fração 25:

QVMPFMEVYERSVCQTREMLVSILDEYPSEVAHLFRPSCVTVLRCGGCCTDES

LTCTATGKRSVGREIMRVDPRK

GTSKIEVMQFTEHTECECR---RMNNKKHKRKPEEGEPRAKFPFV

Massa molecular teórica: 25.028,1 Da

Figura 23. Alinhamento dos fragmentos de VEGF da fração 25. Alinhamento dos fragmentos de VEGF identificados na fração 25 com dois svVEGFs: T1DGZ4 (VEGF de *Crotalus horridus*) e C0K3N3 (VEGF de *Crotalus atrox*). Em azul: fragmentos obtidos por PMF; em laranja: fragmentos obtidos do sequenciamento por MS/MS e em roxo: fragmentos obtidos pelo sequenciamento amino-terminal (NT). Os resíduos de cisteína estão destacados em amarelo. Em cinza estão destacados os resíduos de aminoácidos que não foram identificados nos ensaios realizados com as amostras que contêm VEGF. O alinhamento foi realizado pelo programa *Multalin*. São também apresentadas a provável sequência do VEGF e a correspondente massa molecular. Os segmentos destacados em cinza foram adicionados apenas por homologia aos VEGF de outras serpentes.

4.8. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para verificar o reconhecimento do VEGF pelo soro anticrotálico comercial

Sabe-se que os antivenenos comerciais no Brasil, incluindo o soro anticrotálico, são produzidos através de imunizações de cavalos com doses não-letais de *pool* de peçonhas e o do Instituto Butantan tem validação experimental como seguro (BUTANTAN, 2016). Assim, foi questionado se este antiveneno apresentaria anticorpos específicos capazes de reconhecer/neutralizar o VEGF da peçonha. Após a caracterização estrutural do VEGF foi realizado um ensaio imunoenzimático para avaliar o reconhecimento do VEGF pelo soro anticrotálico comercial. As amostras de escolha foram: o *pool* de peçonhas de *C. d. collilineatus*, as três frações brutas (23, 24 e 25) e as 6 subfrações QXL contendo VEGFs. Os VEGFs presentes nas 6 subfrações foram denominados de *Cdc*VEGFs.

Os resultados obtidos (Fig. 24) confirmaram que o soro anticrotálico comercial é capaz de reconhecer com alta afinidade os *Cdc*VEGFs presente nas 6 subfrações QXL testadas. O soro anticrotálico é produzido utilizando, para a imunização dos animais, um *pool* de peçonhas de diferentes subespécies do mesmo gênero (*C. d. terrificus*, *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*). Ou seja, a peçonha da espécie deste estudo (*C. d. collilineatus*) foi utilizada na produção. Espera-se que os animais produzam maior título de anticorpos para compostos predominantes nestas peçonhas, como por exemplo, a crotoxina e a fosfolipase A₂, que são as mais abundantes em todas as subespécies do gênero *Crotalus* (PARRA et al., 2009).

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que o *Cdc*VEGF, apesar de não ser muito representativo na peçonha, é altamente imunogênico, ativando efetivamente o sistema imune do cavalo, o que resulta em alta produção de anticorpos. O soro também foi capaz de reconhecer com alta afinidade o *pool* de peçonhas *C. d. collilineatus*, o que já era esperado visto que esta peçonha é utilizada para imunização dos cavalos. Também, é possível notar o reconhecimento do soro, com alta afinidade pelas 3 frações brutas, o que também já era esperado, pois elas são compostas de VEGF e PLA₂, a qual é abundante na peçonha e, portanto, reconhecida com alta afinidade pelo soro anticrotálico.

Conclui-se deste ensaio que o VEGF é imunogênico e será efetivamente neutralizado em casos envenenamentos em que a terapia envolva o uso de soro anticrotálico.

Figura 24. Reconhecimento do CdcVEGF pelo soro anticrotático comercial. As amostras (2 µg) foram utilizadas para sensibilizar os poços e, posteriormente, foram incubadas com soro anticrotático comercial, a fim de avaliar a capacidade do soro em reconhecê-las. Anticorpos policlonais anti-cavalo conjugados com peroxidase foram usados para o ensaio ELISA, tendo como controle positivo (+) poços sensibilizados com soro anticrotático e como controle negativo (-), poços não sensibilizados. Os resultados expressam as médias $\pm$ DP, os quais foram analisados por ANOVA e pós-teste de Dunnet's ($n = 3$). *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo.

