



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Estudo comparativo de venenos de serpentes do gênero *Crotalus* ssp.

José Pedro Prezotto Neto

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**

**São Paulo
2018**



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Estudo comparativo de venenos de serpentes do gênero *Crotalus* ssp.

JOSÉ PEDRO PREZOTTO NETO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2018

Fonte de Financiamento: CAPES

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

PREZOTTO-NETO, J. P. **Estudo Comparativo de venenos de serpentes do gênero o *Crotalus ssp.***. 2018. 108 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Prezotto-Neto, José Pedro
Estudo Comparativo de venenos de serpentes do gênero
Crotalus ssp. / José Pedro Prezotto-Neto; orientador Patrick
Jack Spencer. -- São Paulo, 2018.
108 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e
Nucleares, São Paulo, 2018.

1. *Crotalus ssp.*. 2. Proteômica. 3. Atividade enzimática.
I. Spencer, Patrick Jack, orient. II. Título.

**Aos meus pais José Pedro e
Márcia, que sempre estão ao
meu lado, pelo apoio. Vocês são
TUDO!!!**

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, Márcia e José Pedro por todo auxílio, incentivo, compreensão e pelo amor incondicional dedicado a mim e minhas escolhas, nada teria acontecido sem o carinho e assistência desses meus amores.

À minha irmã, Fernanda e sobrinhos (Cecília e Nicholas) que mesmo longe (aproximadamente 9.500 km) nunca deixaram de me apoiar e de demonstrarem admiração pelo meu trabalho.

Aos membros da minha família (avós, tios(as) e primos(as)) que sempre me aconselharam e me amaram, mesmo eu não os presenteando nas festas natalinas. (Risos).

Em memória aos meus avôs (José Pedro e Abelardo) pelo carinho, ensinamentos da vida. Carrego com muito zelo cada detalhe de vossos sorrisos. Saudade eterna!

À minha prima/irmã Tatiana e seu marido Mauro (considero primo/irmão também), que acompanharam de muito perto todos os meus sonhos, acertos e frustrações.

Ao meu orientador e amigo, Dr. Patrick Jack Spencer, que com muita confiança abriu as portas do seu laboratório e de sua casa, compartilhando sem hesitar seus conhecimentos e experiências da vida acadêmica, científica e pessoal. É, foi e sempre será uma honra.

A todos os pesquisadores, alunos e servidores do Centro de Biotecnologia, pelo carinho e profissionalismo. Cada dia foi um aprendizado ao lado de vocês.

Ao Dr. Daniel de Carvalho Pimenta, pela amizade, ensinamentos e, sobretudo pela oportunidade proporcionada a mim em utilizar os preciosos equipamentos de espectrometria de massas, promovendo maior requinte e precisão dos resultados deste trabalho.

Às Dra. Luciana Lyra Casais e Silva que nos cedeu gentilmente o veneno de *Crotalus durissus cascavella* (Universidade Federal da Bahia) e o Instituto Vital Brazil (RJ) por ceder dois lotes do veneno de *C. d. terrificus* provenientes dos Estados de Santa Catarina (Cdt SC) e Rio Grande do Sul (Cdt RS).

À Dr. Maisa Splendore Della Casa, pela gentileza de nos ceder o soro anti-jararagina

Ao aluno de doutorado, Douglas Mariano (orientado pelo Dr. Daniel Pimenta), que me ajudou em todas as etapas dos procedimentos de espectrometria. Obrigado pela parceria, parceiro!

Aos colegas do laboratório de bioquímica do Instituto Butantan, que sempre foram muito cordiais e profissionais comigo.

Aos membros da banca do seminário de área: Dr. Daniel Pimenta, Dra. Nancy Oguiura e Dra. Cibele Nunes Peroni pelos valiosos conselhos científicos.

À Fernanda Cortinhas Barbosa, que foi uma pessoa crucial na reta final da tese, sua parceria me propiciou paz e tranquilidade.

Aos meus amigos da “Vila Butantan” (Bianca, Luciano, Louise, Peter, Juninho, Bruna, Adriano, Jaque, Denise, Adriana, Paulo, Pedro (Perereca), Flávia e Érika). São muitos anos de convivência, respeito, carinho, ciência, boemia. Formamos uma família memorável.

Aos meus queridos amigos José Lourenço (Joey), Bruno e Tatiane Combi. Tive a oportunidade de dividir o mesmo teto com vocês e com essa rotina diária fui capaz de absorver seus talentos culinários e científicos. Obviamente não foi apenas isso, mas seria uma lista muito grande de todas as experiências que passamos por todos esses anos.

**“A dúvida é o princípio da
sabedoria”**

Aristóteles

RESUMO

PREZOTTO-NETO, J. P. **Estudo comparativo de venenos de serpentes do gênero *Crotalus* ssp.** 2018. 108 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo.

As cascavéis são classificadas como grupo monofilético contendo dois gêneros descritos ao grupo: *Crotalus* ssp. e *Sistrurus* ssp., os quais surgiram no México a aproximadamente 20 milhões de anos, colonizando então, praticamente todo o continente americano. Fatores como dieta, dimorfismo sexual, ontogenia, mutações e distribuição geográfica podem influenciar na composição dos venenos e conseqüentemente no envenenamento. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o perfil proteico, bem como as propriedades enzimáticas e imunológicas dos venenos de algumas espécies e subespécies de *Crotalus* ssp. (*C. atrox*, *C. scutulatus scutulatus*, *C. viridis viridis*, *C. vegrandis*, *C. durissus cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*). Os resultados indicaram pouca variabilidade entre os perfis eletroforéticos dos venenos, contudo as diferenças foram na concentração relativa das proteínas. A análise proteômica identificou alguns componentes dos venenos e serinopeptidases, metalopeptidases e fosfolipases A₂ foram as mais abundantes. Além disso, por zimografia, observou-se que todos os venenos analisados apresentaram atividade proteolítica e que os venenos norte-americanos em todos os zimogramas foram mais hidrolíticos. Em caseína, a atividade enzimática dos venenos foi menos intensa comparado aos outros substratos. Em relação às gelatinases das amostras estudadas, pôde ser observado inibição da atividade enzimática induzida por alguns componentes utilizando EDTA, principalmente nos venenos de *C. atrox* e *C. vegrandis*. Em relação à inibição das serinopeptidases, foi observado que todas as gelatinases dos venenos crotálicos apresentaram inibição total ou parcial da atividade hidrolítica. Houve variabilidade entre as hialuronidases encontradas dos venenos crotálicos, tanto em relação à massa das enzimas e intensidade da degradação, quanto em diferentes pHs. Nos ensaios enzimáticos quantitativos (azocaseinolítico fosfolipásico e peptidásico,) os venenos Norte Americanos demonstraram conter mais proteases em relação aos venenos Sul Americanos. Por *Western Blotting*, as amostras reagiram com os anticorpos presentes nos soros anti-crotálico e anti-botrópico, apresentando reatividade antigênica cruzada entre as amostras homólogas e heterólogas. Além disso, houve imunoreatividade

entre o soro anti-jararagina e alguns componentes de todos os venenos crotálicos norte-americanos.

Palavras chave: *Crotalus* sp., proteômica, atividade enzimática

Abstract

PREZOTTO-NETO, J. P. **Comparative study of the *Crotalus* ssp. snake venoms**. 2018. 108 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo

The rattlesnakes are classified as a monophyletic group containing two genera referring to the group: *Crotalus* ssp. and *Sistrurus* ssp., which arose in Mexico 20 millions of years ago, colonizing then, practically all the American continent. Some scientific works indicate that factors such as diet, sexual dimorphism, ontogeny, mutations and distribution may influence the composition of the venoms and consequently the poisoning. The present work aims to characterize the enzymatic and immunological properties of the venoms of some species and subspecies of *Crotalus* ssp. (*C. atrox*, *C. scutulatus scutulatus*, *C. viridis viridis*, *C. vegrandis*, *C. durissus cascavella*, *C. collilineatus* and *C. d. terrificus*). The results indicated few variability among the electrophoretic profiles of the venoms, however the differences were in the relative concentration of the proteins. The proteomic analysis identified serinopeptidases, metallopeptidases and phospholipases A₂, which were the most abundant components of the venoms. In addition, zymography assays indicate that the all the venoms showed proteolytic activity, furthermore, the North American venoms, presented more hydrolysis in all zimograms. The caseinolytic activity was less intense compared with other substrates. Regarding the gelatinolytic activity of the samples, inhibition of the enzymatic activity of some components could be observed using EDTA, mainly in the *C. atrox* and *C. vegrandis* venoms. Partial or total inhibition was observed of the serinopeptidases activity of the crotalic gelatinases. Among the hyaluronidases, variations between crotalic venoms, in relation to the enzymes mass and degradation intensity were identified. In addition, when incubated at different pHs, the hyaluronidase profile presented different patterns in the activity. In the quantitative enzymatic assays (azocaseinolytic phospholipasic, peptidasic) the North American venoms displayed higher activity in relation to the South American venoms. In the Western Blotting assays, the samples reacted with antibodies present in the Brazilian anti-crotalic and bothropic sera, indicating cross-reactive antigenicity between the homologous and heterologous samples.

Besides that, there was immunoreactivity between the anti-jararrhagin serum and some components of all North American crotalic venoms.

Keywords: *Crotalus* spp., proteomic, enzymatic assay

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Venenos	24
3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) dos venenos de <i>Crotalus ssp</i>	24
3.3. Fracionamento dos venenos de <i>Crotalus ssp.</i> por cromatografia de exclusão molecular	25
3.4. Proteoma dos venenos de <i>Crotalus ssp</i>	25
3.4.1 Espectrometria de massas MALDI-ToF	25
3.4.2 Digestão enzimática em solução	26
3.4.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	26
3.5. Zimografia.....	27
3.5.1. Determinação da atividade caseinolítica dos venenos de <i>Crotalus</i> <i>ssp</i>	27
3.5.2. Determinação da atividade gelatinolítica dos venenos de <i>Crotalus</i> <i>ssp.</i> na presença e ausência de inibidores enzimáticos.....	28
3.5.3. Determinação da atividade hialuronidásica dos venenos de <i>Crotalus ssp.</i> em pHs 5,0 e 7,4	28
3.6. Determinação da atividade azocaseinolítica dos venenos de <i>Crotalus ssp</i>	29
3.7. Determinação da atividade fosfolipásica dos venenos de <i>Crotalus ssp</i>	30
3.8. Atividade Peptidásica	30
3.9. <i>Western Blotting</i>	31
3.10. Análise estatística.....	31

4. RESULTADOS	SUMÁRIO	32
4.1. Perfil eletroforético dos venenos de <i>Crotalus ssp</i>		32
4.2. Fracionamento dos venenos de <i>Crotalus ssp</i> . por cromatografia de exclusão molecular		34
4.3. Proteoma dos venenos de <i>Crotalus ssp</i>		37
4.4. Atividade caseinolítica		57
4.5 Atividade gelatinolítica		59
4.6 Atividade hialuronidásica		61
4.7 Atividade azocaseinolítica		63
4.8. Atividade fosfolipásica		64
4.9 Atividade peptidásica		65
4.10 Reconhecimento dos componentes dos venenos crotálicos pelo soro anticrotálico (SAC) por <i>Western Blotting</i>		67
4.11 Reconhecimento dos componentes dos venenos crotálicos pelo soro antibotrópico (SAB) por <i>Western Blotting</i>		69
4.12 Reconhecimento dos componentes dos venenos crotálicos pelo soro anti-jararagina (anti-jar) por <i>Western Blotting</i>		70
5 DISCUSSÃO		72
6 CONCLUSÃO		81
7 REFERÊNCIAS		82
8 APÊNDICE		98

1 INTRODUÇÃO

As serpentes são vertebrados, tetrápodos (por descenderem de animais de quatro patas) pertencentes à Ordem Squamata e Subordem Ophidia, sendo que até julho de 2018 foram catalogadas 3.709 espécies distribuídas em 26 famílias (<http://reptile-database.org>), difundidas por todo ecossistema terrestre com exceção das calotas polares, devido ao clima, que por ser extremamente frio, impede a vida de vertebrados ectotérmicos.

Além disso, podem ser classificadas em relação ao uso do habitat como: terrícolas, arborícolas, aquáticas, criptozóicas e fossoriais. Esses animais têm como algumas principais características morfológicas um corpo alongado, perda de pálpebras móveis, ausência de apêndices locomotores e cintura escapular. Em relação ao comportamento alimentar, as serpentes utilizam estruturas quimiossensíveis para localizar e perseguir suas presas, alimentando-se de presas inteiras. A dieta de serpentes é baseada no forrageamento de animais vertebrados ou invertebrados, sendo então predominantemente carnívoros obrigatórios generalistas e/ou especialistas (MARQUES e SAZIMA, 2009; MELGAREJO, 2009).

As serpentes consideradas peçonhentas e de importância médica representam aproximadamente 15 % da ofidiofauna distribuídas pelo globo terrestre (RUSSEL, 2001; GOLD et al., 2002), sendo que, no continente Americano os acidentes ofídicos com maior índice de notificações são ocasionados por serpentes da família Viperidae. Membros dessa família possuem aparato venenífero especializado, contendo aparelho inoculador (presas) do tipo solenóglifa, (termo oriundo da língua grega onde *Solén*: tubo e *Glyphós*: sulco) (Figura 1A). As presas, que são os únicos dentes funcionais da maxila, são grandes, caniculados e pontiagudos e, além disso, apresentam-se conectadas às glândulas veneníferas. Esse padrão de dentição em concomitância com o formato craniano dos viperídeos permite que a serpente tenha uma abertura bucal ideal. Quando em repouso, as presas são situadas paralelamente ao crânio, porém, com a boa aberta, giram 90° facilitando o direcionamento desses dentes para uma melhor orientação na inoculação da peçonha na presa, além de promover um

mecanismo de defesa contra possíveis predadores/agressores (MELGAREJO, 2009) (Figura 1B).

Figura 1. A) Dentição tipo solenóglifa. B) *Crotalus* ssp. em posição de bote



Fonte: A- <https://i.ytimg.com/vi/gNuq21b1c0M/maxresdefault.jpg>; B-https://bisonridgehoa.com/wp-content/uploads/2016/05/rattlesnake_striking-img.jpg.

Dentro do táxon Viperidae existem três subfamílias: Azemiopinae, Crotalinae e Viperinae. Para designar a subfamília Crotalinae, morfologicamente, além das características citadas acima, é diagnosticável a presença de 2 orifícios situados entre os olhos e narinas denominados fosseta loreal (Figura 2). Esse órgão é revestido por um epitélio termossensível que permite à serpente, um predador noturno, detectar variações sutis de temperatura do ambiente, sendo assim capaz de gerar imagens infravermelhas de suas presas de sangue quente, proporcionando maiores chances de êxito no forrageamento (BULLOCK et al., 1952; BAKKEN et al., 2007; FRANCO, 2009).

Figura 2: Imagem de um crotalíneo, com seta demonstrando a localização da fosseta loreal.



Fonte: <https://www.papeldeparede.etc.br/fotos/wp-content/uploads/White-Snake.jpg>

Venenos ofídicos são secreções produzidas por glândulas extremamente especializadas, situadas na região temporal, atrás dos olhos e abaixo do músculo compressor. Essas glândulas veneníferas estão envoltas por um tecido conjuntivo e são compostas por um epitélio secretor ramificado, sendo formada por aproximadamente por 79 % de células epiteliais secretoras (MACKESSY, 1991; MELGAREJO, 2003).

Alguns dados paleontológicos indicam que a posição filogenética na qual as serpentes são inseridas (assim como outros répteis) datam o surgimento do táxon entre o final do período Triássico e o início do Jurássico (KOCHVA, 1987; EVANS, 2003) e com isso, FRY e colaboradores (2006) deduzem que o “artefato” venenífero do grupo Squamata surgiu por volta de 200 milhões de anos atrás, sendo um importante agente para sucesso evolutivo/adaptativo do grupo.

Essa secreção especializada (veneno) tem como principal função natural subjugar, paralisar, e/ou matar potenciais presas e, além disso, são utilizados na defesa contra possíveis predadores. Seus componentes agem sinergicamente, causando sintomas sistêmicos e/ou locais no organismo acometido, os quais atuam sistemicamente nos processos fisiológicos vitais do indivíduo, comprometendo o sistema cardiovascular, nervoso, a locomoção e também alterando a hemostase, induzindo alguns sintomas como: paralisia facial, oftalmoplegia, insuficiência respiratória, insuficiência renal aguda (IRA),

hipotensão arterial, braquicardia, hemorragia (ex: gengivorragia), entre outros. Em alguns casos, observa-se no local da picada sinais de inflamação, como edema (com intensidades variáveis), eritema, dor, podendo haver sangramentos ou não. Além disso, parestesia, equimose, bolhas e necrose podem ser evidenciadas no local ou próximo à picada, isso dependendo da espécie da serpente envolvida e o tempo de evolução do envenenamento (KARLSSON, 1979; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; AZEVEDO-MARQUES, et al., 2009).

Os venenos ofídicos são constituídos por produtos de alta complexidade, sendo a maioria compostos por famílias de proteínas (grande variedade de enzimas) e peptídeos. Entre as serpentes da família Viperidae, já foram relatados: fosfolipases A_2 (PLA₂), lectinas do tipo C (CTLs), serinopeptidases, L-amino-oxidases (LAOs), metalopeptidases, nucleotidases, hialuronidases, disintegrinas, fatores de crescimento endotelial (VEGF) e neuronal (NGF), peptídeos natriuréticos, inibidores de peptidases do tipo Kunitz, proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISPs), peptídeos potenciadores de bradiginina (BPPs) e cistatinas (FRY, 2005; CALVETE et al., 2007; TASOULIS e ISBISTER, 2017).

Esses componentes, como já relatado anteriormente, atuam de forma concomitante causando diversos distúrbios no organismo. Segue abaixo, de maneira sucinta, algumas das principais toxinas que compõe os venenos ofídicos.

Metalopeptidases

Metalopeptidases (SVMPs – *Snake Venom MetalloPeptidase*) são muito abundantes em venenos de viperídeos, as quais possuem como principal atributo a existência de um íon inorgânico (geralmente zinco) integrado a um motivo estrutural extremamente conservado. São hidrolases do tipo endopeptidases e fazem parte da família das metzincinas. Essas enzimas são expressas no formato de zimogênio quando presentes nas glândulas veneníferas e após o processamento pós-traducional, podem ser classificadas em 3 diferentes tipos/classes: PI (constituídas somente do sítio catalítico (domínio metalopeptidases)), PII (que possuem em sua estrutura o domínio catalítico e um

domínio disintegrina) e PIII (as quais são constituídas pelos domínios da classe PII com a adição de um terceiro domínio rico em cisteína). Essa classe das metalopeptidases (PIII) são as enzimas predominantes na indução do quadro clínico hemorrágico. Elas ainda podem ser sub-classificadas de acordo com modificações pós-traducionais como dimerização ou dissociação de domínios por proteólise. Existem também as P-III com uma lectina tipo C ligada à porção rica em cisteínas por uma ponte dissulfeto, chamadas de P-III_d ou P-IV (GUTIÉRREZ et al., 2009). Essas toxinas podem romper a integridade da membrana basal dos vasos sanguíneos, degradar componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, fibronectina e laminina), além de induzir inibição da agregação plaquetária, edema, dermonecrose e hemorragia. (HITEN et al., 1994; BJARNARSON e FOX, 1995; SERRANO e FOX, 2005; BALDO, et al., 2010).

Fosfolipases A₂

Em relação as PLA₂s, essa classe de enzimas Ca²⁺ dependentes constituem a maioria dos compostos tóxicos entre os venenos ofídicos (KINI, 2005; SCHALOSKI e DENNIS, 2006), sendo que alguns trabalhos na literatura relatam que essas enzimas hidrolisam fosfolípides de membrana e possuem ação neurotóxica, citotóxica, miotóxica e nefrotóxica, além de serem responsáveis pelo encadeamento de diversos processos farmacológicos, como na interferência na agregação plaquetária, formação de araquidonato, e também são capazes de promover inflamação no local acometido (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; PÉREZ et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007; STÁBELI et al., 2007; MONTECUCCO, et al., 2003; CALVETE et al., 2009; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2009; ZYCHAR et al., 2010). As fosfolipases do tipo A₂ são divididas em duas classes: citosólicas ou secretadas, sendo que, nos venenos de serpentes, essas toxinas são classificadas como PLA₂ secretadas, hidrolisando a cadeia carbônica dos fosfolípidios na ligação éster na posição do carbono 2, gerando a liberação de ácidos graxos (araquidônico) e lisofosfolípides.

Serinopeptidases

Outra classe de proteases encontradas nos venenos ofídicos, principalmente nos viperídeos são as serinopeptidases (SVSPs – *Snake Venom Serine Peptidase*). Dependendo o nível de glicosilação, a massa molecular desta classe enzimática pode variar entre 26 e 67 kDa. Essas peptidases catalisam a clivagem de proteínas e peptídeos no C-terminal dos resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Atuam em diversos processos biológicos, como no auxílio da digestão da presa, no controle e regulação da coagulação sanguínea, no sistema imunológico e na inflamação (KINI, 2005; KANG, et al., 2011).

Disintegrinas

As disintegrinas são proteínas de baixa massa molecular comumente encontradas nos venenos de viperídeos. São constituídas por um motivo estrutural típico instituída pela sequência Arg-Gly-Asp (RGD). Essa sequência é encontrada em diversas proteínas plasmáticas e proteínas da matriz extracelular como, por exemplo: fibronectina, colágeno, trombospondina, laminina e fibrinogênio. Portanto, as disintegrinas interferem na ligação das integrinas (proteínas que reconhecem a sequência tripeptídica RGD) e como consequência induzem alterações no sistema hemostático. (SANO-MARTINS e SANTORO, 2009).