4.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para verificar a presença de FGF

Devido à identificação de FGF nas subfrações FR2 das frações 24 e 25 por meio de sequenciamento aminoterminal e PMF, optou-se por confirmar a presença dessa molécula nas subfrações QXL, peçonha e frações 23, 24 e 25 utilizando ELISA.

Nas concentrações testadas (Fig. 25) não foi possível verificar o reconhecimento de FGF nas amostras pelo anticorpo específico anti-FGF. Isto se explica, provavelmente, pela baixa quantidade de FGF presente nas amostras, visto que, foi possível identificá-lo nas subfrações FR2 das frações 24 e 25 pelo PMF e pelo sequenciamento amino-terminal.

Além disso, o anticorpo anti-FGF utilizado nesse ensaio é específico para o FGF 10 humano recombinante (controle positivo) e pode não ter reconhecido o FGF da peçonha. Apesar desse FGF ter uma homologia de 43,62 % com o FGF 10 da serpente *O. hannah* (VONK et al., 2013), com o qual os fragmentos das FR2s apresentaram similaridade de sequência, eles podem ter epitopos imunogênicos distintos, impossibilitando o reconhecimento pelo anti-FGF utilizado.

Figura 25. Detecção de FGF nas amostras por ELISA indireto utilizando anticorpo anti-FGF. As amostras foram incubadas com anticorpo anti-FGF e, posteriormente, com anticorpos policlonais anti-coelho marcados com peroxidase, para a realização do ELISA, tendo como controle positivo (+) poços sensibilizados com FGF comercial humano recombinante e como controle negativo (-), poços não sensibilizados. Os resultados expressam as médias $\pm$ DP, os quais foram analisados por ANOVA e pós-teste de *Dunnet's* ($n = 3$). *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo.

4.10. Caracterização funcional do *Cdc*VEGF

Com a confirmação da presença de VEGF nas 6 subfrações QXL das três frações brutas (23-QXL3, 24-QXL3, 24-QXL4, 25-QXL3, 25-QXL4 e 25-QXL5), essas 6 amostras foram as escolhidas para os ensaios subsequentes, a fim de caracterizar funcionalmente o *Cdc*VEGF.

Nos três ensaios funcionais, as ações das 6 amostras foram comparadas com as ações do VEGF recombinante de serpente comercial, o mesmo utilizado para os ensaios do ELISA.

4.10.1. Ensaio de angiogênese *in vitro*

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma vasculatura pré-existente e envolve células de suporte com ações específicas principalmente na ativação, migração e na proliferação de células endoteliais vasculares. Este evento é extremamente importante para o processo biológico durante toda a vida e, também, em processos patológicos, como o câncer (CEBE-SUAREZ et al., 2006).

Fatores de crescimento, mais especificamente os VEGFs, são as moléculas chave para induzir a angiogênese. São poucos os relatos que descrevem essa atividade para svVEGFs. Em um destes trabalhos, os pesquisadores observaram a ação do ICPP (*Vipera lebetina*) na diferenciação e proliferação de células endoteliais em concentração de 10 ng/mL, e esta foi mais intensa do que a do VEGF-A₁₆₅ na mesma concentração (GASMI et al., 2002). Em um outro estudo, o grupo empregou outra metodologia utilizando membrana corioalantoica (CAM) para avaliar a capacidade do Pm-VEGF em induzir a angiogênese. Neste estudo verificou-se a necessidade de uma alta quantidade do Pm-VEGF (200 ng/filtro) para induzir a neovascularização na membrana, enquanto que o VEGF-A₁₆₅ apresentou o mesmo efeito com apenas 20 ng/filtro, demonstrando uma fraca ação angiogênica do Pm-VEGF (CHEN et al., 2005).

Assim, para que o *Cdc*VEGF isolado neste trabalho pudesse ser caracterizado quanto à sua capacidade de induzir a angiogênese, uma das principais funções de um VEGF, utilizou-se a técnica de formação de tubos em Matrigel® a partir de células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs).

As 6 subfrações obtidas a partir das três frações brutas foram analisadas neste ensaio e é possível observar na figura 26, a promoção da angiogênese por todas as amostras testadas. Ainda, pode-se afirmar que a subfração 24-QXL3 induziu uma maior formação de vasos, sendo tão potente quanto o VEGF recombinante e ainda mais potente que o bFGF (controle +), um importante fator angiogênico.

Esta maior potência pode ser explicada pelo fato de ter sido identificado FGF na fração 24 por meio do sequenciamento amino-terminal e, visto que VEGFs e FGFs atuam em sinergismo na angiogênese (GERWINS et al., 2000), a ação dessa subfração pode ter sido potencializada pela presença do FGF, mesmo que ele não tenha sido identificado por espectrometria de massas e esteja em baixas quantidades a ponto de não ter sido identificado no ELISA com anti-FGF. As outras subfrações testadas induziram a formação dos vasos, porém, com menor eficiência, confirmando mais uma vez, a presença do *Cdc*VEGF em todas as amostras.

Figura 26. Ensaio de angiogênese *in vitro*. Células HUVECs foram previamente incubadas por 30 min a 37°C com meio de cultura (controle -), bFGF (controle +), VEGF recombinante e as 6 subfrações QXL. Todas as amostras foram testadas a uma concentração de 20 ng/mL. **A:** gráfico plotado com o número de vasos formados por cada amostra. Os resultados expressam as médias $\pm$ DP, os quais foram analisados por ANOVA e pós-teste de Bonferroni's ($n = 3$). *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo (-); ** $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo (-); * $p < 0,1$ quando comparado ao controle negativo (-). **B:** fotografia dos vasos formados: **(A)** meio de cultura (controle -); **(B)** meio de cultura + bFGF; **(C)** meio de cultura + VEGF recombinante; **(D)** meio de cultura + 24-QXL3; **(E)** meio de cultura + 24-QXL4; **(F)** meio de cultura + 23-QXL3; **(G)** meio de cultura + 25-QXL3; **(H)** meio de cultura + 25-QXL4 e **(I)** meio de cultura + 25-QXL5.

4.10.2. Ensaio de migração celular *in vitro*

Como já dito anteriormente, VEGFs são moléculas envolvidas com fenômenos como angiogênese, permeabilidade vascular/vasodilatação, proliferação e migração de células endoteliais. Ainda, são capazes de induzir migração de células sanguíneas, como células mononucleares e macrófagos (FERRARA e DAVIS-SMYTH, 1997). Suas ações são decorrentes de sua ligação e ativação à receptores do tipo tirosina quinase para VEGF (VEGFR). Relata-se que após a ligação/ativação do VEGF, o receptor VEGFR-1 medeia a organização de vasos sanguíneos e atua na migração de monócitos/macrófagos por meio de quimiotaxia (BARLEON et al., 1996). O VEGFR-2 também possui a propriedade de induzir migração de células, porém, demonstra ter essa ação apenas para células endoteliais (FERRARA et al., 2003).

Com base nestas considerações, foi avaliada a possível ação dos *Cdc*-VEGFs na indução da migração *in vitro* de células mononucleares humanas pelo ensaio de quimiotaxia em câmara de *boyden*. Este ensaio analisa as respostas quimiotáticas induzidas por moléculas, ou seja, a migração direcionada de células em resposta a um quimioatraente (BOYDEN, 1962).

Sabe-se que células mononucleares migram em resposta a um estímulo inflamatório (quimioatrato) durante uma resposta imune (SCHRATZBERGER et al., 1996). Uma resposta biológica específica dessas células é a sua migração em resposta ao VEGF-A. Esse evento se dá quando ocorre a ligação e ativação do VEGFR-1 pelo VEGF-A, resultando no recrutamento das células mononucleares em tecidos normais e transformados onde existe produção de VEGF-A, além de outros fatores angiogênicos. Ainda, há a expressão do VEGFR-1 pelas células, amplificando a cascata de eventos que resultam na angiogênese (BARLEON et al., 1996; FERRARA, 2004).

Esta ação também já foi observada para um svVEGF. Chen et al. (2005) verificaram em seu estudo que o VEGF clonado e expresso (Pm-VEGF) da peçonha da serpente *Protobothrops mucrosquamatus* induziu a migração de monócitos de maneira dose-dependente e constataram que essa ação se deu pela ligação e ativação do VEGFR-1 pelo Pm-VEGF.