Hialuronidases

Um dos principais constituintes teciduais é o ácido hialurônico, que é um glicosaminoglicano que se liga a outros componentes da matriz extracelular para formar a substância fundamental do tecido conjuntivo (KREIL, 1995). Até o momento, acredita-se que a finalidade das hialuronidases nos venenos é agir como “fator de espalhamento”, auxiliando a difusão das demais toxinas da peçonha na presa/vítima, potencializando indiretamente a ação local e/ou sistêmica do veneno (GIRISH et al., 2004). Mesmo com poucas informações na

literatura sobre hialuronidasas de *Crotalus* ssp. essas enzimas já foram estudadas em veneno de serpentes de outros gêneros e também em outros animais peçonhentos, como abelhas, aranhas, escorpiões e lacraias apresentando variabilidade na massa molecular entre 33 a 100 kDa (WANAGA e SUZUKI, 1979; FISZER-SZAFARZ, 1984; CEVALLOS et al., 1992; BARBARO et al., 2005; MALTA, et al., 2008; PREZOTTO-NETO et al. 2016).

L-aminoácido oxidases

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são encontradas em diferentes organismos, como por exemplo: fungos, bactérias, algas verdes e também nos venenos de serpentes. São flavoenzimas e catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos em α -cetoácidos com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio, tendo afinidade por aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos como substratos (PONNUDURAI, et al., 1994; KANG, 2011). A fisiopatologia causada pelas LAAOs nos envenenamentos por serpentes ainda não está muito elucidada, entretanto, alguns trabalhos apontam que as LAAOs possuem ação antibacteriana e induzem inibição da agregação plaquetária, edema e citotoxicidade/apoptose (DU e CLEMETSON, 2002; ZULIANI et al., 2009).

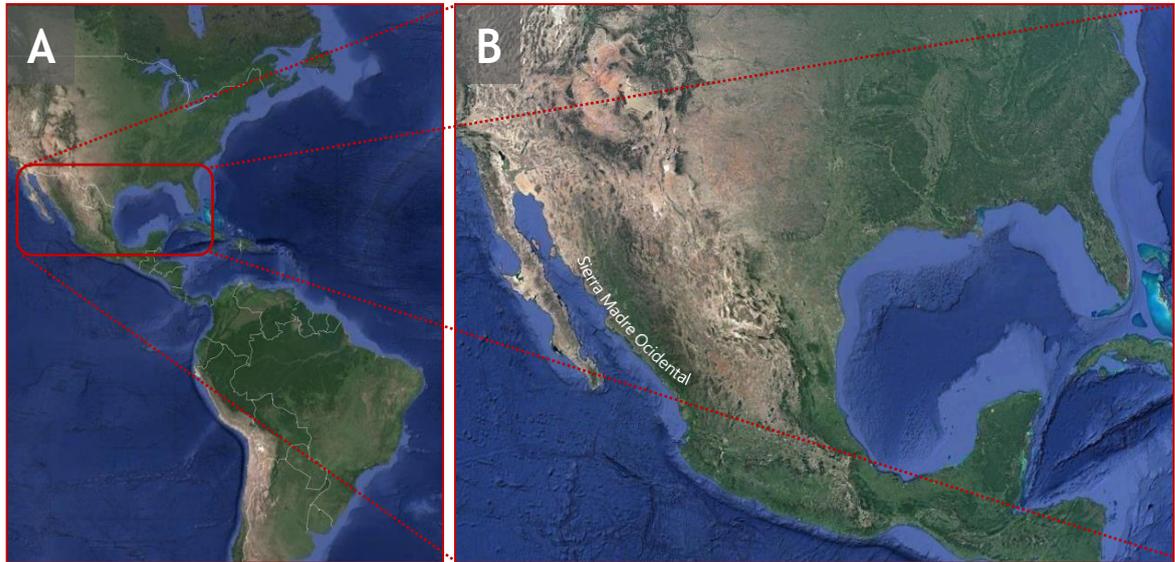
A variabilidade entre esses componentes naturais encontrados nos venenos de serpentes é influenciada por múltiplos fatores incluindo ontogenia, dimorfismo sexual, dieta, filogenia e distribuição geográfica, além da constante pressão da seleção natural (CHIPPAUX et al., 1991; MOURA-DA-SILVA et al., 2003; FURTADO et al., 2006; MENEZES et al., 2006; BARLOW et al., 2009; ANTUNES et al., 2010; ZELANIS et al., 2010; JACKSON et al., 2013; SUNAGAR et al., 2013). Alguns pesquisadores demonstraram grande oscilação estrutural e funcional nos venenos analisados, devido a sucessivas duplicações gênicas e alta taxa de acumulo de mutações, indicando ser influência de evolução molecular acelerada. (NAKASHIMA et al., 1993; OHNO et al., 1998; CALVETE et al., 2005;

REZA et al., 2006; CASEWELL et al., 2011; FRY et al., 2012; JACKSON et al., 2013).

Entre os gêneros de serpentes peçonhentas que apresentam grande variabilidade entre os componentes do veneno e conseqüentemente no quadro clínico do envenenamento, estão as do gênero *Crotalus* ssp. Essas serpentes, no Brasil, são mais conhecidas por cascavéis, porém, dependendo da região onde o animal habita e da cultura local, podem ser denominadas como boiciningas ou maracambóia. São animais robustos e pouco ágeis, possuem uma linha vertebral bem saliente, com as escamas do corpo praticamente monocromáticas com variações de tonalidade, pendendo para o castanho-claro, além disso, podem ser evidenciados desenhos de formato losangular na região dorsal. Ademais, as cascavéis são reconhecidas por possuírem um apêndice caudal (gizo), apresentando no final da cauda resquícios de pele (provenientes de sucessivas trocas de pele ou ecdises) que soam como chocalho no momento em que o animal, em estado de excitação, chacoalha a cauda (MELGAREJO, 2009).

O gênero *Crotalus* (um dos 21 gêneros descritos em Crotalinae) originou-se aproximadamente a 20 milhões de anos atrás (maa) na *Sierra Madre* Ocidental do planalto central do México (Figura 3), tendo então, com o surgimento do Istmo do Panamá, irradiado para o norte e para a América do Sul (GREENE, 1997; PARKINSON et al., 2002). Atualmente são descritas aproximadamente 70 espécies e/ou subespécies, (<http://reptile-database.org>) distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina (CAMPBELL e LAMAR, 2004). Em geral, espécimes desse gênero podem ser encontrados em diversos tipos de habitats, ocupando ambientes desérticos, alagados e florestais (BEAUPRE et al., 1998; PLACE e ABRAMSON, 2004).

Figura 3. Imagem satélite. A) Continente Americano. B) Ampliação da região de *Sierra Madre*, México, apresentando o platô mexicano.



Fonte: alterado de do software Google Earth Pro.

O consenso sobre a filogenia das cascavéis não é muito harmônico e nem preciso. Sabe-se que as subespécies de *Crotalus durissus* fazem parte dos principais problemas na herpetologia neotropical. Esse grupo é constituído por formas parapátricas, onde as relações e mecanismos de especiação ainda não se encontram totalmente elucidados (WÜSTER et al., 2005; QUIJADA-MASCAREÑAS et al., 2007). Além disso, é possível afirmar que fatores como a diferenciação e dispersão geográfica podem influenciar na composição bioquímica dos venenos, causando relevantes impactos na área da saúde pública e da zoologia.

Curiosamente, os venenos das cascavéis apresentam variações drásticas, tanto na composição bioquímica quanto no quadro clínico do envenenamento, quando comparadas às rotas de dispersão desses animais. Constata-se que os venenos das cascavéis neotropicais apresentam significativa variação fenotípica, sendo definidos por MACKESSY (2008) como tipo I (altos índices de toxinas hemorrágicas e baixa letalidade: $DL_{50} > 1 \mu\text{g/g}$) e tipo II (baixos índices de toxinas hemorrágicas e alta letalidade: $DL_{50} < 1 \mu\text{g/g}$). Com base nesta informação, pode ser observado que grupos de serpentes Norte Americanas possuem venenos com maior abundância em componentes proteolíticos e hemorrágicos (Serino e Metalopeptidases) capazes de induzir lesões no local da

picada causando distúrbios hematológicos locais e sistêmicos (CALVETE et al., 2009; BUSH et al., 2013). No Brasil, o envenenamento crotálico é caracterizado principalmente por sintomas neurológicos causados pela alta concentração de β -neurotoxinas encontrados no veneno das cascavéis. Essa toxina pertence à família das PLA₂ e além de induzir alterações neurológicas, está intimamente relacionada aos comprometimentos patológicos renais agindo em concomitância com outros componentes (WARREL, 2004; SAMPAIO et al., 2010). Recentemente, CALVETE e colaboradores (2010) sugeriram que a característica neurotóxica predominante das *Crotalus* ssp. sul-americanas provém de tendência pedomórfica, sendo que os venenos de crotalídeos Norte Americanos jovens possuem veneno do Tipo II e quando alcançam a maturidade sexual o veneno apresenta características hemorrágicas e proteolíticas.

Esse fenótipo Tipo II do veneno das cascavéis brasileiras não é exclusivo dessas serpentes Sul Americanas, como por exemplo, a cascavel venezuelana *C. vegrandis*, que habita endemicamente uma pequena região do Estado de Monagas, próximo ao município de Uracoa (região de savanas abertas e floresta tropical seca). O veneno desses animais é constituído por características hemotóxicas do veneno de *Crotalus* ssp. Norte Americanas, afetando a coagulação sanguínea e induzindo hemorragia (Tipo I), além disso, KAISER e AIRD (1987) isolaram a crotoxina do veneno dessa espécie e utilizando técnicas imunológicas frente à anticorpos mono e policlonais (anti-crotoxina), diagnosticaram resultados positivos na reatividade antigênica cruzada. Outros dados obtidos pelos pesquisadores revelaram que a toxina purificada induziu alta toxicidade no ensaio de letalidade (DL₅₀) comparável à da crotoxina de *C. d. terrificus* (cascavel brasileira) indicando homologia entre as toxinas dessas serpentes (KAISER e AIRD, 1987; RODRIGUEZ-ACOSTA et al., 1998; VIALA et al., 2015). Essas informações sobre a *C. vegrandis* sugerem que seu veneno se enquadra como um "elo perdido" para os crotalídeos do continente Americano, uma vez que possui componentes e ação fisiológica dos venenos Tipo I e II já relatados.

Devido à alta taxa de alterações recentes e incertezas taxonômicas entre os crotalídeos Americanos, além dos poucos dados na literatura científica que elucidem com mais detalhes a história natural e as características dos

venenos da maioria das cascavéis, são cabíveis e necessários estudos de pesquisa básica para um melhor entendimento sobre esses animais, sua evolução e a das toxinas que compõem o seu veneno. Este conhecimento da composição dos venenos e de suas atividades também poderia levar ao desenvolvimento de soros mais eficazes. Além disso, existe a possibilidade de serem encontrados componentes ainda desconhecidos na literatura científica, devido à escassez de estudos toxinológicos das espécies e subespécies de *Crotalus* analisadas neste trabalho (Figura 4).

Figura 4. Mapa da distribuição geográfica das *Crotalus* ssp. estudadas no presente trabalho (*Crotalus viridis viridis*, *C. scutulatus scutulatus*, *C. atrox*, *C. vegrandis*, *C. durissus cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*).



Fonte: Mapa: alterado de <https://www.google.com/maps>. Distribuição geográfica: http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?taxon=Crotalinae&submit=Search

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visa explorar os componentes dos venenos de *Crotalus* spp. encontradas nas regiões Norte e Sul do Continente Americano (*Crotalus atrox*, *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. scutullatus*, *C. d. terrificus*, *C. d. vegrandis* e *C. viridis viridis*) e comparar a abundância, atividades biológica, enzimática e imunoenzimática das toxinas presentes nestes venenos.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a complexidade dos venenos por eletroforese
- Analisar os componentes dos venenos por espectrometria de massas MALDI-ToF e LC-MS/ESI-IT-ToF.
- Identificar os peptídeos das amostras geradas por LC-MS/ESI-IT-ToF pelo software Peaks Studio® V8.5.
- Verificar as atividades proteolíticas dos venenos por zimografia (caseína e gelatina)
- Verificar a inibição das gelatinases das amostras com EDTA e PMSF.
- Quantificar as atividades enzimáticas (azocaseinolítica, fosfolipásica e peptidásica) por testes colorimétricos
- Determinar a reatividade antigênica cruzada por e *Western Blotting* entre os venenos utilizando os soros anticrotálico, -botrópico e -jararagina

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Venenos

Os venenos (*pool*, contendo veneno de machos, fêmeas, jovens e adultos em proporções desconhecidas) das subespécies de *Crotalus*: (*C. atrox* (Ca), *C. d. collilineatus* (Cdc), *C. vegrandis* (Cveg), *C. scutulatus scutullatus* (Css) (lotes Sigma e Florida (USA), *C. d. terrificus* (Cdt) (sudeste) e *C. viridis viridis* (Cvv) foram provenientes do banco de venenos do Centro de Biotecnologia (IPEN-USP). Posteriormente, recebemos veneno de *C. d. cascavella* (Cdcas), que foi doado gentilmente pela Dra. Luciana Lyra Casais e Silva (Universidade Federal da Bahia) e o Instituto Vital Brazil (RJ) cedeu dois lotes do veneno de *C. d. terrificus* provenientes dos Estados de Santa Catarina (Cdt SC) e Rio Grande do Sul (Cdt RS).

3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) dos venenos de *Crotalus* ssp.

A massa molecular das proteínas dos venenos brutos das espécies e subespécies de *Crotalus* foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) na presença de SDS (SDS-PAGE) em condições não redutoras. Amostras dos venenos (25 µg/20 µL) foram diluídas (em tampão de amostra (tampão TRIS/HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,5 % (p/v) de SDS, 20 % de glicerol, e 0,05 % de azul de bromofenol), fervidas por três minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida (8x10 cm). A eletroforese foi realizada a 90 V e posteriormente os géis foram corados com *Coomassie Blue* R-250.

3.3 Fracionamento dos venenos de *Crotalus* ssp. por cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica capaz de separar biomoléculas a partir de seu raio hidrodinâmico, sendo eluídas em condições isocráticas. Para essa técnica foi utilizado um sistema de HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) num cromatógrafo Shimadzu® LC-20 AT e uma coluna TosoHaas TSK 2000 (7,5 mm Ø x 60 cm de comprimento) + pré-coluna acopladas, previamente equilibradas em Bicarbonato de Amônio 0,05 M, pH 7,9. Os venenos crotálicos (500 µg/150 µL) foram injetados na coluna e submetidos a um fluxo de 1,0 mL/min e a absorvância dos eluatos foi mensurada em 220 nm e 280 nm. As frações coletadas foram imediatamente congeladas em freezer -80 °C para as análises proteômicas.

3.4 Proteoma dos venenos de *Crotalus* ssp.

3.4.1 Espectrometria de massas MALDI-ToF

O termo MALDI-ToF é proveniente da língua inglesa: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*, isto é, dessorção/ionização por laser assistido por matriz, sendo que a sigla ToF (*Time of Flight*) é referente ao analisador/separador de íons que detecta/analisa as massas das moléculas de dentro de um tubo a vácuo pelo tempo de voo das mesmas. Essa metodologia foi realizada no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Após a separação cromatográfica por gel filtração (item 3.3), 20 µL das frações eluídas de cada veneno crotálico foram liofilizadas e ressuspendidas em 5 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 %. Em seguida, 1 µL de cada fração foi co-cristalizada com 1 µL do ácido sinapínico (solução saturada em ACN/água/TFA 0,1 %) (matriz), pipetados sobre uma placa metálica para 96 ensaios (amostrador) e posteriormente, as amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF (Axima Performance,

Shimadzu). Os espectros foram obtidos utilizando-se o modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da.

3.4.2 Digestão enzimática em solução

O protocolo de digestão enzimática em solução foi empregado com o intuito de detectar as proteínas presentes nas frações dos venenos crotálicos eluídas por cromatografia líquida, seguindo os seguintes passos: redução, alquilação e digestão tríptica.

Redução: as amostras (20 μ L de cada fração) foram previamente liofilizadas e após isso, foram ressuspensas em 10 μ L de água + 40 μ L de ureia 8 M (em Tris-HCL 100 mM, pH. 8,5), + 1,2 μ L de Tris(2-carboxyethyl)*phosphine* 100 mM (TCEP). As frações foram então incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente (TA).

Alquilação: após a redução, foi adicionado 4,6 μ L de iodoacetamida (IAA) 100 mM (em água) e em sequência, as amostras foram submetidas ao processo de incubação (1 hora em TA), na ausência de luz.

Digestão tríptica: para isso, foram adicionados às amostras 130 μ L de Tris-Hcl 100 mM (pH 8.5) + 10 μ L de tripsina (10 nmol/ μ L) e posteriormente incubadas a 37 °C, durante 18 horas. Após a incubação, os materiais foram liofilizados.

3.4.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

As amostras provenientes da digestão tríptica foram submetidas à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) utilizando um sistema UFLC binário (20A *Prominence*, Shimadzu® Co., *Japan*) conectado ao espectrômetro de massas do tipo *Electrospray - Ion Trap - Time of Flight* (ESI-IT-ToF) (Shimadzu® Co., Japão). O procedimento de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi realizado no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. Assim, as amostras foram então ressuspensas em

água/Ácido Acético 0,1 % e analisadas em uma coluna C18 (*Discovery C18*, 5 µm, 50 mm x 2,1 mm), utilizando (A) Ácido Acético 0,1 %/água (1:999) e (B) Ácido Acético 0,1 %/Acetonitrila (ACN)/água (1:900:99) como solventes. O fluxo aplicado foi de 0,2 mL/min com gradiente do solvente B de 5 a 40 % durante 35 minutos, a 37 °C, e monitorado a 214 nm pelo detector Shimadzu® SPD-M20A PDA.

Após o processo cromatográfico, as amostras eluídas foram analisadas pelo espectrômetro de massas utilizando as voltagens de 4,5 KV da interface, a 200 °C e 1,8 KV do detector. A fragmentação foi induzida pelo gás de colisão argônio com 50 % de energia e os espectros MS foram obtidos no modo positivo e adquiridos na faixa de 350 - 1400 m/z. Os íons fragmentados foram eleitos automaticamente entre 390 - 1400 m/z e os espectros MS/MS foram coletados ao redor de 350 – 1400 m/z. Para avaliar o perfil da fragmentação das amostras, foi utilizado o programa Peaks Studio® V8.5 (MA et al., 2003) e o banco de dados Squamata (táxon 8509) foi empregado nas análises proteômicas.

3.5 Zimografia

3.5.1 Determinação da atividade caseinolítica dos venenos de *Crotalus ssp.*

A capacidade dos venenos das *Crotalus ssp.* de hidrolisar a caseína foi verificada de acordo com o método de HEUSSEN e DOWDLE (1980), com ligeiras modificações. Resumidamente, caseína (2,0 mg/mL) foi incorporada como substrato à solução de preparo do gel de poliacrilamida. Primeiramente, para analisar a capacidade de degradação das amostras estudadas frente ao substrato, os venenos crotálicos (25 µg/20 µL) foram diluídos em tampão de amostra em condições não redutoras, omitindo-se o passo de fervura das amostras e aplicados ao gel. A separação eletroforética foi realizada a 90 V e após este procedimento, o SDS foi removido por duas lavagens dos géis em uma solução de Triton X-100 2,5 %, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Os géis foram então incubados a 37 °C, por 16 horas, em uma solução de Tris 50 mM pH 7,4 contendo CaCl₂ 5 mM. Após esse período, os géis foram corados com

Coomassie blue R-250 e, em seguida, imersos em solução descorante para retirar o excesso do corante. As áreas claras nos géis indicaram as regiões onde ocorreu atividade enzimática.

3.5.2 Determinação da atividade gelatinolítica dos venenos de *Crotalus* ssp. na presença e ausência de inibidores enzimáticos

Para avaliar a atividade gelatinolítica entre venenos das *Crotalus* ssp., 2 mg/mL do substrato (gelatina) foi incorporado ao preparo do gel de poliacrilamida e as etapas seguintes foram as mesmas descritas no item 3.3.

Para analisar qualitativamente as gelatinases presentes nos venenos estudados, foram utilizados inibidores de proteases: ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e fenilmetanosulfonila (PMSF), os quais interagem com proteínas das famílias, metalopeptidases e serinopeptidases, respectivamente, inibindo suas atividades catalíticas. Assim, as amostras foram incubadas separadamente com EDTA 25 mM ou PMSF 6,6 mM a 37 °C, por 15 minutos e em seguida aplicadas aos géis. O procedimento experimental executado foi o mesmo citado acima. As áreas claras nos géis indicaram as regiões onde ocorreu atividade enzimática.

3.5.3 Determinação da atividade hialuronidásica dos venenos de *Crotalus* ssp em pHs 5,0 e 7,4

Com intuito de avaliar a hidrólise do ácido hialurônico (AH) induzida pelos venenos crotálicos, foi empregada a técnica descrita por MIURA e colaboradores (1995) com algumas modificações. Para isso, o AH (170 µg/mL) foi incorporado ao gel de poliacrilamida (12 %) e, para analisar a capacidade de degradação das amostras estudadas frente ao substrato, os venenos crotálicos (25 µg/20 µL) foram diluídos em tampão de amostra em condições não redutoras, omitindo-se o passo de fervura das amostras e aplicados ao gel. As etapas seguintes estão descritas no item 2.3, sendo que,

distintamente, neste protocolo, um dos géis foi incubado com tampão acetato pH 5,0 e o corante utilizado foi o azul de *Alcian*. As áreas claras nos géis indicaram as regiões onde ocorreu atividade enzimática

3.6 Determinação da atividade azocaseinolítica dos venenos de *Crotalus ssp.*

Para determinar a atividade azocaseinolítica, induzida pelos venenos estudados foi utilizado o substrato sulfanilamida-azocaseína (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA). A azocaseína consiste em uma caseína conjugada a um corante laranja e com a hidrólise do substrato, peptídeos ligados ao cromóforo são gerados, ficando dispersos no sobrenadante após a precipitação do substrato íntegro com ácido tricloroacético, sendo possível avaliar a atividade enzimática em comprimento de onda de 450 nm.