A análise dos resultados obtidos neste trabalho (Fig. 27) mostra que as subfrações testadas não induziram a migração das células por quimiotaxia. No entanto, o controle positivo utilizado no ensaio (fMLP), um potente quimioatraente para células mononucleares, induziu uma migração significativa. Porém, só foi possível observar esse efeito em dois dos ensaios realizados (Figs 27 E e 27 F), nos quais, o controle negativo (células mononucleares e meio de cultura) mostrou os resultados esperados para este tipo de estudo.

Todas as subfrações testadas mostraram migração celular semelhante à do VEGF recombinante testado e não foram significativamente diferentes do controle negativo. Isso pode ser explicado pelas baixas concentrações testadas dos VEGFs. Especula-se também que a migração das células mononucleares pelos *Cdc*VEGFs possa ter ocorrido por quimiotaxise, uma reação da célula na qual a velocidade, a frequência da locomoção e/ou mudança na direção da migração é aleatória. Esse tipo de migração pode ser influenciado por substâncias químicas presentes no ambiente em que a célula se encontra e não por um estímulo, como é o caso dos quimioatraentes (KELLER et al., 1977).

Relata-se em literatura que as respostas de migração celular são mediadas por receptores acoplados à proteína Gi (SONG e ZHONG, 2000), o que reforça o fato do *Cdc*VEGF não ter induzido a migração celular das células mononucleares, visto que essas proteínas atuam em receptores do tipo tirosina quinase.

Devido à complexidade da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*, e, portanto, devido ao acidente crotálico ser ainda uma doença negligenciada, existe um crescente interesse em elucidar com precisão os compostos e suas funções na peçonha assim como no envenenamento.

O presente estudo fez uso de diferentes abordagens cromatográficas, diversificadas estratégias para elucidação estrutural, de forma que a purificação do *Cdc*VEGF foi concluída.

Os resultados demonstraram uma alta complexidade das frações 23, 24 e 25 evidenciando que, somente após a terceira abordagem cromatográfica, foi possível o fracionamento e purificação dos componentes presentes nelas. As três frações demonstraram ser compostas por VEGF e apenas nas frações 24 e 25 identificou-se um FGF, resultado extremamente inovador, pois, até o momento, nenhum FGF foi isolado de peçonhas de serpentes. Ainda, na fração 23 foi identificada uma PLA₂ inédita. Todos esses componentes já foram identificados previamente nesta peçonha, porém, ainda não haviam sido isolados.

O uso da técnica do ELISA com anticorpo anti-VEGF-F foi fundamental para a rastreabilidade do composto nas 43 frações obtidas com o fracionamento da peçonha e, durante as etapas cromatográficas para facilitar a identificação do VEGF nas subfrações e auxiliar para uma melhor purificação.

Figura 27. Ensaio de migração celular *in vitro*. As 6 subfrações foram adicionadas ao compartimento de baixo de uma câmara de boyden nas concentrações de 20 e 180 ng/mL. No compartimento de cima, foram plaqueadas 5×10^3 células/poço dos monócitos humanos. Controle (-): 5×10^3 células/poço de monócitos humanos + meio de cultura; Controle (+): 0,001 μ M de fMLP. (A) VEGF recombinante e 23-QXL3; (B) VEGF recombinante e 24-QXL3; (C) VEGF recombinante e 24-QXL4; (D) VEGF recombinante e 25-QXL3; (E) VEGF recombinante e 25-QXL4 e (F) VEGF recombinante e 25-QXL5. Os resultados expressam as médias $\pm$ DP, os quais foram analisados por ANOVA e pós-teste de *Bonferroni's* ($n = 3$). ** $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo e # $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo.

5. Conclusões

Apesar da heterogeneidade do *pool* das peçonhas, das frações brutas e das subfrações contendo o *Cdc*VEGF, o soro anticrotálico comercial do Instituto Butantan foi capaz de reconhecê-lo com alta afinidade demonstrando que este é imunogênico.

As análises dos ensaios funcionais realizados demonstraram a potente ação angiogênica em células HUVEC do *Cdc*VEGF, demonstrando que a molécula pode ser utilizada como ferramenta molecular para estudos que envolvam VEGFs. Ainda, neste trabalho foi desenvolvido um novo protocolo de isolamento de VEGF e realizada a sua caracterização estrutural parcial.

6. Referências

REFERÊNCIAS¹

- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D. R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem Rev**, v. 101, n. 2, p. 269-95, 2001.
- 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.
- ALoui, Z. et al. Novel svVEGF isoforms from *Macrovipera lebetina* venom interact with neuropilins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 389, n. 1, p. 10-5, 2009.
- ANCELIN, M. et al. Vascular endothelial growth factor VEGF₁₈₉ induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. **Lab Invest**, v. 84, n. 4, p. 502-12, 2004.
- ARAÚJO, L. D. S. et al. *Crotalus durissus* venom: biological effects and relevant applications. A Review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, 2016.
- AUTO, H. Animais peçonhentos. **Editora da Universidade Federal de Alagoas**, 2005.
- AZEVEDO-MARQUES, M.; HERING, S.; CUPO, P. Acidente crotálico. **Sao Paulo: Sarvier**, p. 91-98, 2003.
- 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.
- BARLEON, B. et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood**, v. 87, n. 8, p. 3336-3343, 1996.
- BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T. High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. **Anal. Chem**, v. 62, n. 17, p. 1836-1840, 1990.
- BERNARDE, P. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**: São Paulo: Anolis Books 2014.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Répteis brasileiros: Lista de espécies **São Paulo: SBH** 2015.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

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-FRANCA, J. et al. Minor snake venom proteins: structure, function and potential applications. **Biochim Biophys Acta**, 2016.

BORDON, K. C. 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.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 115, n. 3, p. 453-466, 1962.

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.

CALDWELL, M. W. et al. The oldest known snakes from the Middle Jurassic-Lower Cretaceous provide insights on snake evolution. **Nat Commun**, v. 6, p. 5996, 2015.

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

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest Nearctic rattlesnake venom. Evolutionary Clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms [corrected]. **J Proteome Res**, v. 11, n. 2, p. 1382-90, 2012.

CALZA, L. et al. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 7, p. 4160-5, 2001.

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

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

CAPP, C. et al. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Clinical & Biomedical Research**, v. 29, n. 1, 2009.

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. 122-8, 2016.

CEBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJALLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 5, p. 601-15, 2006.

CHEN, Y. L. et al. Crotalid venom vascular endothelial growth factors has preferential affinity for VEGFR-1. Characterization of *Protobothrops mucrosquamatus* venom VEGF. **Thromb Haemost**, v. 93, n. 2, p. 331-8, 2005.

CLAFFEY, K. P.; SENGER, D. R.; SPIEGELMAN, B. M. Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. **Biochim Biophys Acta**, v. 1246, n. 1, p. 1-9, 1995.

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.

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 40, n. 10, p. 1014-8, 1954.

CRAPS, L. **The Birth of Immunology.** Basle: Sandoz Pharma Ltd. , 1993.

CUNHA, E.; MARTINS, O. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*—uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

CUNNINGHAM, E. et al. Acute serum sickness with glomerulonephritis induced by antithymocyte globulin. **Transplantation**, v. 43, n. 2, p. 309-12, 1987.

CUPO, P. et al. Reações de Hipersensibilidade imediatas após o uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 33, n. 2, p. 115-122, 1991.

CUPO, P. Bites and stings from venomous animals: a neglected Brazilian tropical disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 6, p. 639-41, 2015.

DESCOTES, J.; CHOQUET-KASTYLEVSKY, G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? **Toxicology**, v. 158, n. 1, p. 43-49, 2001.

DOERNER, K. C.; WHITE, B. A. Detection of glycoproteins separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic acid-Schiff stain. **Analytical biochemistry**, v. 187, n. 1, p. 147-150, 1990.

DVORAK, H. Angiogenesis: update 2005. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1835-1842, 2005.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur J Biochem**, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric beta-neurotoxin. **J Mol Biol**, v. 412, n. 2, p. 176-91, 2011.

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.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FOLKMAN, J. The role of angiogenesis in tumor growth. In: **Seminars in cancer biology**, v. 3, n. 2, p.65-71, 1992.

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.

GASMI, A. et al. Purification and characterization of a growth factor-like which increases capillary permeability from *Vipera lebetina* venom. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 268, n. 1, p. 69-72, 2000.

GASMI, A. et al. Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signalling. **J Biol Chem**, v. 277, n. 33, p. 29992-8, 2002.