O procedimento experimental foi o mesmo utilizado por GOMES e colaboradores (2011), com ligeiras modificações. Primeiramente, as amostras (10 µg/50 µL) foram incubadas separadamente com 225 µL da solução CaCl₂ 20 mM, pH 8,6. Além disso, foi adicionado 225 µL da solução azo-caseína (0,5 % de azo-caseína diluído em Tris-HCl 10 mM + NaCl 100 mM pH 7,6). Após isso, as amostras foram incubadas em banho-maria por 1 hora a 37 °C e em seguida a reação foi interrompida com o acréscimo de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA 15%). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13.000 x g por 10 minutos) e o sobrenadante foi misturado com NaOH (0,5 M) na proporção 1:1. As amostras (250 µL) foram então transferidas para uma placa de 96 poços e lidas no comprimento de onda de 405 nm. As amostras foram analisadas em triplicata. O cálculo para a atividade específica foi realizado conforme a equação abaixo.

$$\text{Atividade (U/mg)} = \frac{(A_{405 \text{ amostra}} - A_{405 \text{ branco}})}{[\text{Tempo (min)}] \times [\text{massa (mg) da amostra}]}$$

3.7 Determinação da atividade fosfolipásica dos venenos de *Crotalus ssp.*

Para avaliar a atividade fosfolipásica dos venenos crotálicos, foi empregado o método descrito por MORA-OBANDO et al., (2014). Para isso, foi utilizado o substrato sintético NOBA (ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico - *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA). Este método se baseia na hidrólise do substrato pela enzima liberando o produto cromogênico (p-nitrofenol). Os venenos crotálicos (2 mg/mL) em solução salina 0,9 %) foram diluídos no Tampão de Reação (Tris 10 mM + NaCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM, pH 8,0) estabelecendo uma concentração final de 5 µg/25 µL por poço. Foram adicionados 25 µL de substrato (1 mg/mL em acetonitrila). As amostras, em triplicata, foram então incubadas a 37 °C por 60 minutos e as respectivas absorbâncias foram mensuradas em 405 nm. O cálculo da atividade específica foi baseado no trabalho de HOLZER e MACKESSY (1996), onde 0,1 UA a 405 nm corresponde a 25,8 nmols de cromóforo liberado e o resultado foi expresso como atividade específica em nmols produzidos/minuto.

3.8 Atividade Peptidásica

A atividade peptidásica dos venenos foi avaliada utilizando o princípio de ERLANGER e colaboradores (1961), com algumas modificações, utilizando o substrato cromógeno L-BAPA[®] (n-Benzoil-L-Arg-Pna). Inicialmente, as amostras foram incubadas no tampão de reação (Tris 50 mM + CaCl 20 mM, pH 8,2) (5µL amostra + 5 µL Tampão) + L-BAPA[®] (125 µL) a 25 °C por 10 minutos e após esse tempo, a reação foi parada com ácido acético 30 % (25 µL). O cálculo da atividade específica foi realizado considerando que 1 mmol de nitroanilida absorve 9,96 UA a 405 nm. o resultado foi expresso como atividade específica em nmols produzido/minuto (tempo de incubação). O ensaio foi realizado em triplicata.

3.9 Western Blotting

Os componentes dos venenos crotálicos (25 µg/20 µL) foram separados por SDS-PAGE, como descrito anteriormente, e transferidos sob corrente constante de 0,85 mA/cm², durante 1,5 horas, para uma membrana de nitrocelulose, de acordo com a técnica descrita por TOWBIN e colaboradores (1979). As membranas foram incubadas por 1,5 horas, com solução bloqueadora, (tampão Tris-salina pH 7,4 contendo 3 % de leite em pó desnatado Mólico – Nestlé – SP). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, com soro anticrotálico (SAC) ou soro antibotrópico (SAB) (1:5000) ou soro antijararagina (1:3000) diluídos em TBS. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, com conjugado anti-IgG de cavalo marcado com peroxidase, diluído 1:8000 (para SAC e SAB) e conjugado anti-IgG de coelho 1:3000 (para antijararagina) em tris-salina. As membranas foram mais uma vez lavadas e os componentes antigênicos revelados pela adição do cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) na presença de H₂O₂ 0,03 %. A reação foi interrompida utilizando água.

3.10 Análise estatística

Para a realização da comparação entre os grupos amostrais foi efetuada a análise de variância de fator único (*One-Way-ANOVA*). Quando a análise foi significativa, foi então empregado o teste de Holm-Sidak na comparação múltipla em os grupos amostrais. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O software utilizado foi o *SigmaStat*® 3.5.1.

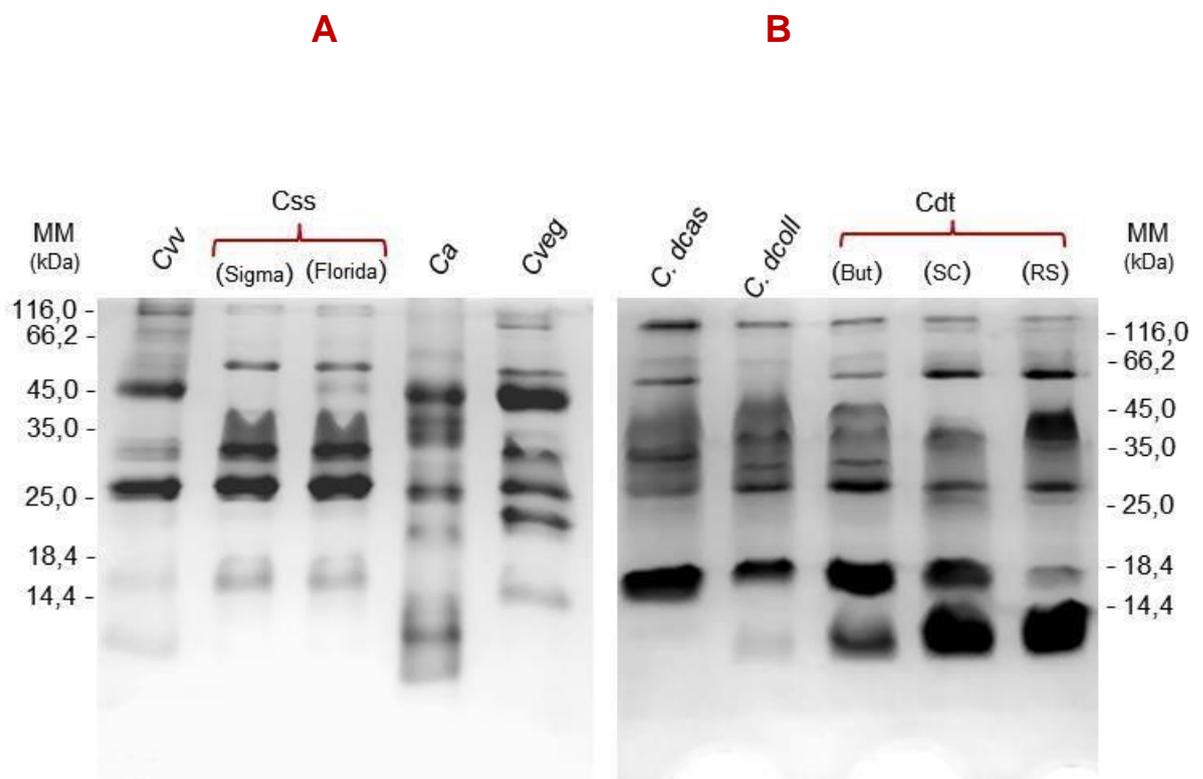
4 RESULTADOS

4.1 Perfil eletroforético dos venenos de *Crotalus* ssp.

Com o intuito de analisar o perfil eletroforético dos venenos de *Crotalus* ssp. foi realizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % na presença de SDS. A análise revelou componentes entre 116 kDa e abaixo de 14 kDa em todos os venenos analisados, com algumas distinções entre as amostras Norte-Americanas em comparação com as Sul Americanas, principalmente na intensidade de coloração das proteínas (Figura 5). Na figura 5A pode ser observado que os venenos analisados apresentaram perfil proteico semelhante, com componentes de massa molecular reveladas nas regiões de 116, 45, 25, 17 e abaixo de 14 kDa. Além disso, distintamente, observa-se ausência de componentes proteicos por volta de 15 kDa no veneno de *C. atrox* e a amostra de *C. vegrandis* apresentou três bandas nas regiões de 30 a 22 kDa aproximadamente, sendo que ao redor de 45 kDa, nota-se proteínas reveladas mais intensamente. Entre os lotes dos venenos de Csp, ressalta-se um padrão eletroforético quase idêntico, contudo, é possível observar um componente fracamente revelado na região de 45 kDa apenas no veneno proveniente do serpentário da Flórida-EUA.

Na figura 5B, o perfil proteico das amostras apresentou um padrão similar entre os componentes identificados, além disso, bandas coradas acima de 116 kDa, nas regiões entre 45 a 25 kDa e ao redor 14 kDa foram reveladas em todos os venenos. Além disso, observam-se proteínas majoritárias com intensidade de coloração variável com aproximadamente 14 kDa, (com exceção do veneno de Cdcas), sendo que a revelação foi mais acentuada entre os venenos de Cdt (SC e RS). Em relação aos venenos da subespécie *C. d. terrificus*, observa-se poucas diferenças no padrão proteico, porém, ao redor de 45 kDa é notável uma banda no lote do Butantan, a qual não é observado nos outros lotes. Além disso, evidencia-se que, por volta de 40 kDa, o veneno de Cdt (RS) apresentou uma banda fortemente corada quando comparada não apenas com os outros lotes, mas também entre todos os venenos Sul-Americanos.

Figura 5 – Perfil eletroforético dos venenos. **A)** *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Css), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg). **B)** *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). Os venenos (25 µg/20 µL) foram separados por SDS-PAGE (12 %) e corados com *Coomassie Blue*. Os números ao lado correspondem aos marcadores de massa molecular (kDa).

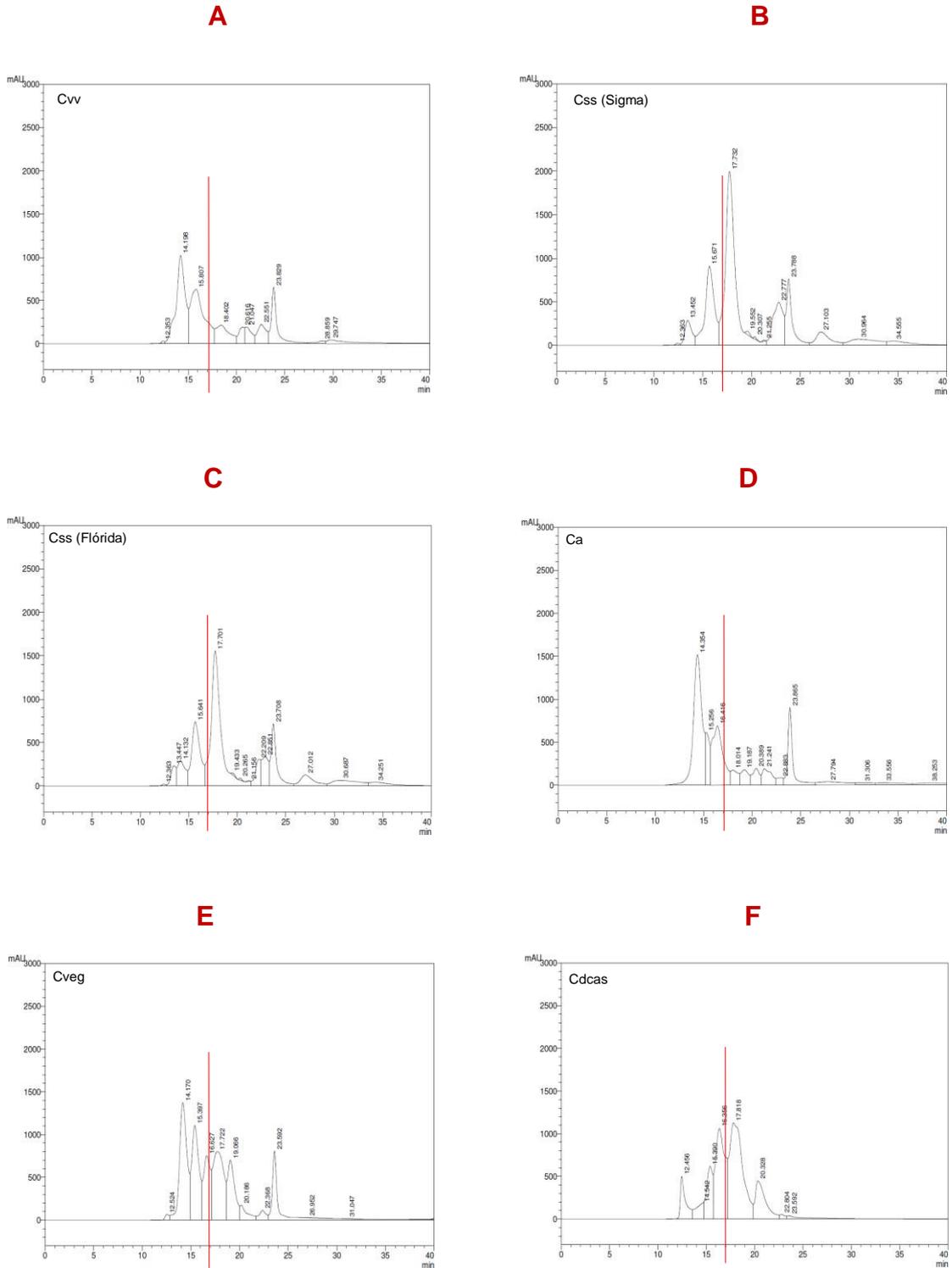


Fonte: próprio autor

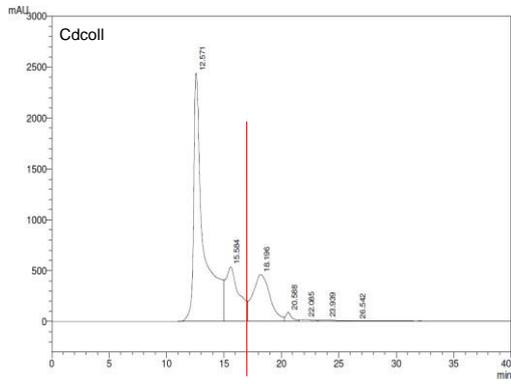
4.2 Fracionamento dos venenos de *Crotalus* ssp. por cromatografia de exclusão molecular

O fracionamento dos componentes dos venenos crotálicos foi efetuado conforme o item 3.3 e a técnica consiste em separar as moléculas das amostras com base em seu raio hidrodinâmico (massa molecular). Conforme a Figura 6 observa-se que o processo cromatográfico para cada veneno foi realizado de 0 a 40 minutos, sendo que a coleta dos eluatos (0,5 mL/tubo) foi iniciada a partir de 10 minutos, e cada tubo foi numerado a partir deste tempo. Os perfis foram avaliados separando-se os cromatogramas entre picos de alta massa (tempo de retenção abaixo de 17 minutos) e baixa massa (TR acima de 17 minutos). Observa-se que os venenos Norte Americanos (Cvv e Ca) exibiram picos de alta massa molecular com área relativa mais abundantes em comparação aos componentes eluídos após esse tempo (Figura. 6 A e D), contudo o veneno de ambos os lotes de Css (Sigma e Flórida), mesmo possuindo proteínas de maior massa molecular, apresentaram um padrão de distribuição entre as proteínas semelhante e com um pico majoritário no tempo de eluição de 14 a 16 minutos, o que refere-se à moléculas com massa molecular em torno de 15 kDa (Figura 6 B e C). Em relação ao perfil cromatográfico do veneno da serpente proveniente da Venezuela (*C. vegrandis*), é possível visualizar uma distribuição homogênea entre os componentes (Figura 6 E). Os cromatogramas referentes às amostras Sul Americanas, demonstraram que os venenos são constituídos com maior abundância de componentes de menor massa molecular, principalmente de proteínas de aproximadamente 15 kDa, eluídas entre 18 a 20 minutos, além disso, nos lotes de Cdt (SC e RS) o padrão de distribuição proteica foi semelhante (Figura 6 F, H, I e J). Porém o perfil cromatográfico do veneno da espécie *C. d. collilineatus* foi distinto das demais amostras Sul Americanas, sendo possível visualizar um pico majoritário que foi eluído no tempo de 12 min (Figura 6 G).

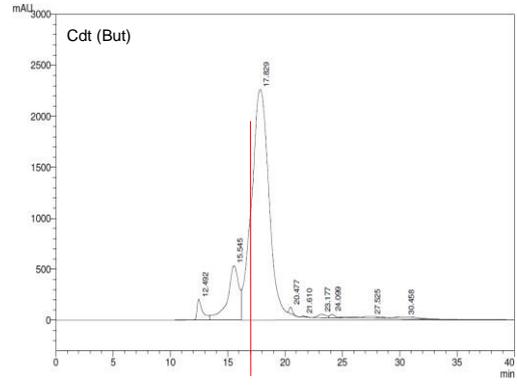
Figura 6 – Perfil cromatográfico dos venenos crotálicos. **A)** *C. viridis viridis*, **B)** *C. scutulatus*. *scutullatus* (Sigma), **C)** *C. scutulatus*. *scutullatus* (Flórida), **D)** *C. atrox* (Ca), **E)** *C. vegrandis* (Cveg). **F)** *C. d. cascavella* (Cdcas), **G)** *C. d. collilineatus* (Cdcoll), **H)** *C. d. terrificus* (But), **I)** *C. d. terrificus* (SC) e **H)** *C. d. terrificus* (RS). A absorvância dos eluatos abaixo, foi mensurada em 280 nm.



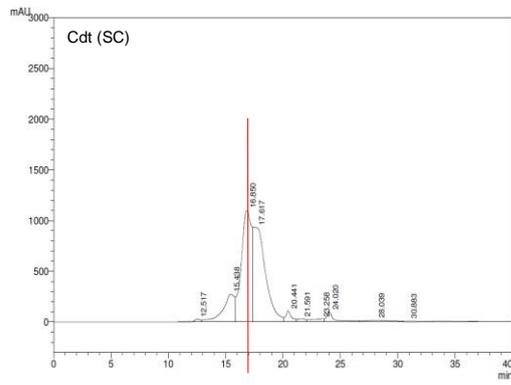
G



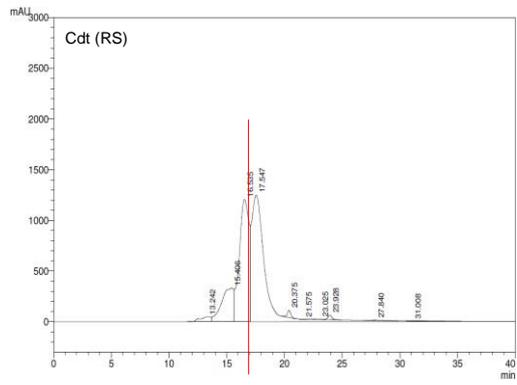
H



I



J



Fonte: Próprio autor

4.3 Proteoma dos venenos de *Crotalus* ssp.

A análise proteômica do veneno de Cvv foi realizada por LC-MS e pode ser observado na tabela 1 que foram identificados peptídeos referentes à proteínas já descritas em outros venenos de serpentes do gênero *Crotalus* ssp., sendo a maioria peptidases, além de proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAP quinase), LAAO, metalopeptidases das classes I e II, serinopeptidases, calicreína e co-ativador de receptor nuclear.

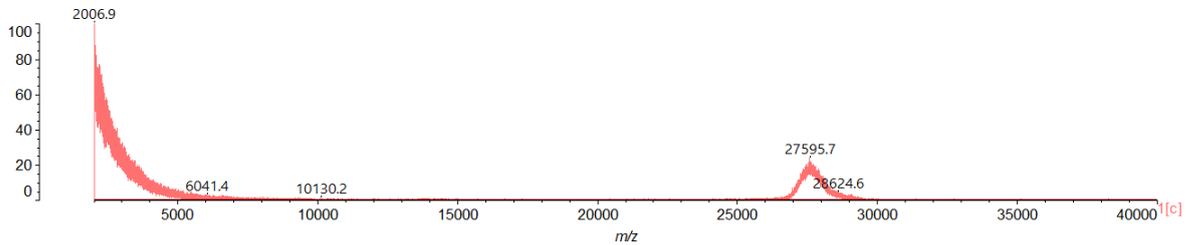
Tabela 1 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. viridis viridis*, pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão trípica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

<i>C. viridis viridis</i>						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
J3S058_CROAD	1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	K.SNFPQPK.L	816,4130	817,4322	4
T1E6V1_CROOH	2	LAAO-CohPH-1 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1	R.VIEIQNDR.E	1113,5778	557,8101	6
VM3V3_CROVV	22	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VMP-III OS=Crotalus viridis viridis PE=2 SV=1	R.MYEIVNTVNEIYR.Y	1642,8025	822,4016	8
			R.KKHDNAQLLTAIDLDR.V	1850,0010	617,6686	7
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7703	7
J3S3W0_CROAD	5	Snake venom metalloproteinase (Type II) 5h OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	K.NSVGIVQDHR.S	1123,5734	562,7766	9
VSPC_CROAD	17	Snake venom serine proteinase 12 OS=Crotalus adamanteus PE=1 SV=1	K.TVPNEDEQTR.V	1187,5419	594,7585	10
J3S0F3_CROAD	0	Nuclear receptor coactivator 3 isoform X7 OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	R.GPAESK.G	587,2914	588,2976	13
A0A1W7RB84_CROAD	8	Cadam10_SVSP-6 OS=Crotalus adamanteus PE=3 SV=1	K.IHLGVHSK.K	889,5134	445,7769	14
T1DP94_CROOH	14	Kallikrein-CohLL-7 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1	K.VFDYTDWIQSIAGKK.T	1882,9829	628,6578	16
VSP2_CROAT	14	Snake venom serine protease catroxase-2 OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1	K.KVPNEDEQTR.N	1214,5891	608,2869	11

Fonte: próprio autor

Os eluatos obtidos por cromatografia de exclusão molecular foram submetidos à espectrometria de massas por MALDI-ToF, sendo que, para o veneno de Cvv a ionização das amostras analisadas não foi satisfatória. A figura 7 ilustra o espectro referente ao tubo 11 (única amostra detectada), onde foram identificados componentes com massa molecular de aproximadamente 27 e 28 kDa e além disso com a metodologia empregada, o equipamento registrou componentes de 6 e 10 kDa, porém com menor intensidade na detecção dos íons.

Figura 7 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. viridis viridis* após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. Amostra referente ao eluato do tubo 11.



Fonte: próprio autor

Após a digestão enzimática por tripsina e subsequente análise proteômica por LC-MS dos eluatos do veneno de *C. s. (Sigma)* o método empregado para análise de espectrometria foi capaz de identificar nas amostras, toxinas como as fosfolipases A₂ (subunidade da cadeia básica da Mojave toxina de *C. s. scutulatus*), LAAO, calicreínas, serinopeptidases e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP_s).

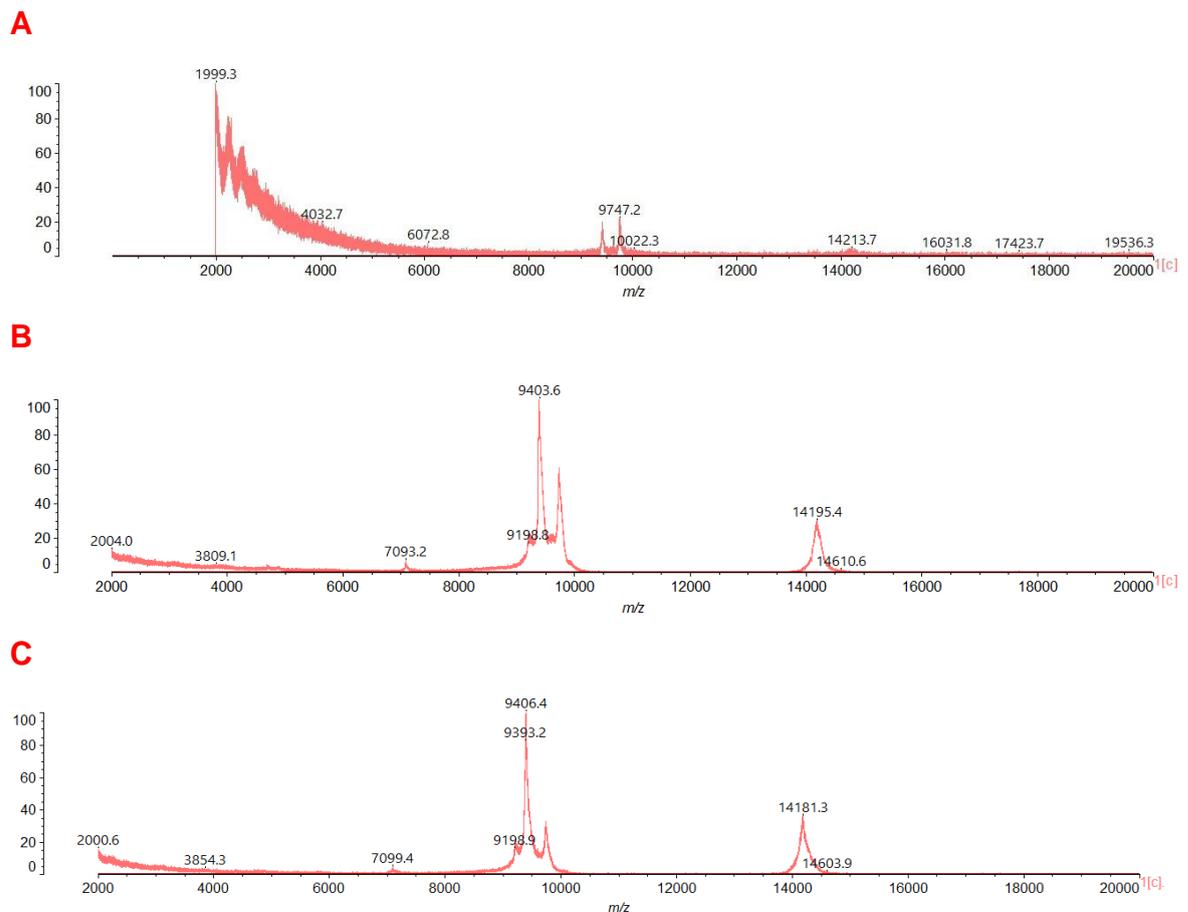
Tabela 2 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. scutulatus scutulatus* (Sigma), pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão triptica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

<i>C. s. scutulatus</i> (Sigma)						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
PA2BC_CRODU	80	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1	K.YGYMFYPDSR.C	1297,5437	649,7822	14
			K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,8134	15
			R.ILC(+57.02)AGILEGGK.D	1129,6165	565,8167	8
T1DP86_CROOH	39	Kallikrein-CohCI-5 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1	L.SLPSSPPSVGSVC(+57.02)R.I	1428,7031	715,3532	10
			R.AAYPELPATSR.I	1174,5981	588,3118	11
			K.ILNEDEQTRDPK.E	1456,7157	486,5736	12
J3S3W7_CROAD	14	Snake venom serine proteinase 7c OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	K.DNEKDKDIMLIR.L	1488,7606	497,2727	9
			L.DTTPPAGPDVGPR.G	1177,5728	589,7895	20
A0A0F7Z7G5_CROAD	10	Bradykinin potentiating and C-type natriuretic peptides 1b OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	T.PPAGPDVGPR.G	961,4980	481,7495	20
			L.SLGPAAALDTPPAGPDVGPR.G	1915,9639	958,9469	17
A0A1J0R046_CROSS	80	Phospholipase A2, group IIG B2, Mojave toxin B-subunit OS=Crotalus scutulatus scutulatus	R.KNAIPFYAF.Y	1069,5596	535,7868	14
			R.RSLSTYK.Y	853,4658	427,7513	14
			R.VIEIQQNR.E	1113,5778	557,8079	6
OXLA_CROAD	26	L-amino-acid oxidase OS=Crotalus adamanteus PE=1 SV=1	R.DVNRASENPSG.I	1144,5109	573,2727	7

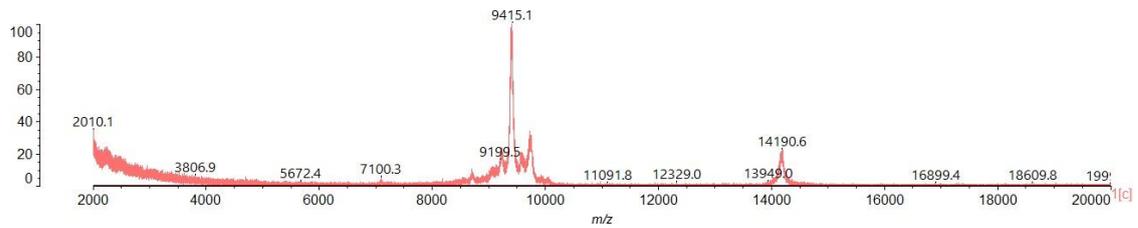
Fonte: próprio autor

Em relação à espectrometria de massas por MALDI-ToF, a figura 8 apresenta apenas os espectros de massas que apresentaram ionização das amostras analisadas do veneno de *Css* (Sigma). No tubo 12 (Figura 8A) observa-se baixo sinal de componentes com razão de massa/carga de 9,7 e 10 kDa, contudo os outros tubos com amostras que foram também detectadas pelo método utilizado (tubos 14, 15 e 17 – Figura 8 B, C e D respectivamente), apresentaram picos mais proeminentes nas regiões ao redor de 9 a 10 kDa e 14 kDa, os quais possivelmente correspondem respectivamente às subunidades básica e ácida da Mojave toxina.

Figura 8 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. s. scutulatus* (SIGMA) após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. **A)** Amostra referente ao eluato do tubo 12; **B)** tubo 14; **C)** tubo 15 e **D)** tubo 17.



D



Fonte: próprio autor

O proteoma dos eluatos obtidos por cromatografia de exclusão molecular do veneno de *Css* (Flórida) apresentou fragmentos peptídicos de enzimas identificadas em outros venenos crotálicos registrados nos bancos de dados. As toxinas identificadas estão listadas na tabela 3 e podem ser identificadas proteínas pertencentes às classes das PLA₂, (cadeia básica de PLA₂ do veneno de *C. s. scutulatus* e peptídeos identificados do veneno de *C. adamanteus*), caliceínas, serinopeptidases, metalopeptidases e LAO. Porém, não foram identificados BPP_s, como visto na tabela 2 referente à mesma subespécie (*Css* Sigma).

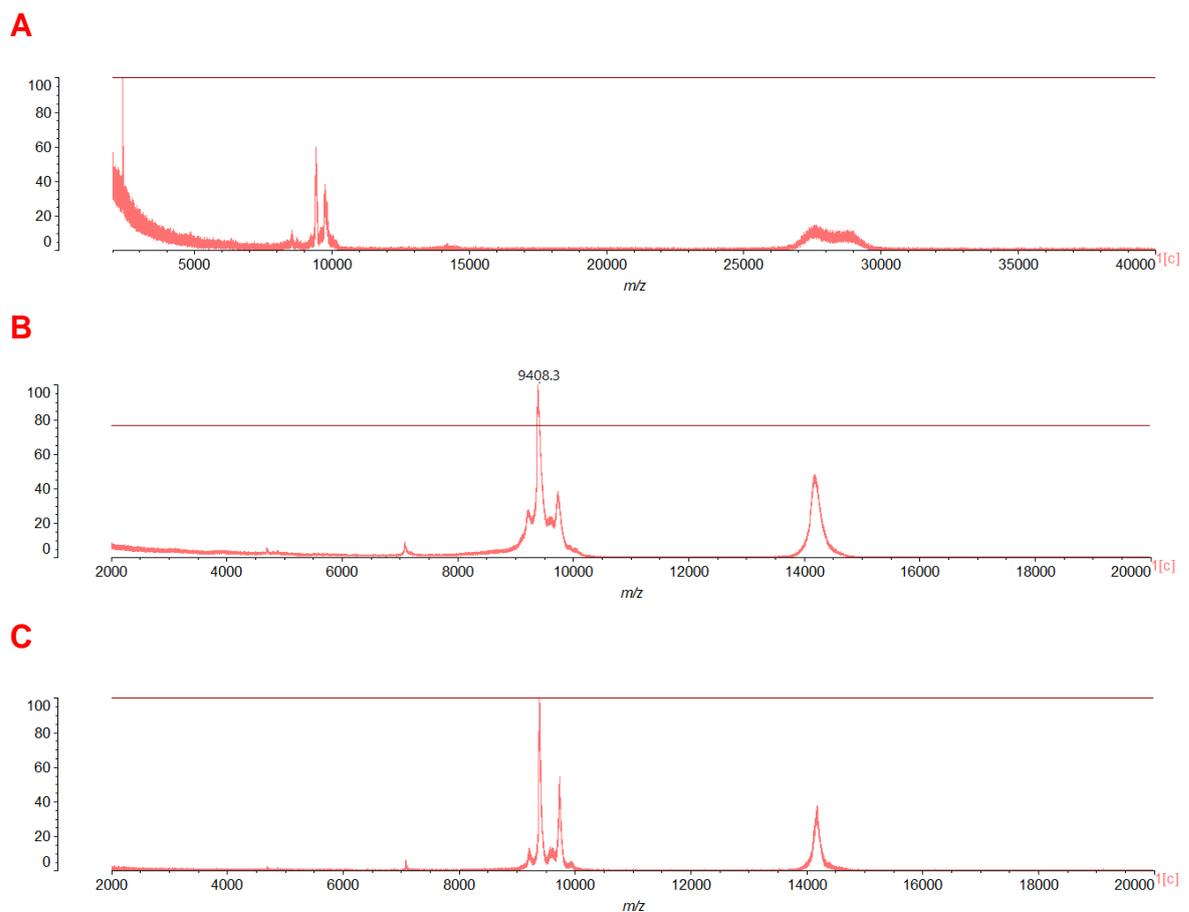
Tabela 3 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. scutulatus scutulatus* (Flórida), pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão triptica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

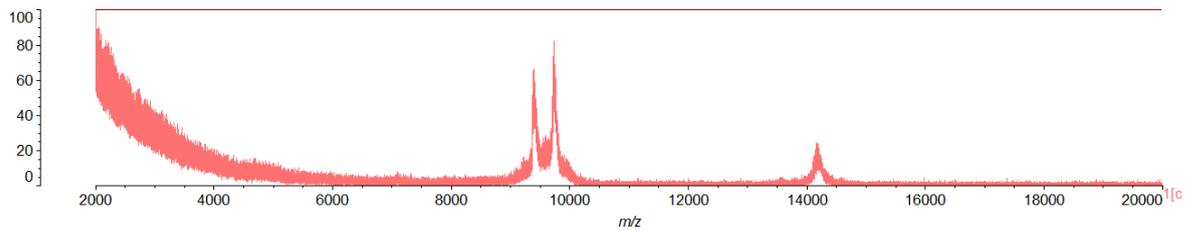
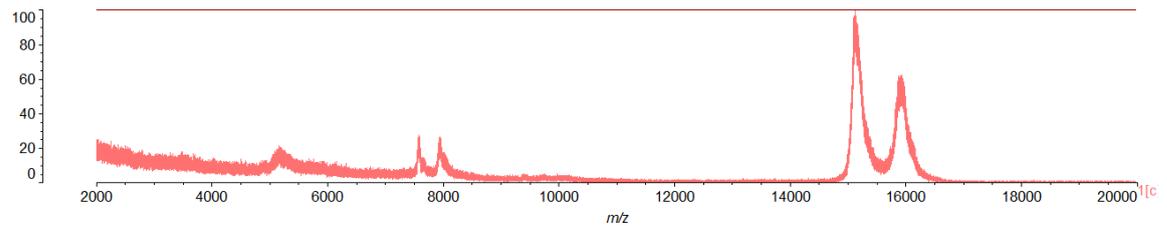
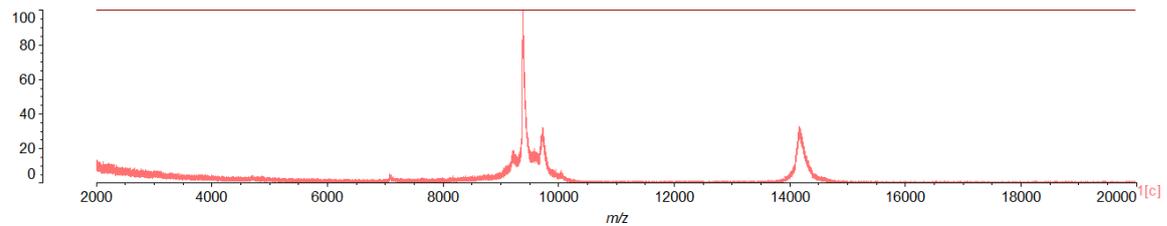
C. s. scutulatus (Flórida)						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
PA2B1_CROSS	78	Basic phospholipase A2 Mtx-b OS=Crotalus scutulatus scutulatus PE=1 SV=1	K.YGYMFYPDSR.C	1297,5437	649,776	13
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,219	12
T1DP95_CROOH	37	Kallikrein-CohLL-2 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1	K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,801	16
			R.TVPNEDEQTR.V	1187,5419	594,776	10
A0A1W7RB66_CROAD	23	Cadam10_SVSP-12 OS=Crotalus adamanteus PE=3 SV=1	R.TLC(+57.02)AGILEGGK.D	1117,5801	559,835	10
			R.IMGWGTISPTK.K	1189,6166	595,808	14
			V.GGDEC(+57.02)NINEHR.S	1299,5262	650,768	15
			K.IILNEDEQTRDPK.E	1456,7157	486,579	11
OXLA_CROAD	14	L-amino-acid oxidase OS=Crotalus adamanteus PE=1 SV=1	R.VIEIQQNDR.E	1113,5778	557,799	6
			K.NGLTATSNPK.R	1001,5142	501,773	7
VSP2_CROAT	13	Snake venom serine protease catroxase-2 OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1	R.TLC(+57.02)AGIPEGGK.D	1101,5488	551,796	11
VM3VB_CROAT	12	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VAP2B OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1	R.LYC(+57.02)KDNSPGQNNPC(+57.02)K.M	1793,7825	598,941	8
			R.FVELFLVVDKAMVTK.N	1737,9739	580,332	8
			R.FVELFLVVDK.A	1207,6852	604,842	7
			R.NQKGNYYGYC(+57.02)R.K	1421,6146	711,806	8
			Y.TLNAFGEWR.K	1092,5352	547,3	8
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,757	8
J3SBP4_CROAD	20	Phospholipase A2 4 OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.A	1504,5356	753,271	13
			G.SLVQFETLIMK.V	1307,7159	654,862	15

Fonte: próprio autor

Os resultados de MALDI-ToF/ToF das amostras do veneno de *Css* (Flórida) estão representados na figura 9. Pode ser observado na figura 9A que o tubo 10 apresentou componentes com razão massa/carga de aproximadamente 9,5 a 10 kDa e 27 a 30 kDa. Entre os tubos 12, 13, 14 e 16 (Figura 9 B, C, D e G) pode ser identificado componentes de 9 a 10 kDa, sendo que o sinal na região de 9.408 Da apresentou um pico mais definido, com exceção do tubo 15 (Figura 9 E) onde visualiza-se dois picos de aproximadamente 15,5 e 16 kDa e na região de 8000 Da nota-se dois picos, que são os íons²⁺ referentes aos de 15,5 e 16 kDa.

Figura 9 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. s. scutulatus* (Flórida) após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. **A)** Amostra referente ao eluato do tubo 10; **B)** tubo 12; **C)** tubo 13; **D)** tubo 14; **E)** 15 e **F)** 16.



D**E****F**

Fonte: próprio autor

A análise proteômica do veneno de Ca está representada na tabela 4 e observa-se que houve identificação de fragmentos de peptídeos, cujas proteínas descritas foram: proteínas indutoras de apoptose (Vap2), metalopeptidases, serinopeptidases e fosfolipases A₂ ácidas, ademais, foram identificadas fragmentos de peptídeos das toxinas de serpentes do gênero *Bothrops* sp. catrocollastatina (SVMP P-IIIb) e BATX (SVSP).

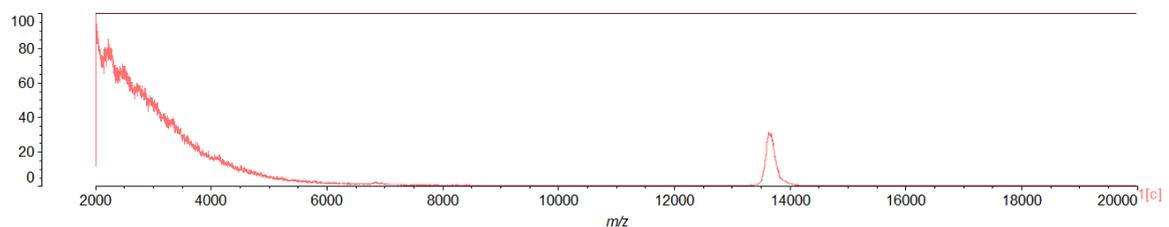
Tabela 4 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. atrox*, pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão trípica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

C. atrox						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
gij152149001	29	Chain B, Crystal Structure Of Vap2 From Crotalus Atrox Venom (Form 2-5 Crystal)	R.MYEIVNTVNEIYR.Y	1642,8025	822,4140	8
			R.NQKGNYYGYC(+57.02)R.K	1421,6146	711,8049	7
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7560	9
VM3VA_CROAT	20	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VAP2A OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1	R.MYELANTVNDIYR.Y	1600,7555	801,3763	8
			R.FVELVLVVDKAMVTK.N	1689,9739	845,9937	8
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7560	9
gij710354	18	catrocollastatin precursor OS=Crotalus atrox	Y.TLNAFGEWR.K	1092,5352	547,2672	9
			R.MYEIVNTVNEIYR.Y	1642,8025	822,4140	8
			R.NQKGNYYGYC(+57.02)R.K	1421,6146	711,8049	7
PA2A_CROAT	20	Acidic phospholipase A2 OS=Crotalus atrox PE=1 SV=2	R.MFYSNEDHKGMLPGTK.C	2081,9551	694,9819	9
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7560	9
			Y.TLNAFGEWR.K	1092,5352	547,2672	9
A0A1W7RB69_CROAD	11	Cadam10_SVSP-9 OS=Crotalus adamanteus PE=3 SV=1	G.SLVQFETLIMKI	1307,7159	654,8599	11
			G.SLVQFETLIMKIAGR.S	1704,9596	569,3323	11
			E.GSLVQFETLIMKI	1364,7373	683,3726	11
A0A1J0R063_CROAT	8	Phospholipase A2, group II G, acidic-Pla2-gA1 OS=Crotalus atrox GN=Pla2g2gA1 PE=3 SV=1	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.A	1504,5356	502,4801	12
A0A1L8D5W4_BOTAT	5	BATXSVSP3 OS=Bothrops atrox PE=2 SV=1	L.VVGGDEC(+57.02)DINEHR.F	1498,6470	500,5458	12

Fonte: próprio autor

Assim como nas amostras do veneno de *C. viridis viridis*, a ionização das amostras analisadas por espectrometria de massas (MALDI-ToF) não foram satisfatórias. Contudo, o tubo 12 (Figura 10) demonstra um pico contendo proteínas de razão massa/carga de aproximadamente 13.500 a 14.000 Da.

Figura 10 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. atrox* após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. Amostra referente ao eluato do tubo 12.



Fonte: próprio autor

O veneno de *C. vegrandis*, após a digestão trípica dos eluatos provenientes da cromatografia de gel filtração e análise por LC-MS apresentou

maior variabilidade nos componentes identificados quando comparado aos outros venenos crotálicos do presente estudo. Na tabela 5, estão relacionados os peptídeos que tiveram *hit* com outras proteínas já descritas em venenos de *Crotalus* ssp., as quais foram: metalopeptidases P-II e P-III, proteínas indutoras de apoptose, cadeias básica e ácida de PLA₂, LAAO, lectina tipo-C, calicreína, serinopeptidases e BPP.