GEORGIU, C. D. et al. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. **Anal Bioanal Chem**, v. 391, n. 1, p. 391-403, 2008.

GERWINS, P.; SKÖLDENBERG, E.; CLAEISSON-WELSH, L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 34, n. 3, p. 185-194, 2000.

GONÇALVES, J.; VIERA, L. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. **Anais Acad. bras. Ciênc.**, v. 32, p. 141-150, 1950.

GOSPODAROWICZ, D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. **Nature**, v. 249, n. 453, p. 123-7, 1974.

GRANT, D. S. et al. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 933-943, 1989.

HAWGOOD, B. J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950). **Toxicon**, v. 30, n. 5-6, p. 573-9, 1992.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 5, p. 1011-27, 2005.

HUI WEN, F. 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.

HUMAN STEM CELL INSTITUTE. **Neovascugen®**. Disponível em: <<https://eng.hsci.ru/products/neovascugen>>. Acesso em: 01. jul. 2017.

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

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. Ion-Exchange Chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 349-371, 2009.

JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. et al. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pitviper. A new member of the VEGF family of proteins. **J Biol Chem**, v. 276, n. 43, p. 39836-42, 2001.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L. et al. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 571-5, 2004.

KAVRAN, J. M.; LEAHY, D. J. Silver staining of SDS-polyacrylamide gel. **Methods Enzymol**, v. 541, p. 169-76, 2014.

KECK, R. G. et al. Disulfide structure of the heparin binding domain in vascular endothelial growth factor: characterization of posttranslational modifications in VEGF. **Arch Biochem Biophys**, v. 344, n. 1, p. 103-13, 1997.

KHARITONENKOV, A. FGFs and metabolism. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 6, p. 805-10, 2009.

KOMORI, Y. et al. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). **Biochemistry**, v. 38, n. 36, p. 11796-11803, 1999.

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. 1293-1304, 2008.

KOPACIEWICZ, W. et al. Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 266, p. 3-21, 1983.

KOSTIZA, T.; MEIER, J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon**, v. 34, n. 7, p. 787-806, 1996.

KRAGH-HANSEN, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. **Pharmacol Rev**, v. 33, n. 1, p. 17-53, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LAUSTSEN, A. H. et al. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. **Toxicon**, v. 104, p. 43-5, 2015.

LEE, P. et al. Neuropilin-1 is required for vascular development and is a mediator of VEGF-dependent angiogenesis in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10470-10475, 2002.

LEON, G. et al. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 76, p. 63-76, 2013.

LEUNG, D. W. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306-1309, 1989.

LI, X. et al. Fibroblast growth factors, old kids on the new block. **Semin Cell Dev Biol**, v. 53, p. 155-67, 2016.

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

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. **Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. FUNPEC-Editora, v. 3, n. 1, 2011.

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

NAKAMURA, H. et al. Discovery of a novel vascular endothelial growth factor (VEGF) with no affinity to heparin in *Gloydius tsushimaensis* venom. **Toxicon**, v. 86, p. 107-15, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: LTDA, A. E. (Ed.). **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6 ed., 2014. p. 129.

NESVIZHSKII, A. I.; AEBERSOLD, R. Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 1419-40, 2005.

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.

OSIPOV, A. V. et al. Nerve growth factor from cobra venom inhibits the growth of Ehrlich tumor in mice. **Toxins (Basel)**, v. 6, n. 3, p. 784-95, 2014.

OSIPOV, A. V. et al. Nerve growth factor suppresses Ehrlich carcinoma growth. **Dokl Biochem Biophys**, v. 451, p. 207-8, 2013.

OTROCK, Z. K.; MAKAREM, J. A.; SHAMSEDDINE, A. I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. **Blood Cells Mol Dis**, v. 38, n. 3, p. 258-68, 2007.

PANDYA, N. M.; DHALLA, N. S.; SANTANI, D. D. Angiogenesis - a new target for future therapy. **Vascul Pharmacol**, v. 44, n. 5, p. 265-74, 2006.

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.

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

PLA, D. et al. What killed Karl Patterson Schmidt? Combined venom gland transcriptomic, venomomic and antivenomic analysis of the South African green tree snake (the boomslang), *Dispholidus typus*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 4, p. 814-823, 2017.