Tabela 5 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. vegrandis*, pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão trípica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

<i>C. vegrandis</i>						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
gij743540688	16	Metalloproteinase (type III) 4a OS=Crotalus horridus	R.MYELANTVNDIYR.Y	1600,7555	801,4034	8
			R.FVELVLVVDKAMVTK.N	1689,9739	564,3440	7
			R.FVELVLVVDK.A	1159,6852	580,8587	9
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7668	8
			K.GNYGYGC(+57.02)R.K	1051,4181	526,7249	8
Y.TLNAFGEWR.K	1092,5352	547,2811	9			
gij144905068	15	vascular apoptosis-inducing protein 2A OS=Crotalus atrox	Q.LLTAIDLDR.V	1028,5865	515,3109	8
			L.LLTAIDLDR.V	915,5025	458,7795	7
A0A0K8RYQ8_CROHD	12	Metalloproteinase (Type II) 3a OS=Crotalus horridus PE=3 SV=1	K.LRPGAQC(+57.02)ADGLC(+57.02)C(+57.02)DQC(+57.02)R.F	2035,8445	679,6262	18
			K.YNGSDSKIR.R	1066,5043	534,2700	12
PA2BA_CRODR	75	Basic phospholipase A2 A OS=Crotalus durissus ruruima PE=1 SV=1	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	502,5261	17
			K.YGYMFYDPSR.C	1297,5437	649,7826	17
C9E7C4_CRODC	25	Acidic PLA2 OS=Crotalus durissus cascavella PE=2 SV=1	R.DNIPSYDKK.Y	1078,5294	540,2782	17
gij426205815	2	L-amino acid oxidase, partial OS=Crotalus durissus cumaniensis	R.NGLTVTSNPK.H	1029,5454	515,7921	9
J3S817_CROAD	16	C-type lectin 11b OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	K.GISYIWIGLR.V	1176,6655	589,3563	10
T1E7K6_CROOH	11	Kallikrein-CohPH-4 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1	A.LSLPSPSPSVGSVC(+57.02)R.I	1541,7871	771,9002	14
VSP1_CROAT	11	Snake venom serine protease catroxase-1 OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1	R.AAYPEYGLPATS.R	1394,6830	698,3350	19
G9DCH9_CROOH	10	C-type lectin 3 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1	K.YEDWAEESYC(+57.02)VYFK.S	1887,7661	944,8947	10
gij82217207	7	Bradykinin-potentiating peptide Cdt1b	L.DTTPAGPDGGPR.G	1135,5258	568,7687	20

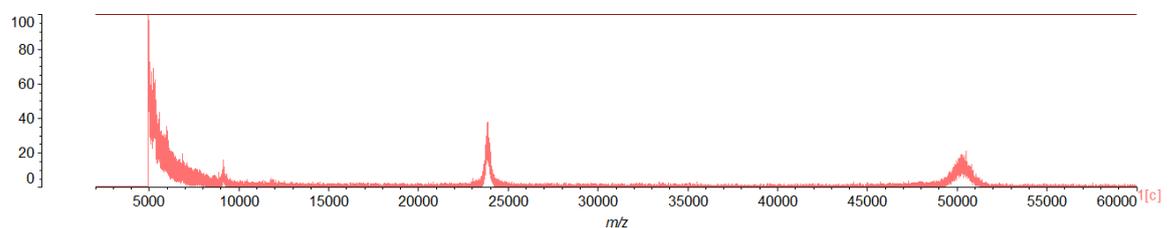
Fonte: próprio autor

Os íons detectados por MALTI-ToF/ToF dos eluatos obtido por cromatografia de exclusão molecular do veneno de Cveg estão ilustrados na figura 11. Pode ser visualizado que as amostras referentes aos tubos 7, 8 e 9 (Figura 11 A, B e C) apresentaram similaridade na detecção dos íons com razão massa/carga de aproximadamente 24000 e 51000 Da, porém apenas no tubo 9, observa-se componentes que foram detectados na região de 29,5 kDa. Em relação ao tubo 10 (Figura 11 D), é possível identificar um pico proeminente ao redor de 30 kDa e outro, com menor intensidade em torno de 14,5 kDa. Na figura 11 E, refere-se ao tubo 12 e podemos observar um sinal com “ruído” de componentes entre 5.000 a 10.000 Da, contudo, picos definidos com aproximadamente 14,3 e 23 kDa também foram detectados. No que se refere ao

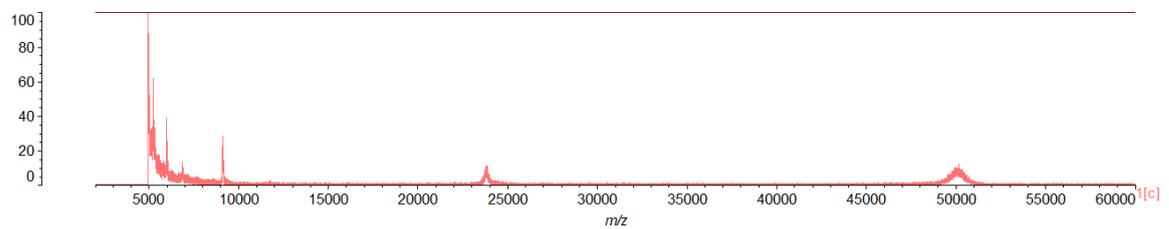
tubo 14 (Figura 11 F), foram detectados componentes com massa molecular na região de 9.400 e 14.200 Da. Quanto aos tubos 17, 18 e 19 (Fig. 11 G, H e I), picos com razão massa/carga de 14,800 e 14.200 Da aproximadamente são visualizados nas três amostras.

Figura 11 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. vegrandis* após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. **A)** Amostra referente ao eluato do tubo 7; **B)** tubo 8; **C)** tubo 9; **D)** tubo 10; **E)** 12; **F)** 14; **G)** 17; **H)** 18 e **I)** 19.

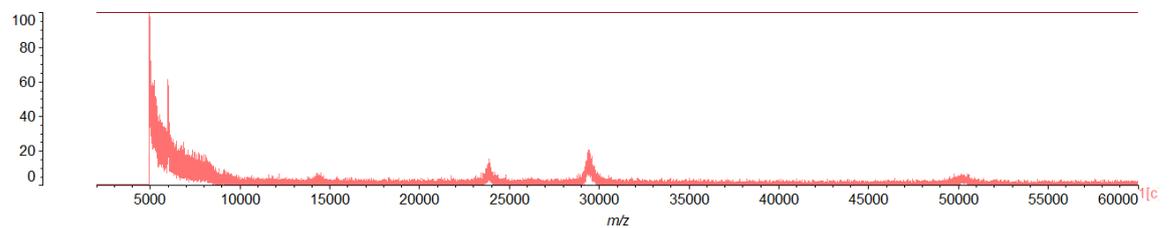
A



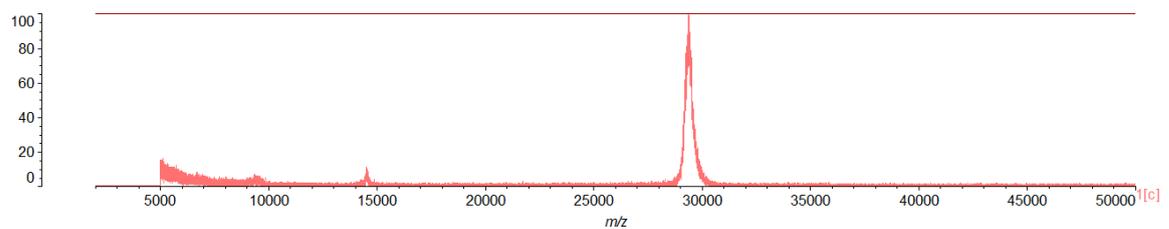
B



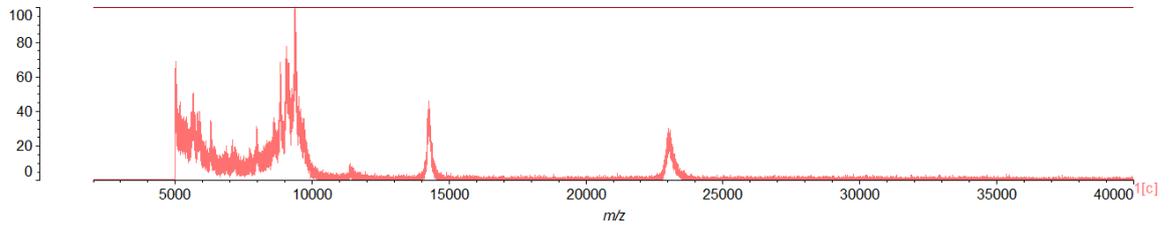
C



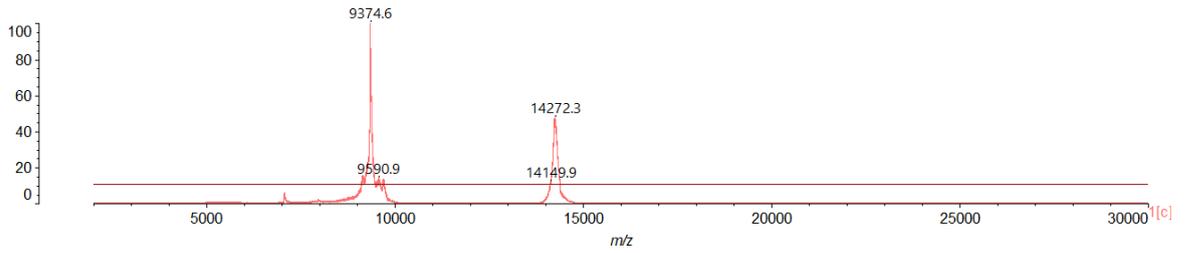
D



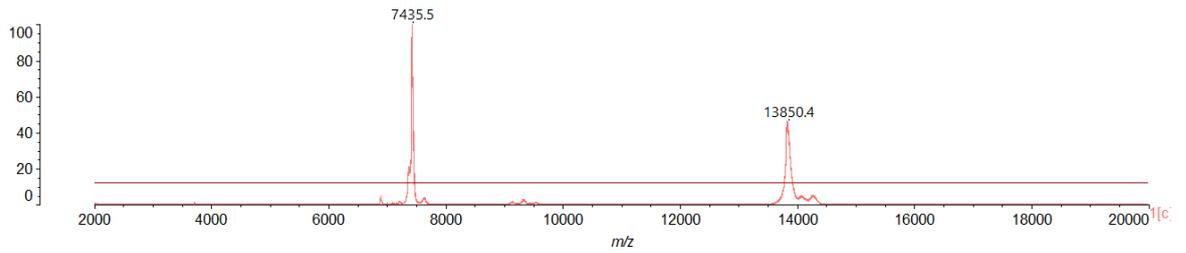
E



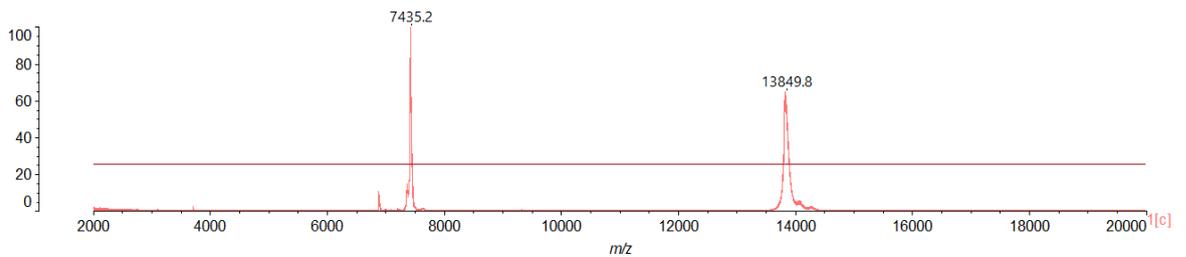
F



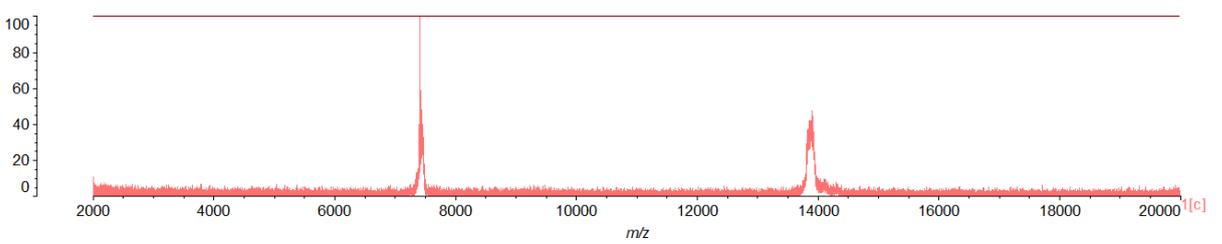
G



H



I



Fonte: próprio autor

Em relação ao veneno da serpente *C. d. cascavella* oriunda da região nordeste do Brasil, apenas enzimas da classe PLA₂ foram identificadas. Na tabela 6 é possível visualizar os fragmentos dos peptídeos gerados após a digestão trípica sendo que tanto a cadeia básica como a ácida, homólogas à crotoxina foram identificadas.

Tabela 6 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. d. cascavella*, pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão trípica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

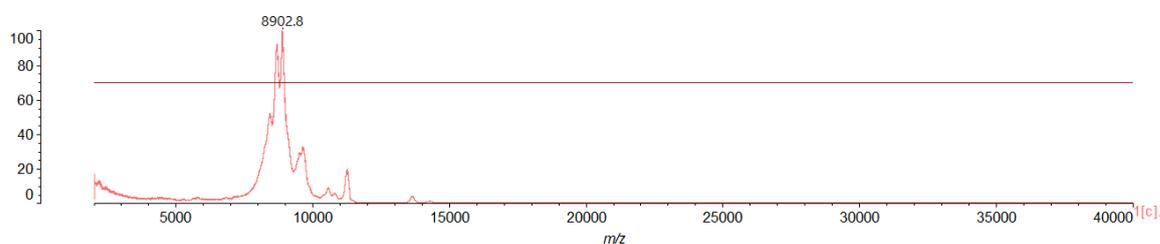
<i>C. cascavella</i>						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
PA2BC_CRODU	67	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1	R.SLSTYKYGYMFYPDSR.C	1976,8978	659,9698	16
			K.YGYMFYPDSR.C	1297,5437	649,7372	14
			K.NAIPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1484,6434	743,3428	14
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2244	12
			R.KNAIPFYAFY.G	1232,6229	617,2773	15
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7567	14
PA2BA_CRODM	47	Basic phospholipase A2 10 OS=Crotalus durissus cumanensis PE=1 SV=1	R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6820	16
			Y.KNEYMFYPDSR.C	1448,6394	725,3232	12
PA1A_CRODU	38	Phospholipase A2 homolog crotoxin acid subunit CA OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1	G.SLVEFETLMMK.I	1326,6564	664,3409	10
			K.AAAIC(+57.02)FR.N	807,4061	404,7090	10
			K.LTGC(+57.02)DPTTD.V	978,3964	979,3920	14

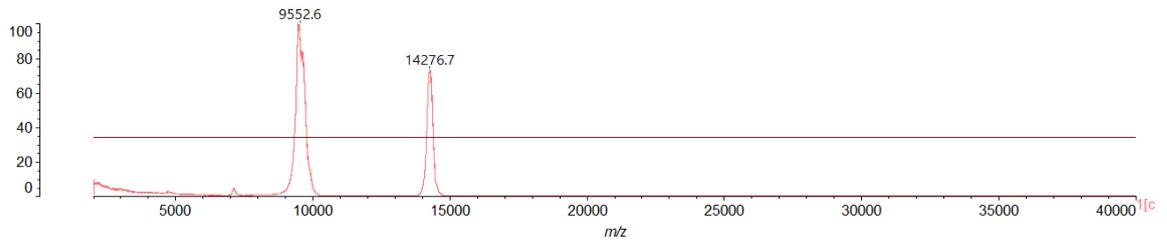
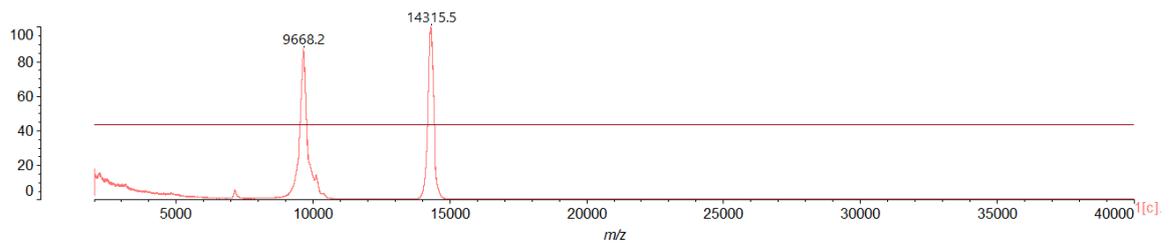
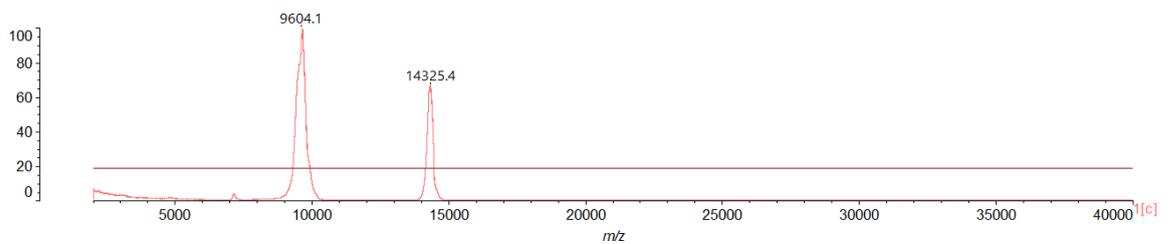
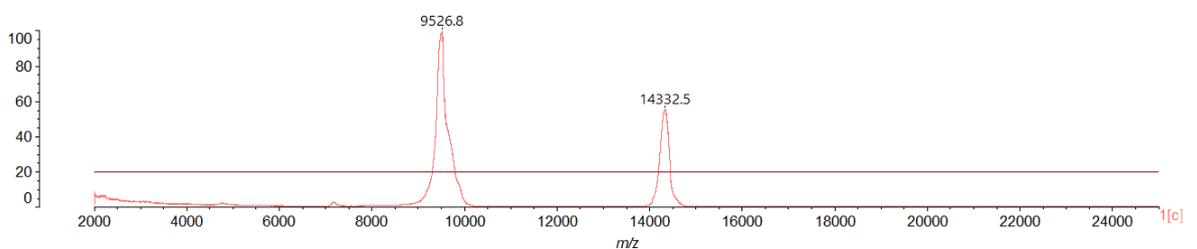
Fonte: próprio autor

Os resultados de MALDI-ToF/ToF das amostras do veneno de Cdcas estão representados na figura 12. Espectros de massa entre 8 a 11,5 kDa foram detectados no tubo 10 (Figura 12 A). Além disso, os tubos 12, 14, 15 e 16 apresentaram componentes de massa molecular semelhantes, com aproximadamente 9.500 e 14.300 Da.

Figura 12 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. d. cascavella* após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. **A)** Amostra referente ao eluato do tubo 10; **B)** tubo 12; **C)** tubo 14; **D)** tubo 15 e **E)** 16.

A



B**C****D****E**

Fonte: próprio autor

O veneno de *C. d. collilineatus*, após a digestão trípica dos eluatos provenientes da cromatografia de gel filtração e análise por LC-MS, assim como o veneno de *C. d. cascavella* apresentou enzimas da classe das fosfolipases A₂ tanto as cadeias básica e ácida, homólogas à crotoxina, conforme apresentado na tabela 7.

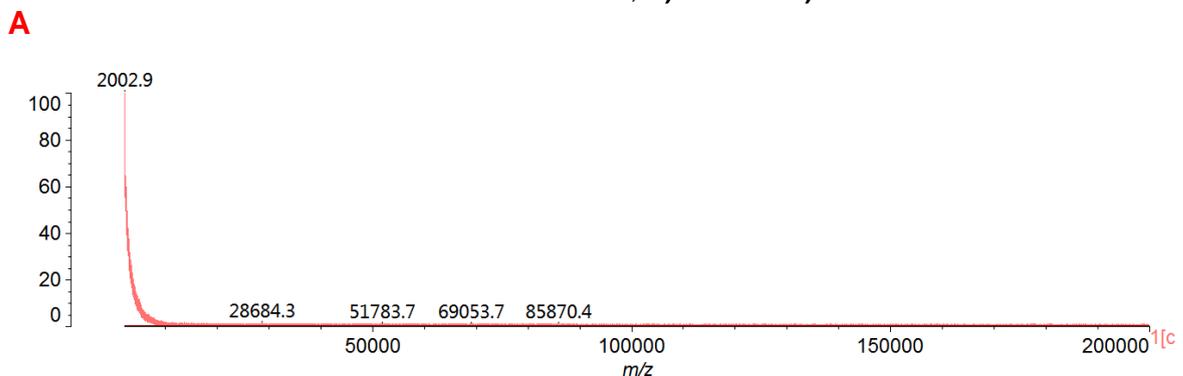
Tabela 7 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. durissus collilineatus*, pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão trípica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

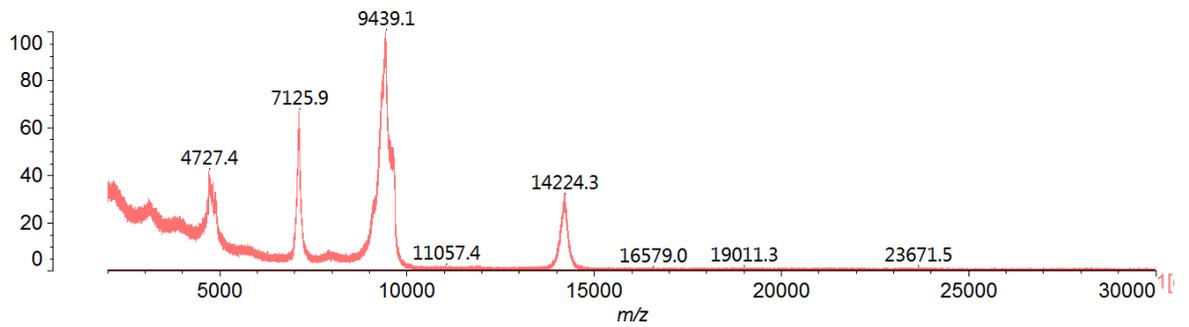
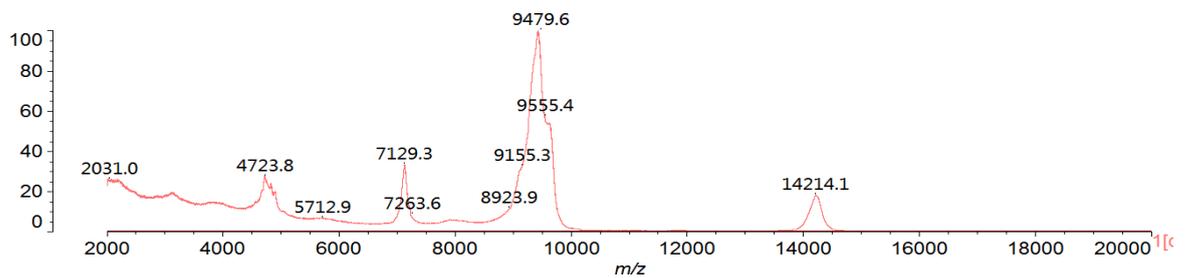
<i>C. collilineatus</i>						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
PA2BA_CRODR	81	Basic phospholipase A2 A OS=Crotalus durissus ruruima PE=1 SV=1	K.YGYMFYPDSR.C	1297,5437	649,7307	6
			K.GTWC(+57.02)EEQC(+57.02)EC(+57.02)DR.V	1741,6494	871,8286	6
			K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	1079,8132	6
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2739	5
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	763,0632	6
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965,3695	483,7552	6
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2325	6
			K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,8174	6
gij171848870	40	Chain D, Crotoxin B, The Basic Pla2 From Crotalus Durissus Terrificus.	K.MIKFETR.K	923,4899	462,8076	6
gij62697	36	crotoxin CB2 OS=Crotalus durissus	R.SLSTYKNEYMFYPDSR.C	1999,8986	667,5853	14

Fonte: próprio autor

Os eluatos obtidos por cromatografia de exclusão molecular do veneno de *C. d. collilineatus* foram submetidos à espectrometria de massas por MALDI-ToF e a figura 13 apresenta os íons detectados. Observa-se que no tubo 4 não houve sinal (Figura 13 A). Contudo, os eluatos referentes aos picos 5 e 6 (Figura 13 B e C), apresentaram maior variabilidade na detecção dos íons, os quais indicaram serem constituídos de componentes de aproximadamente 4.700, 7.200, 9.400 e 14.200 Da.

Figura 13 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. d. collilineatus* após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. **A)** Amostra referente ao eluato do tubo 4; **B)** tubo 5 e **C)** tubo 6.



B**C**

Fonte: próprio autor

Em relação ao veneno de *C. d. terrificus* (Butantan), análise por LC-MS, apresentou *hit* com fosfolipases A₂ já descritas previamente para essa espécie, tanto para as cadeias básica quanto ácida, homólogas à crotoxina, conforme apresentado na tabela 8, além disso, peptídeos da toxina convulxina gerados após a tripsinização, também foram identificados.

Tabela 8 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. durissus terrificus* (Butantan), pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão triptica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

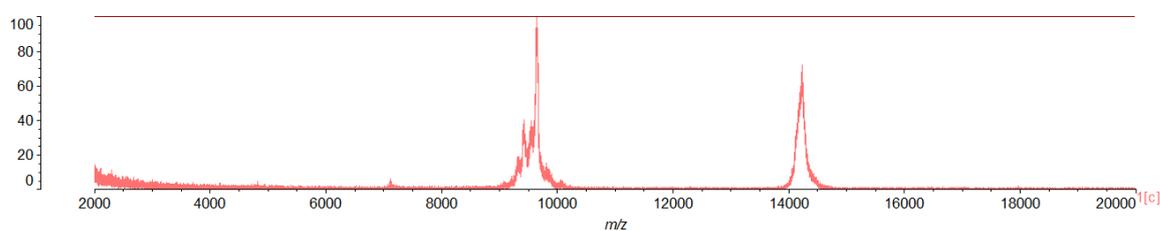
C. d. terrificus (Butantan)						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
PA2BC_CRODU	80	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1	K.YGYMFYPDSR.C	1297,5437	649,7516	15
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	502,5031	15
			K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,7831	14
			F.YAFYGC(+57.02)YCI(+57.02)GWGGR.G	1615,6337	808,7959	17
			E.GHLLQFNK.M	955,5239	478,7559	15
			G.HLLQFNK.M	898,5024	450,2438	15
PA2BB_CRODU	93	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBb OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1	R.SLSTYK.Y	697,3646	698,3459	13
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,1939	15
			K.NGYMFYPDSR.C	1248,5233	625,2906	18
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7465	17
			HLLQFNK.M	898,5024	450,2438	15
			R.KNAVPPYAFYGC(+57.02)Y.C	1598,7228	800,3350	14
gl 171848870	75	Chain D, Crotoxin B, The Basic Pla2 From Crotalus Durissus Terrificus.	K.WDIYR.Y	751,3653	376,6649	13
A0A0F7ZAA3_CROAD	1	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2-like OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	K.GGPYSNQ.K	721,3031	722,2470	5
			E.HGIELFNK.K	956,5079	479,2649	13
gl 38493077	6	Chain C, The Crystal Structure Of The Snake Venom Toxin Convulxin	K.GAHLVSIK.S	823,4916	412,7385	5

Fonte: próprio autor

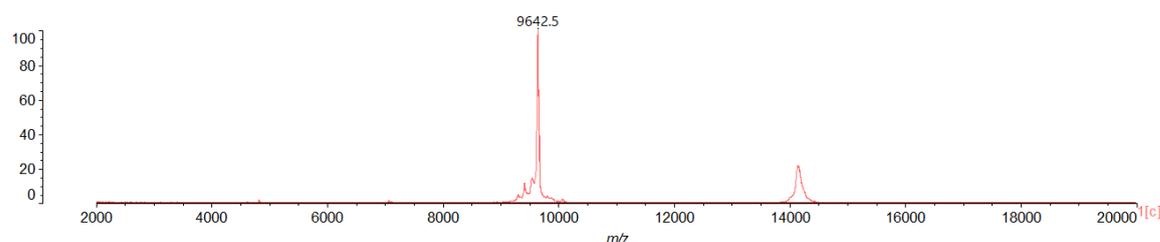
Os resultados de MALDI-ToF/ToF das amostras do veneno de Cdt (But) estão representados na figura 14. E é possível visualizar que em todos os tubos apresentados, demonstraram componentes de aproximadamente 9.600 e 14.200 Da.

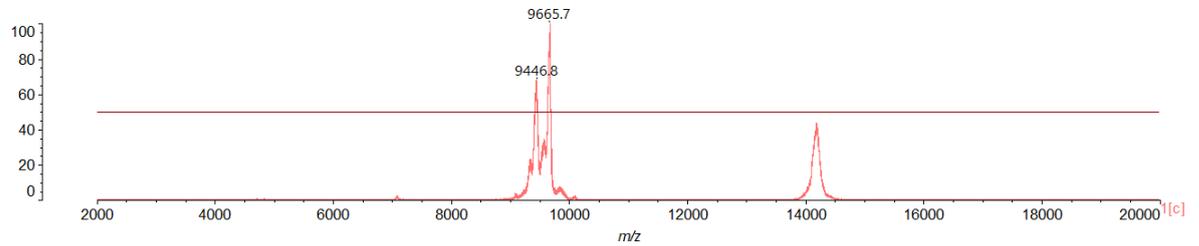
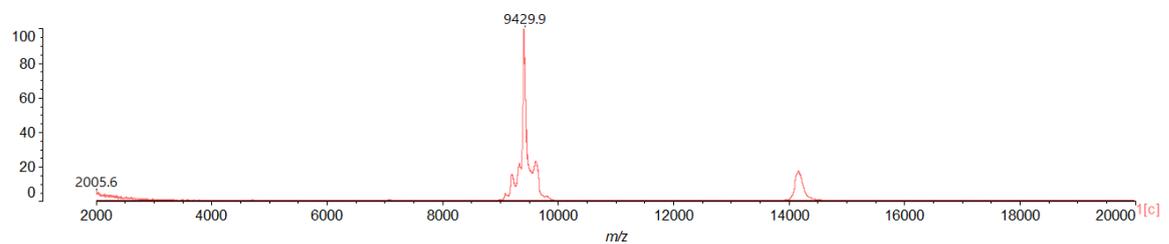
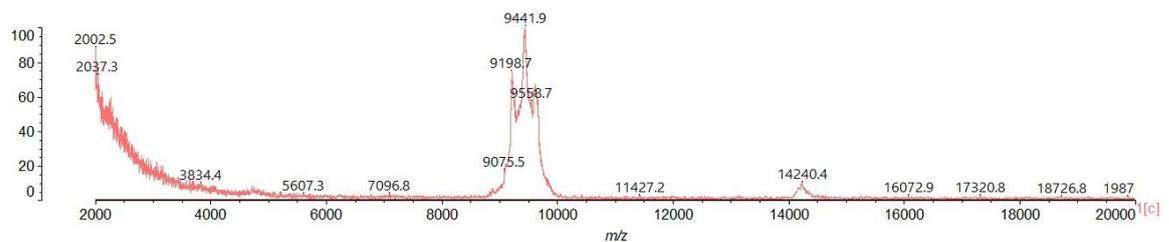
Figura 14 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. d. terrificus* (Butantan) após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. **A)** Amostra referente ao eluato do tubo 13; **B)** tubo 14; **C)** tubo 15; **D)** 17 e **E)** 18.

A



B



C**D****E**

Fonte: próprio autor

O proteoma dos eluatos obtidos por cromatografia de exclusão molecular do veneno de Cdt (SC) após a digestão tríptica revelou peptídeos identificados referentes à enzima fosfolipases da classe A₂. É possível verificar na tabela 9 que houve *hit* com fragmentos da cadeia básica de PLA₂ de *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus*, além de identificação com a neurotoxina crotoxina, TIIFT e Metalopeptidase.

Tabela 9 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. durissus terrificus* (SC), pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão triptica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

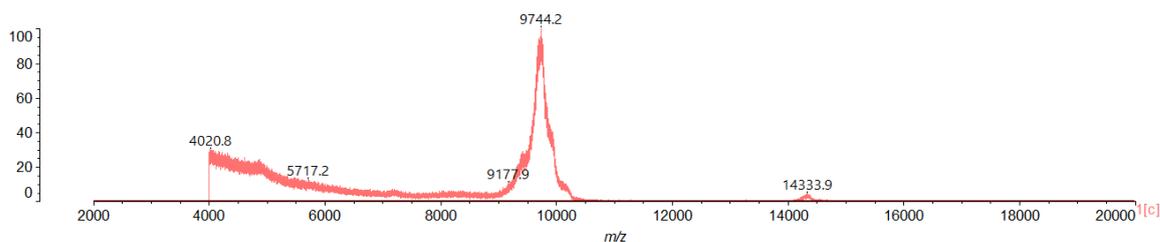
C. d. terrificus (SC)						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
PA2BA_CRODR	76	Basic phospholipase A2 A OS=Crotalus durissus ruruima PE=1 SV=1	K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	1079,8934	13
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2688	13
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	763,0175	15
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965,3695	483,6973	17
			Y.SLKSGYITC(+57.02)GK.G	1212,6172	607,3638	14
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2101	14
			K.C(+57.02)NTKWDIYPYSLK.S	1686,8075	844,4023	15
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DRVAEC(+57.02)LR.R	2541,0505	848,0193	12
			HLLQFNK.M	898,5024	450,2491	16
			K.C(+57.02)NTKWDIYR.Y	1254,5815	628,2847	12
PA2BA_CRODU	63	Phospholipase A2 crotoxin basic chain CBa2 OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1	R.C(+57.02)REPSETC(+57.02)	1037,3906	519,7369	12
			R.SLSTYKNEYMFYDPSR.C	1999,8986	667,6434	12
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2101	14
			R.KNAVPFYAFY.G	1218,6073	610,3067	14
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6772	15
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7631	14
			G.SLLQFNK.M	848,4756	425,2520	12
			R.C(+57.02)REPSETC(+57.02)	1037,3906	519,7369	12
			R.RSLSTYKNEYMFYDPSR.C	2155,9988	719,6774	13
			HLLQFNK.M	898,5024	450,2491	16
A0A0F7Z4J9_CROAD	0	Transcription initiation factor TFIIID subunit 2 isoform X1 OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	Y.THDMR.K	658,2857	659,3898	11
g l698375159	1	Metalloproteinase, ADAM28-like protein OS=Eublepharis macularius	R.SSFPKG.D	621,3122	622,2706	18

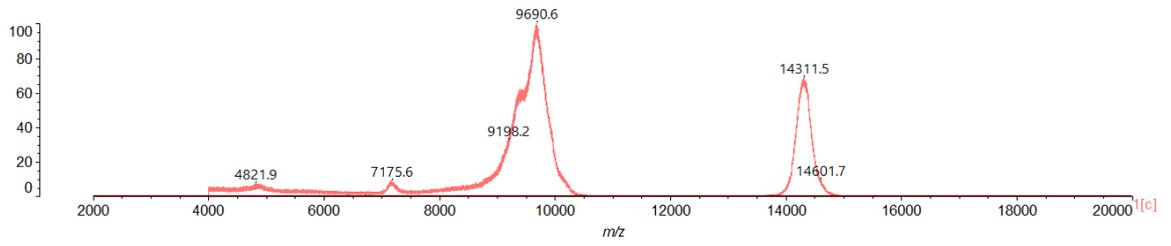
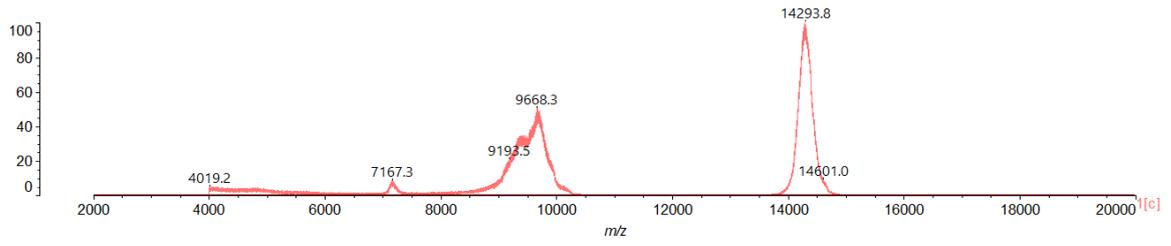
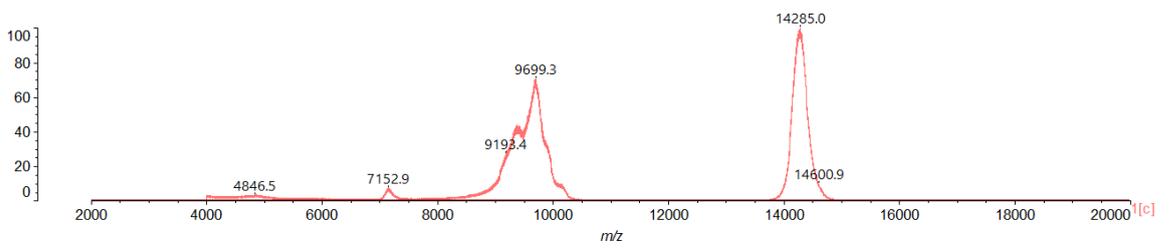
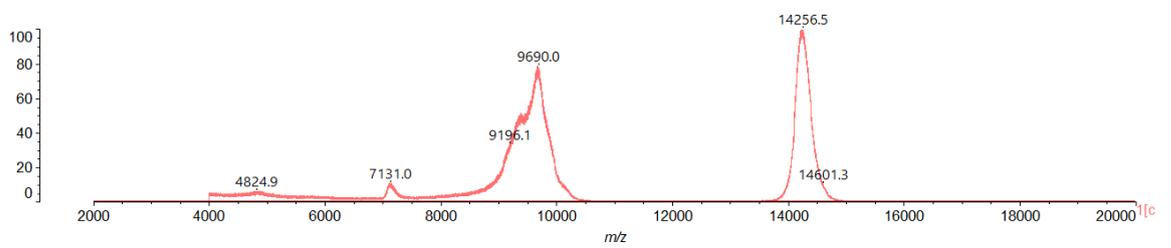
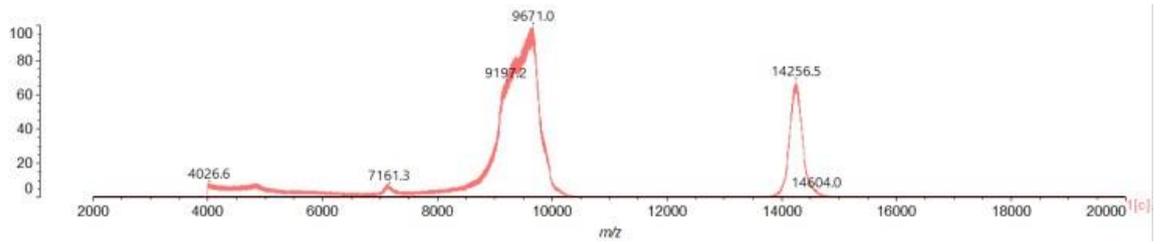
Fonte: próprio autor

Os resultados de MALDI-ToF/ToF das amostras do veneno de Cdt (SC) apresentaram componentes de massa molecular semelhante entre os tubos 11 a 17, com componentes ionizados apresentando razão massa/carga de aproximadamente 9.700 e 14.300 Da (Figura 15 A, B, C, D, E, F e G). Porém é possível visualizar na figura 15 H, um pico de menor massa molecular ao redor de 6.000 Da.

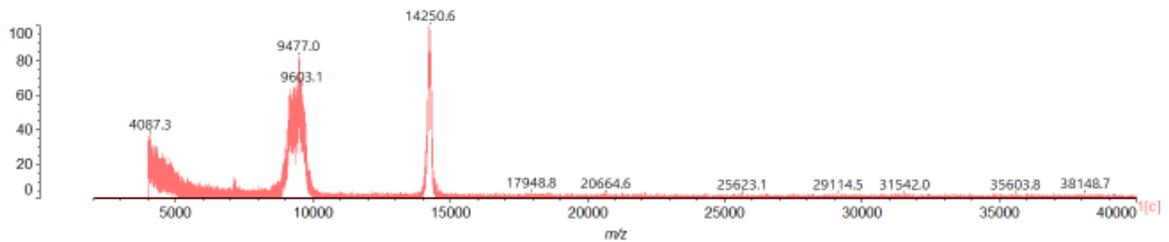
Figura 15 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. d. terrificus* (SC) após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. **A)** Amostra referente ao eluato do tubo 11; **B)** tubo 12; **C)** tubo 13; **D)** tubo 14; **E)** 15; **F)** 16; **G)** 17 e **H)** 18.

A

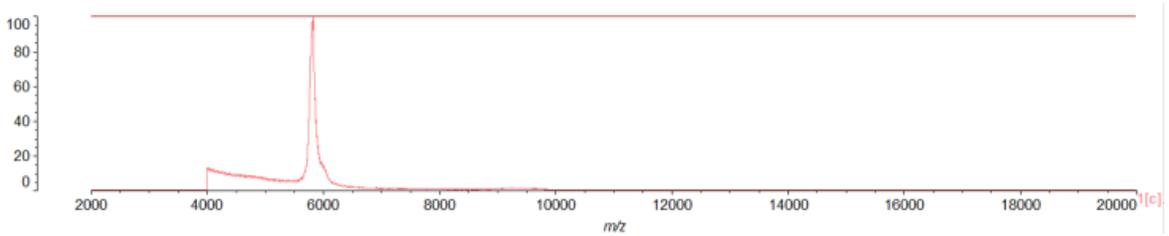


B**C****D****E****F**

G



H



Fonte: próprio autor

O proteoma dos componentes do veneno de Cdt (RS) eluídos na cromatografia de exclusão molecular após a digestão triptica revelou duas classes enzimáticas e os peptídeos gerados fizeram *hit* com proteínas já descritas no banco de dados em veneno de serpentes do gênero *Crotalus* ssp. A tabela 10 demonstra identificação com fosfolipases da classe A₂ (subunidade básica da crotoxina) e LAAO.

Tabela 10 – Identificação das proteínas do veneno da serpente *C. durissus terrificus* (RS), pelo programa Peaks Studio® V8.5. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão triptica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-ToF. Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da; z: carga do íon; Tubo: tubo referente a cada eluato.