PONCE-SOTO, L. et al. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of protein chemistry**, v. 21, n. 3, p. 131-136, 2002.

PONCE-SOTO, L. A. et al. Biological and structural characterization of crotoxin and new isoform of crotoxin B PLA₂ (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom. **Protein J**, v. 26, n. 4, p. 221-30, 2007.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1473, p. 1545-64, 2006.

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.

SCHRATZBERGER, P.; KÄHLER, C.; WIEDERMANN, C. Use of fluorochromes in the determination of chemotaxis and haptotaxis of granulocytes by micropore filter assays. **Annals of hematology**, v. 72, n. 1, p. 23-27, 1996.

SCOPES, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Anal Biochem**, v. 59, n. 1, p. 277-82, 1974.

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.

SKAPER, S. D. Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. **Immunology**, 2017.

SOFER, S.; SHAHAK, E.; GUERON, M. Scorpion envenomation and antivenom therapy. **J Pediatr**, v. 124, n. 6, p. 973-8, 1994.

STÖCKLIN, R. et al. Identification of snake species by toxin mass fingerprinting of their venoms. **Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Mass Spectrometry of Proteins and Peptides**, p. 317-335, 2000.

SUNAGAR, K. et al. Intraspecific venom variation in the medically significant Southern Pacific Rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): biodiscovery, clinical and evolutionary implications. **J Proteomics**, v. 99, p. 68-83, 2014.

TAKAHASHI, H. et al. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 44, p. 46304-14, 2004.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 3, p. 227-41, 2005.

THOMAZINI, I.; 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.

TOKUNAGA, Y.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Specific distribution of VEGF-F in Viperinae snake venoms: isolation and characterization of a VGEF-F from the venom of *Daboia russelli siamensis*. **Arch Biochem Biophys**, v. 439, n. 2, p. 241-7, 2005.

TOMANEK, R. J.; SCHATTEMAN, G. C. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. **The Anatomical Record**, v. 261, n. 3, p. 126-135, 2000.

U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Clinical Trials**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=VEGF&Search=Apply&age_v=&gndr=&type=&rslt=>>. Acesso em: 01. jul. 2017.

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

VONK, F. J. et al. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 51, p. 20651-6, 2013.

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.

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.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **J Biol Chem**, v. 278, n. 52, p. 51985-8, 2003.

YAMAZAKI, Y. et al. C-terminal heparin-binding peptide of snake venom VEGF specifically blocks VEGF-stimulated endothelial cell proliferation. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 34, n. 4-5, p. 197-9, 2005.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. **J Biol Chem**, v. 284, n. 15, p. 9885-91, 2009.

YANCOPOULOS, G. D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 242-248, 2000.

YEH, C.-H. et al. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective $\alpha v \beta 3$ blockade of endothelial cells. **Molecular pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 1333-1342, 2001.

ZHONG, S. et al. Vascular endothelial growth factor from *Trimeresurus jerdonii* venom specifically binds to VEGFR-2. **Biochimie**, v. 116, p. 1-7, 2015.

ANEXO A - Certificado de Regularidade do Setor de Manutenção de Répteis (UFU) para utilização de diferentes venenos animais emitido pelo IBAMA.

2017-5-11

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: Data da consulta: CR emitido em: CR válido até:

[Dados básicos](#)

CNPJ:
 Razão social:
 Nome fantasia:
 Data de abertura:

[Endereço](#)

Logradouro: Complemento:
 N.º: Município:
 Bairro: UF:
 CEP:

Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais – CTF/APP

Categoria	Detalhe
21 - Outros serviços	27 - uso próprio de motosserra ou para empréstimo a terceiros
20 - Uso de Recursos Naturais	45 - criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa

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.

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.

O Certificado de Regularidade do CTF/APP não habilita o transporte e produtos e subprodutos florestais e faunísticos.

[Fechar](#)

ANEXO B - Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 012/2017
 kms

Ribeirão Preto, 2 de março de 2017.

À Pós-graduanda
Isabela Gobbo Ferreira
 Orientadora Profª. Drª. Eliane Candiani Arantes Braga
 FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE UM FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR, VEGF, DA PEÇONHA DA SERPENTE CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 430 – CAAE nº 63299516.0.0000.5403, foi aprovado *ad referendum* do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em 16.02.2017.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
 Coordenadora do CEP/FCFRP