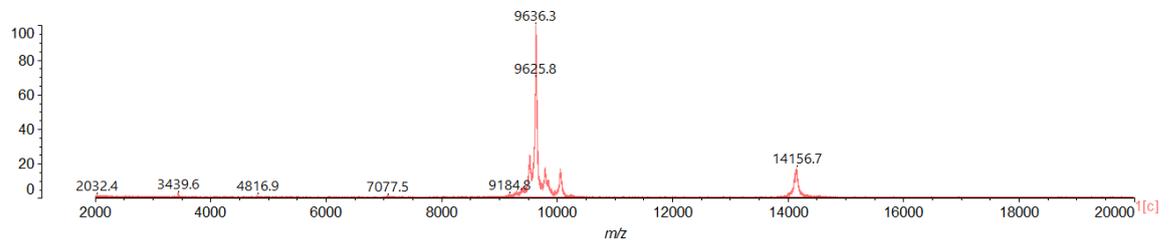
<i>C. d. terrificus</i> (RS)						
Proteína	Cobertura (%)	Descrição	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Tubo
PA2BC_CRODU	64	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CbC OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1	K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	1079,9611	12
			F.YAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1615,6337	808,8172	12
			K.C(+57.02)NTKWDIYPYSLK.S	1686,8075	844,4038	14
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1612,7384	807,3877	15
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7531	15
			R.KNAIPFYAF.Y	1069,5596	535,7871	15
			G.HLLQFNK.M	898,5024	450,2610	16
			K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,8025	15
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,7170	13
			K.YILDKYDITYSTK.E	1508,7399	755,3722	9
gij426205815	18	L-amino acid oxidase, partial OS=Crotalus durissus cumanensis	K.RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIKEK.V	2656,2876	886,4361	9
			K.IFLTQ(+57.02)K.R	780,4204	391,2000	9
			K.VQVHFNAR.V	969,5144	485,7717	11
A0A0F7Z0X7_CROAD	13	Cadam10_LAAO-1 OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1	K.STTDLPSR.F	875,4348	438,7302	9
			K.SAAQLYVESLR.K	1235,6510	618,8184	9
			G.KSAAQLYVESLR.K	1363,7460	682,8672	11

Fonte: próprio autor

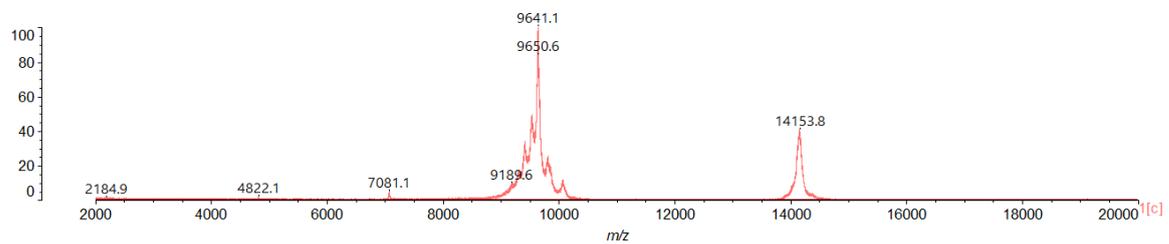
Os espectros gerados por MALDI-ToF/ToF dos eluatos obtidos por cromatografia de exclusão molecular do veneno de Cdt (RS) apresentados, demonstraram duas populações de componentes com massa molecular de 9.600 e 14.150 Da (Figura 16 A, B, C, D, E e F).

Figura 16 – Análise em espectrômetro de massas do tipo MALDI – ToF/ToF em modo linear positivo no intervalo de massas entre 2.000 a 200.000 Da do veneno da serpente *C. d. terrificus* (RS) após fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. **A)** Amostra referente ao eluato do tubo 11; **B)** tubo 12; **C)** tubo 13; **D)** tubo 14; **E)** 15 e **F)** 16.

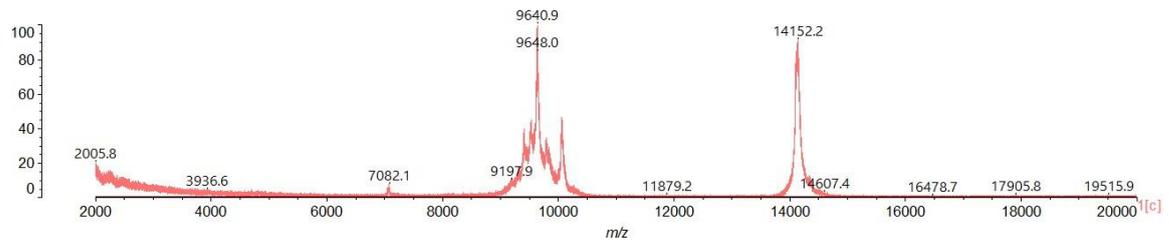
A



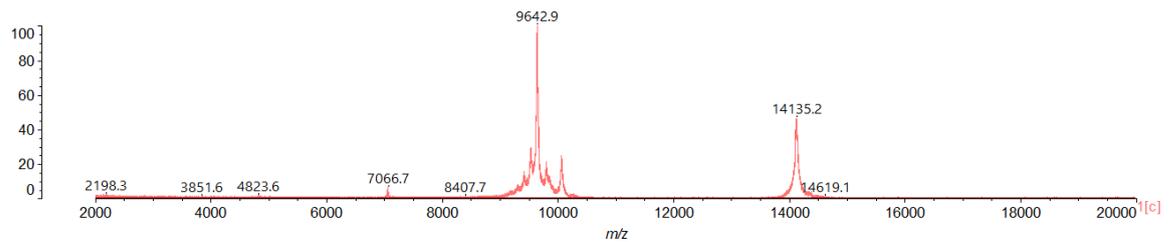
B

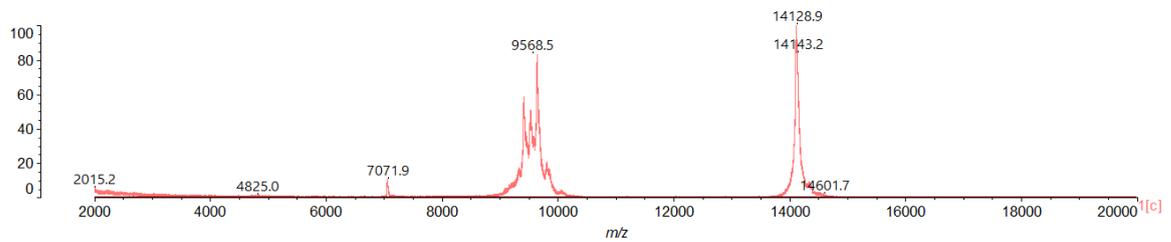
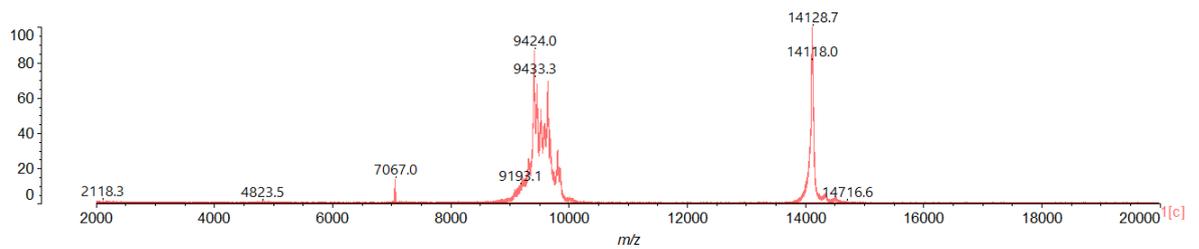


C



D



E**F**

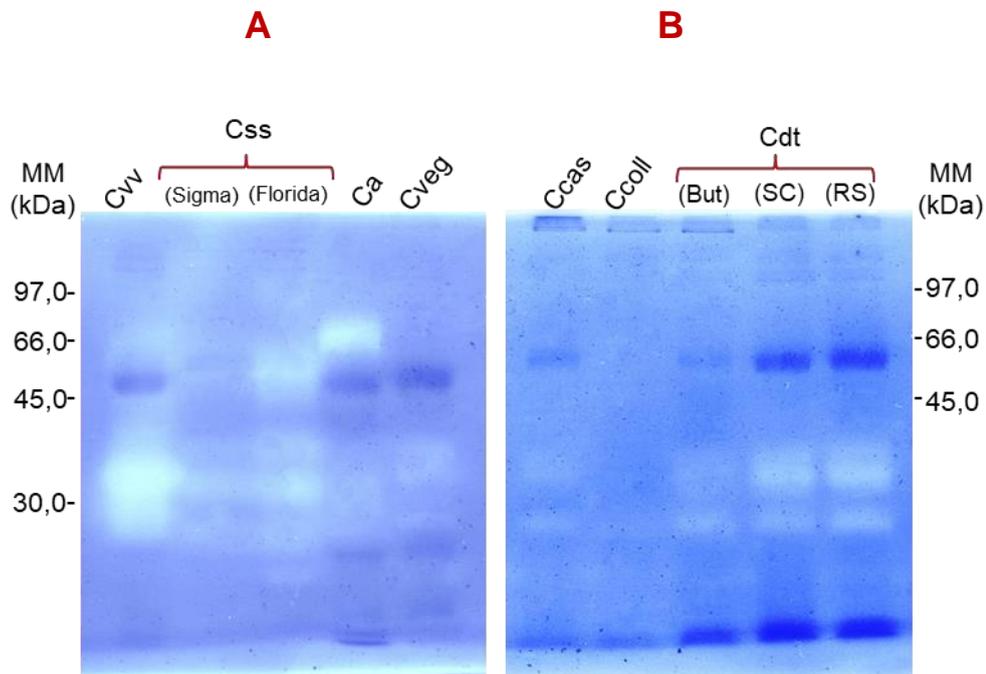
Fonte: próprio autor

4.4 Atividade caseinolítica

Com o objetivo de avaliar a atividade proteolítica dos venenos crotálicos, primeiramente foi utilizado a caseína como substrato para avaliar qualitativamente a capacidade hidrolítica das proteases dos venenos estudados no presente trabalho. A Figura 17 representa a clivagem do substrato pelos componentes dos venenos, os quais apresentaram perfil caseinolítico distintos. Observa-se, na Figura 17A intensa atividade proteolítica induzidas pelos venenos de Cvv (35 kDa) e Ca (66 kDa), além do que, é possível visualizar outras bandas com menor intensidade de hidrólise nas regiões entre 20-38 kDa em praticamente todas as amostras. Ademais, é notória a diferença da atividade hidrolítica entre as caseinases dos venenos de Css oriundas de lotes diferentes, uma vez que o veneno de Css (Flórida-EUA) apresentou degradação do substrato ao redor de 45 kDa, que não é observado na amostra proveniente de um lote comercial. Em relação aos venenos Sul Americanos (Fig. 17B), nota-se um padrão semelhante da clivagem da caseína. Os resultados obtidos por essa metodologia revelaram ausência de caseinases na região acima de 40 kDa, contudo entre os

componentes dos venenos observa-se duas bandas nas regiões entre 25 a 40 kDa, com exceção de Cdcoll, no qual verifica-se apenas uma banda menos intensa com aproximadamente 25 kDa. Além disso, as caseinases das amostras de *C. d. terrificus* demonstraram maior intensidade na hidrólise em comparação com os outros venenos sul-americanos, principalmente os lotes oriundos dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Figura 17 – Zimografia utilizando caseína (2 mg/mL) incorporado ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12 %) e corados com *Coomassie Blue*. **A)** *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Css), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg). **B)** *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). Os números ao lado correspondem aos marcadores de massa molecular (kDa). Áreas claras no gel indicam atividade enzimática.

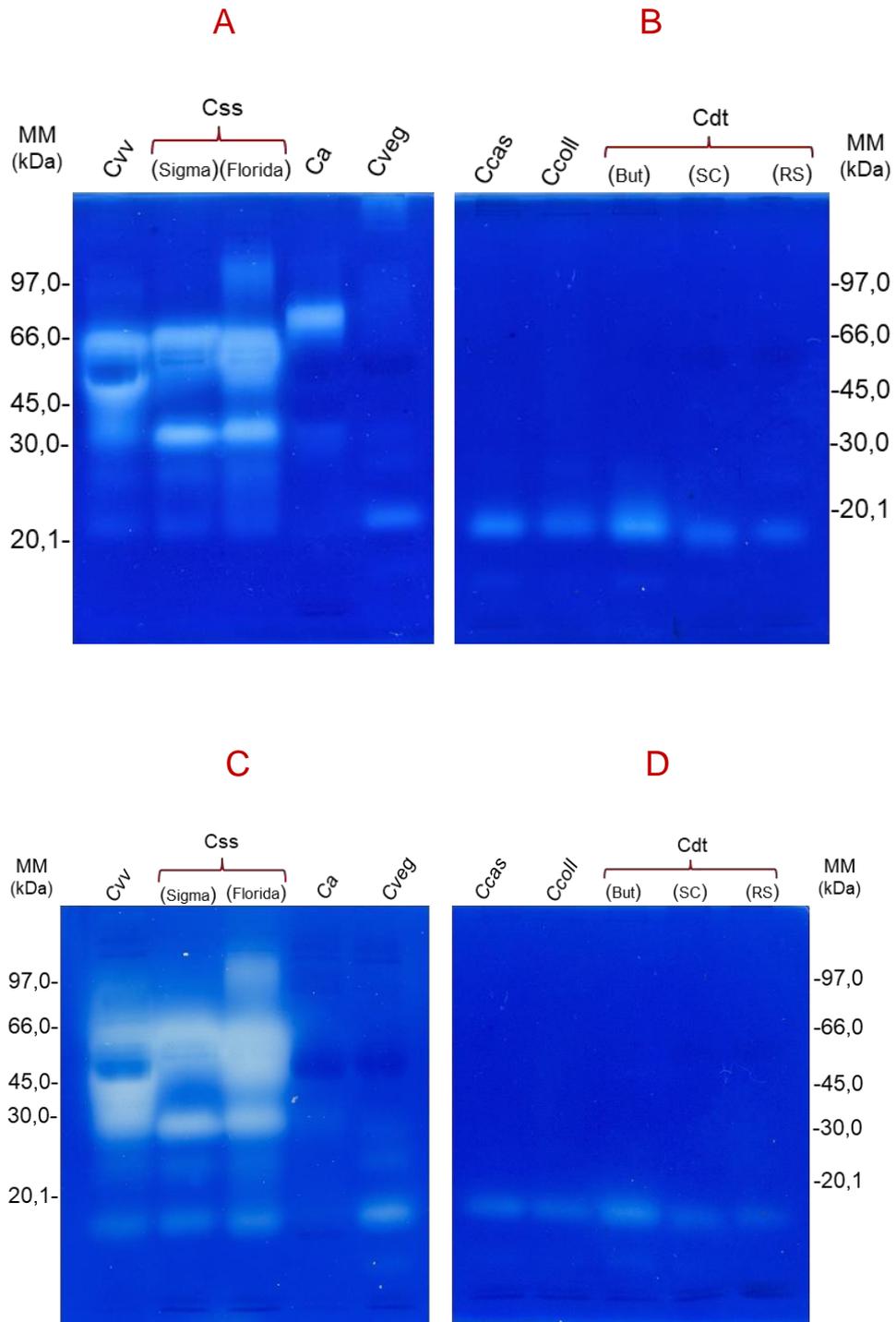


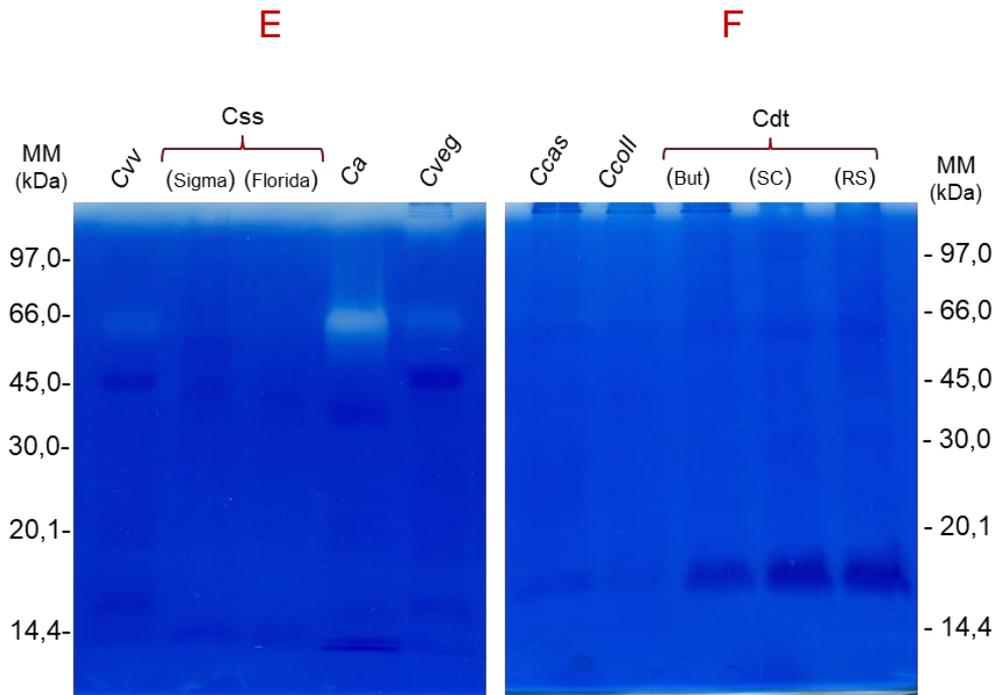
Fonte: próprio autor

4.5 Atividade gelatinolítica

A caracterização peptidásica dos venenos crotálicos do presente trabalho (25 µg) foi realizada utilizando gelatina como substrato. Na Figura 18, pode ser observada intensa atividade gelatinolítica em todas as amostras testadas, principalmente nos venenos de Cvv., Css e Ca, os quais possuem gelatinases entre as regiões acima de 90 a aproximadamente 18 kDa, além disso, os venenos de Css demonstraram maior número de bandas degradando a gelatina, além de que, entre os dois lotes, apenas a amostra proveniente do serpentário da Flórida (EUA) apresentou gelatinases com massa molecular ao redor de 100 kDa e na região de 60 kDa a degradação do substrato foi mais intensa. Ainda, o veneno da serpente venezuelana (Cveg), apresentou bandas ao redor de 140, 75 e 20 kDa com atividade gelatinolítica (Fig. 18A). Contudo, pode ser observado na figura 18B, que os venenos crotálicos Sul Americanos são constituídos por enzimas capazes de hidrolisar a gelatina com menor massa molecular, aproximadamente 18 kDa. Visando investigar se a atividade observada era decorrente da presença de metalopeptidases, foi utilizado o inibidor dicatiônico, EDTA. O inibidor aboliu a atividade gelatinolítica de alguns componentes das amostras estudadas. Na figura 18C, observa-se inibição das gelatinases apenas nos venenos de Ca (70 kDa) e Cv (140 e 75 kDa). Por outro lado, a atividade hidrolítica induzida pelas amostras Sul Americanas não foi inibida na utilização do EDTA, isso, provavelmente, devido à baixa presença de enzimas metalo-dependentes. O próximo passo experimental foi utilizar inibidor específico de serinopeptidases (PMSF). As serinopeptidases de venenos de serpentes (SVSP), estruturalmente, apresentam alta homologia com outras serinopeptidases, como a tripsina, tendo um nível de glicosilações variável e um sítio ativo de tríade catalítica: Histidina, Ácido Aspártico e Serina. Os resultados demonstram que as serinopeptidases estão presentes em todas as amostras, pois na Figura 18E, nota-se inibição total nos venenos de Css, Cvv (abaixo de 45 kDa), Ca (abaixo de 66 kDa) e Cveg (30 a 20 kDa) e nos venenos Sul Americanos é possível visualizar a inibição dessas enzimas em todas as amostras (Fig. 18F).

Figura 18 – Zimografia utilizando gelatina (2 mg/mL) incorporado ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12 %) e corados com *Coomassie Blue*. **A)** *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Css), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg). **B)** *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). **C)** Cvv, Css, Ca, Cveg e **D)** Cdcas, Cdcoll e Cdt com EDTA 25 mM; **E)** Cvv, Css, Ca, Cveg e **F)** Cdcas, Cdcoll, Cdt com PMSF (6,6 mM). Os números ao lado correspondem aos marcadores de massa molecular (kDa). Áreas claras no gel indicam atividade enzimática.





Fonte: próprio autor

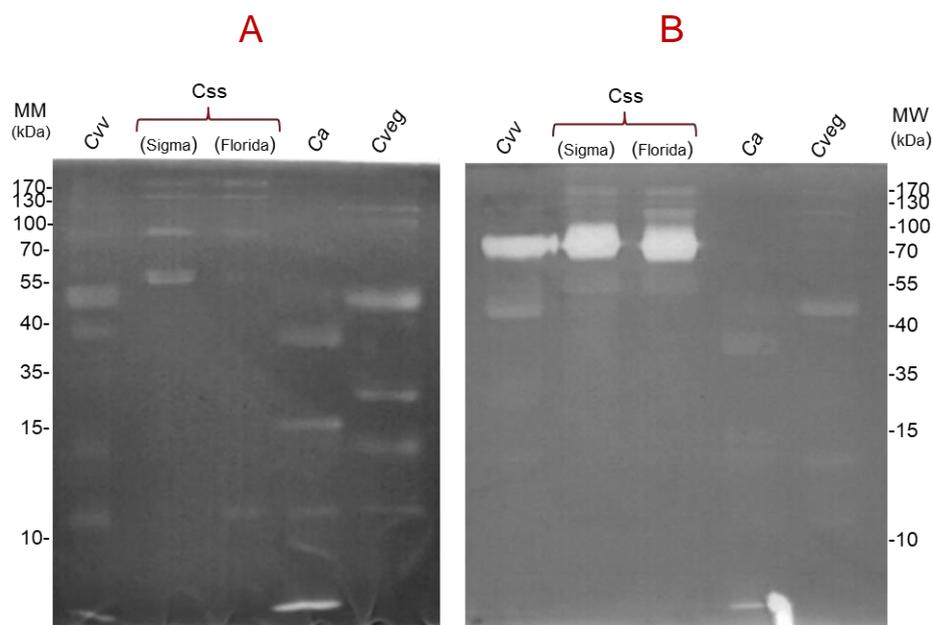
4.6 Atividade hialuronidásica

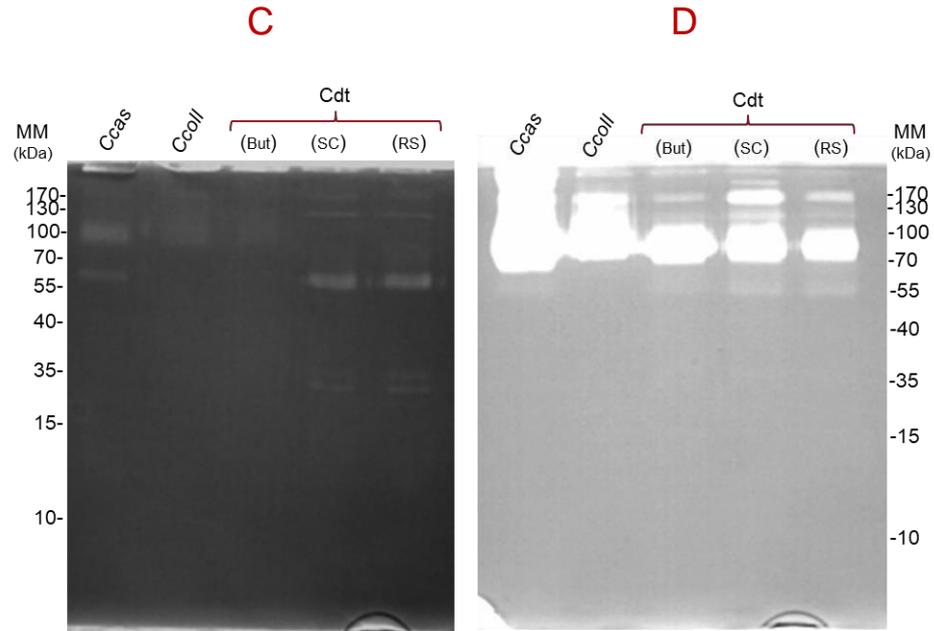
Todos os venenos crotálicos diferiram no perfil zimográfico, tanto na intensidade da hidrólise, quando se leva em consideração o pH utilizado no processo de incubação dos géis, quanto na massa molecular das hialuronidases, que variaram entre aproximadamente 200 a 4 kDa (Fig. 19). Em relação aos venenos Norte Americanos, observa-se que as amostras de Cvw, Ca e Cveg apresentaram maior número de bandas, principalmente abaixo de 55 kDa, sendo que apenas o veneno de Ca demonstrou componentes com cerca de 4 kDa capazes de hidrolisar o ácido hialurônico. Além disso, nos venenos de Ccss é possível verificar hialuronidases com maior massa molecular, acima de 55 kDa, sendo que no lote do serpentário da Flórida, observa-se degradação do substrato ao redor de 12 kDa que não foi identificado no lote comercial (Fig. 19A). Ainda com os mesmos venenos, quando incubados em pH 5,0, observa-se abaixo de 40

kDa menor atividade enzimática dos componentes dos venenos, contudo, enzimas de maior massa molecular (ao redor de 100 kDa) apresentaram bandas majoritárias com intensa hidrólise do ácido hialurônico entre os venenos de Cvv e Css (ambos os lotes) (Fig. 19B).

No que se refere à atividade hialuronidásica induzida pelos venenos Sul Americanos (Fig. 19 C-D), observa-se, a partir deste modelo experimental, hialuronidases de maior massa molecular acima de 55 kDa em todas as amostras, com exceção dos venenos de Cdt, que quando incubados em tampão fisiológico, os lotes de SC, e RS, é possível verificar duas bandas com aproximadamente 35 kDa, que não são visualizadas nos outros venenos (Fig. 19 C). Por outro lado, na Figura 19 D, quando as amostras Sul Americanas foram submetidas à incubação em tampão pH 5,0, observa-se bandas com intensa atividade hidrolítica entre aproximadamente 70 a 200 kDa, além disso, as hialuronidases de 35 kDa dos venenos de Cdt SC e RS em pH ácido não apresentaram atividade enzimática.

Figura 19 – Zimografia utilizando ácido hialurônico (170 µg/mL) incorporado ao gel de poliácridamida (SDS-PAGE, 12 %) e corados com *Alcian Blue*. **A)** *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Css), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg), incubação em pH 7,4; **B)** Cvv, Css, Ca, Cveg, incubação pH 5,0; **C)** *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt); **D)** Cdcas, Cdcoll, Cdt. Os números ao lado correspondem aos marcadores de massa molecular (kDa).



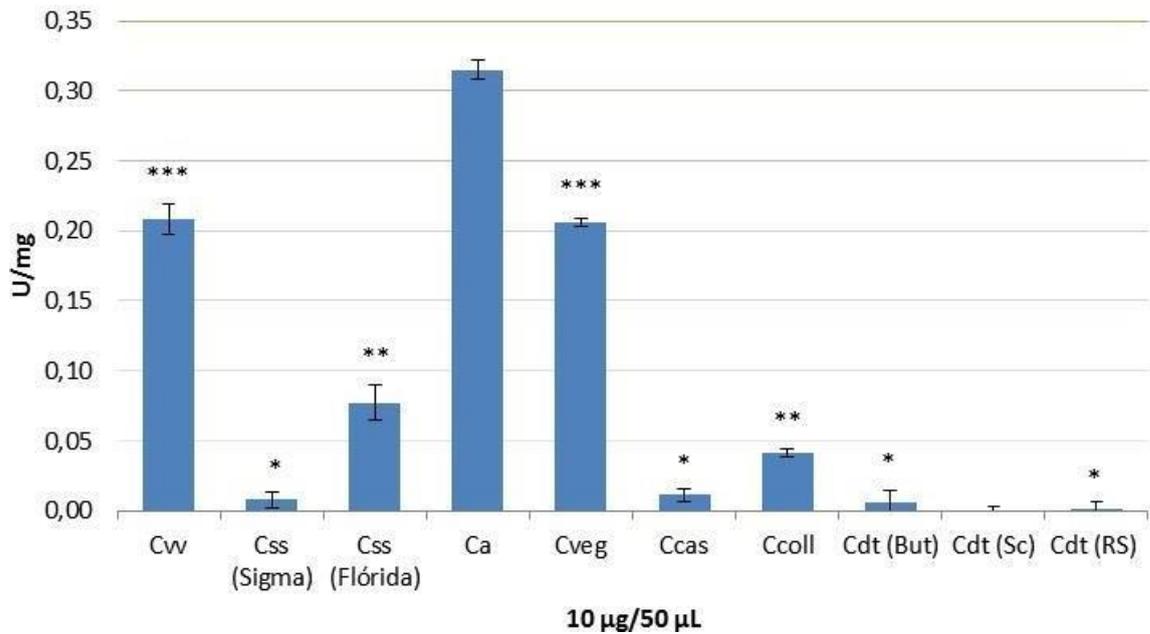


Fonte: próprio autor

4.7 Atividade azocaseinolítica

A atividade azocaseinolítica induzida pelos venenos crotálicos foi avaliada, utilizando o substrato sulfanilamida-azocaseína (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA). Pode ser observado que, neste modelo experimental, o veneno de Ca apresentou maior atividade azocaseinolítica quando comparado com as outras amostras, além disso, Cvv e Cveg, apresentaram valores semelhantes de degradação do substrato ($\cong 0,20$ U/mg) induzindo aproximadamente 10 vezes menos hidrólise. Contudo, os venenos de Ccss (Flórida) e Cdcoll apresentaram baixa atividade azocaseinolítica, com 0,08 e 0,04 U/mg respectivamente, ademais, as amostras Sul Americanas (Cdcas e os lotes de Cdt) e o veneno de Ccss comercial demonstraram os valores próximos a zero (Fig. 20).

Figura 20 – Atividade azocaseinolítica dos venenos (10 µg/50µL): *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Css), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg), *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). Os resultados estão expressos com média ± d.p.m. */**Não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



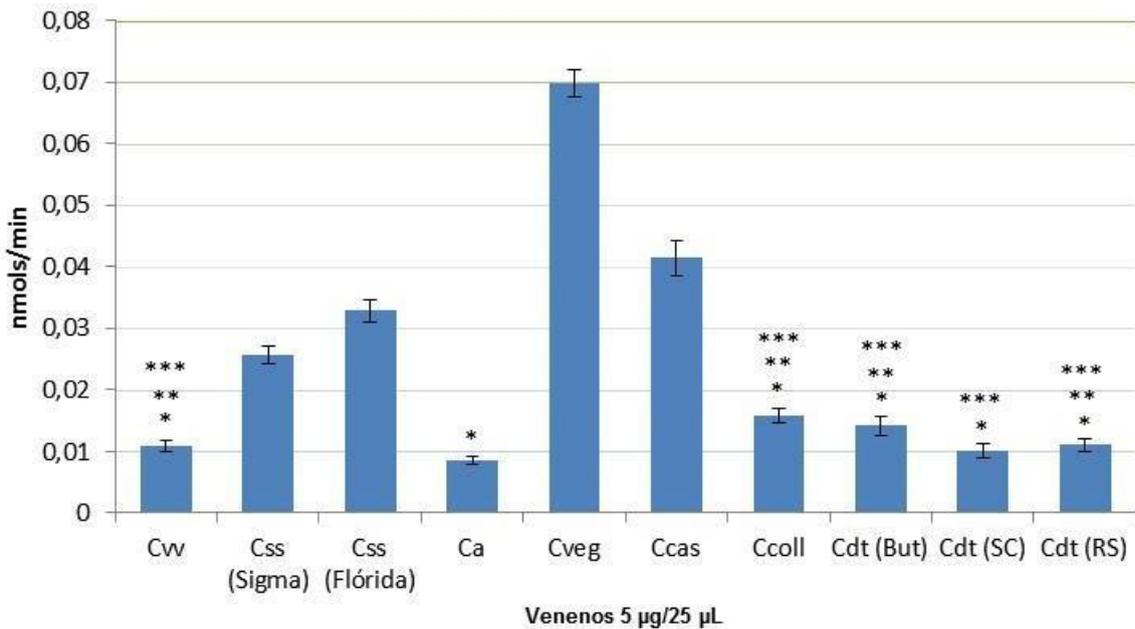
Fonte: Próprio autor

4.8 Atividade fosfolipásica

Para determinar a atividade fosfolipásica dos venenos estudados, foi utilizado o método descrito por Mora-Obando e colaboradores (2014). Os venenos apresentaram atividade fosfolipásica em diferentes proporções (Figura 21) e é possível verificar que entre todas as amostras, o veneno da serpente oriunda da Venezuela foi a mais ativa no substrato utilizado com aproximadamente 0,07 nmols/min. Além disso, Cdcas demonstrou ser o segundo veneno mais ativo, com valor ao redor de 0,04 nmols/min. As amostras de Css apresentaram diferença significativa entre os lotes com o resultado entre os mesmo variando 0,0071 nmols/min. Contudo, pode ser observado baixa atividade fosfolipásica entre os venenos de Cvv, Ca, Cdcoll e Cdt e, além dos valores não apresentarem

diferenças significativas, as amostras demonstraram, aproximadamente 4 vezes menos atividade em comparação com Cveg.

Figura 21 – Atividade fosfolipásica dos venenos (5 µg/25µL): *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus scutulatus* (Css), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg), *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). Os resultados estão expressos com média ± d.p.m. */**/** Não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



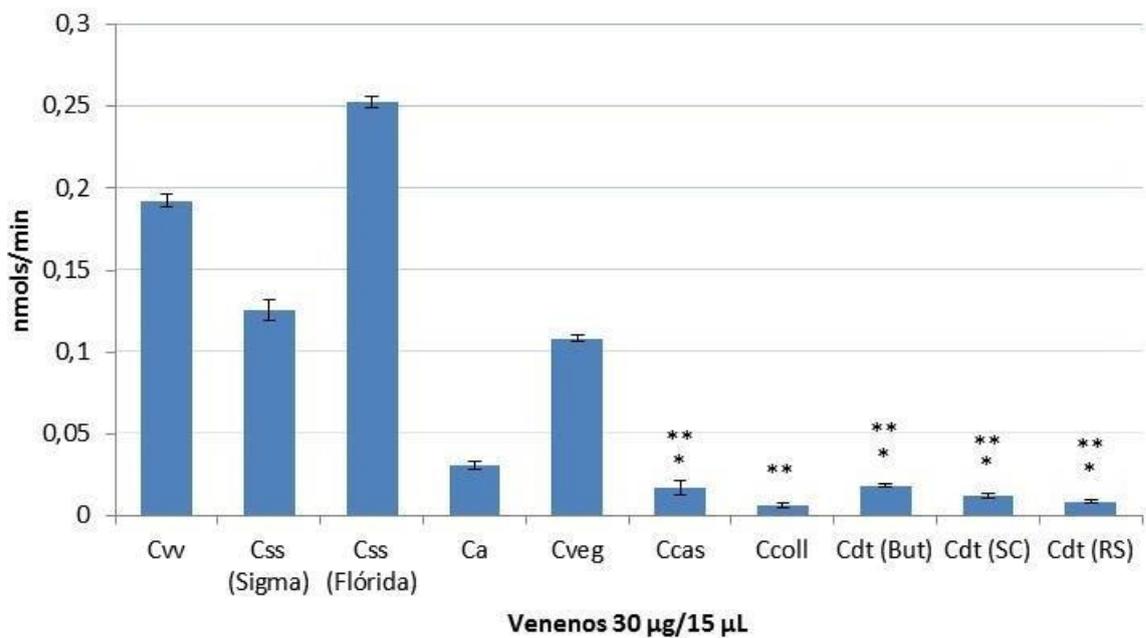
Fonte: próprio autor

4.9 Atividade peptidásica

A comparação da atividade peptidásica entre as amostras foi avaliada utilizando o princípio geral descrito por Erlanger e colaboradores (1961) empregando o substrato sintético para tripsina L-BAPA® (N-Benzoil-L-Arg-pNA), para determinar a atividade das serino-peptidases encontradas nos venenos. Observa-se que, neste modelo experimental as amostras Sul Americanas (as quais não tiveram diferença significativa), assim como o veneno de *C. atrox*

apresentaram baixa atividade peptidásica em comparação com os outros venenos. Porém, as amostras Norte Americanas e *C. vegrandis*, apresentaram variação na degradação do substrato, sendo possível constatar que os venenos de Cvv e Css (Flórida) exibiram maior atividade peptidásica, com valores acima de 0,15 e 0,25 nmols/min respectivamente, além disso, Css (Sigma) e Cv demonstraram degradação semelhante do substrato sintético (Figura 22).

Figura 22 – Atividade peptidásica dos venenos (30 µg/15µL): *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Css), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg), *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). Os resultados estão expressos com média ± d.p.m. */** Não apresentaram diferença significativa entre os grupos (p< 0,05).

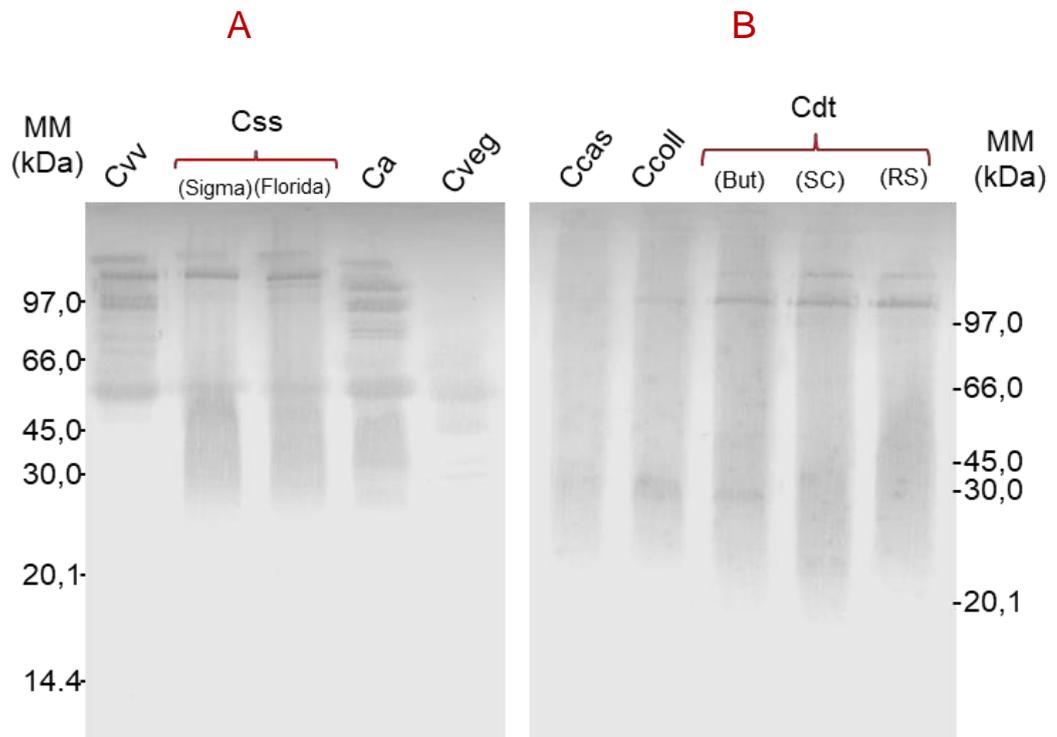


Fonte: próprio autor

4.10 Reconhecimento dos componentes dos venenos crotálicos pelo soro anticrotálico (SAC) por *Western Blotting*

Este ensaio foi realizado para avaliar a imunoreatividade do soro anticrotálico (SAC), sendo que os resultados apresentados na Figura 23 demonstraram que os soros foram capazes de reconhecer muitos componentes das amostras crotálicas, tanto homólogas ou heterólogas aos soros. O SAC que, sucintamente, é produzido a partir do plasma obtido de cavalos imunizados com veneno de *C. d. terrificus*, reconheceu componentes dos venenos heterólogos. Na Figura 23A observa-se um padrão semelhante de revelação entre os venenos de Cvv e Ca, com três bandas acima de aproximadamente 90 kDa e ao redor de 55 kDa, além disso, componentes entre 25 a 50 kDa foram identificados apenas no veneno de Ca. Entre os diferentes lotes do veneno de Css, o reconhecimento do SAC foi semelhante, com duas bandas acima de 97 kDa e um “arraste” entre 25 a 50 kDa. Entretanto, o SAC apresentou baixo reconhecimento dos componentes da amostra de Cveg, podendo ser visualizadas bandas ao redor de 70 a 45 kDa e 35 kDa. Na figura 23B, observa-se que o SAC foi capaz de reconhecer os compostos de todos os venenos analisados, com faixa de reconhecimento entre aproximadamente 20 a 120 kDa. Bandas parcialmente definidas são visualizadas ao redor de 28 kDa nos venenos de Cdcas, Cdcolll e Cdt (But), contudo, na região acima de 97 kDa é possível identificar duas bandas nítidas entre os lotes das amostras de Cdt e na mesma localização, porém menos evidente, uma banda ao redor de 100 kDa é evidenciada no veneno de Cdcolll.

Figura 23 - Reconhecimento de componentes dos venenos crotálicos (25 µg/20µL) pelo soro anticrotálico (SAC) através da técnica de *Western Blotting*. **A)** *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Cs), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cv). **B)** *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). Após a separação por SDS-PAGE (12 %), os venenos foram transferidos para membrana de nitrocelulose, incubados com SAC (1:5000) e revelados 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), conforme descrito no item 3.9.

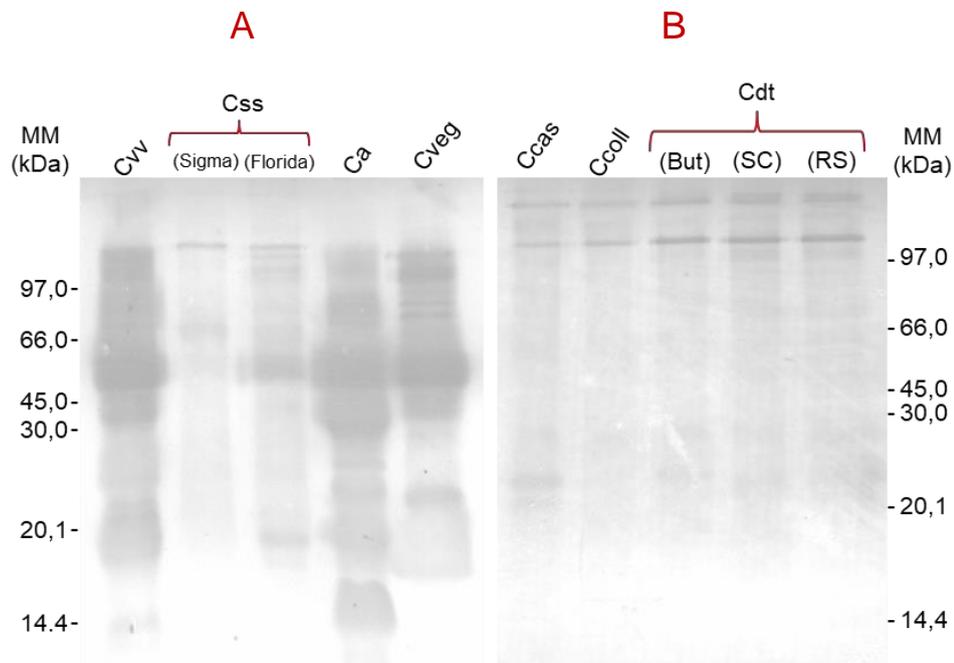


Fonte: próprio autor

4.11 Reconhecimento dos componentes dos venenos crotálicos pelo soro antibotrópico (SAB) por *Western Blotting*

O reconhecimento dos componentes dos venenos crotálicos pelo SAB pode ser visualizado na Figura 24 e em todas as amostras, nota-se uma faixa de reconhecimento de 120 a 18 kDa, contudo, os venenos Norte-Americanos apresentaram maior imunorreatividade em comparação com as amostras Sul-Americanas (FIG. 24A-B), principalmente nos venenos de Cvv, Ca e Cveg com bandas ao redor de 40, 55 e 100 kDa intensamente reativas ao soro. Além disso, é possível identificar na região de 12 a 15 kDa componentes fortemente revelados no veneno de Ca e uma banda menos intensa ao redor de 14 kDa na amostra de Cvv. Analisando as amostras de Css, o reconhecimento pelo SAB foi menos intenso comparando com as outras da mesma membrana, e entre os lotes (Sigma e Flórida-USA) os perfis de imunorreatividade diferiram nas regiões de aproximadamente 100 kDa e 20 kDa, onde a amostra do serpentário da Flórida-USA apresentou componentes que não foram revelados no lote comercial (Sigma) (Fig. 24A). Quando observamos a Figura 13B evidenciam-se duas bandas nítidas acima de 97 kDa e duas bandas ao redor de 35 kDa ligeiramente reveladas em todas amostras Sul-Americanas, além disso pode ser visualizado um componente de aproximadamente 22 kDa no veneno de Cdcas.

Figura 24 - Reconhecimento de componentes dos venenos crotálicos (25 µg/20µL) pelo soro botrópico (SAB) através da técnica de *Western Blotting*. **A)** *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Cs), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg). **B)** *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). Após a separação por SDS-PAGE (12 %), os venenos foram transferidos para membrana de nitrocelulose, incubados com SAC (1:5000) e revelados 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), conforme descrito no item 3.9.



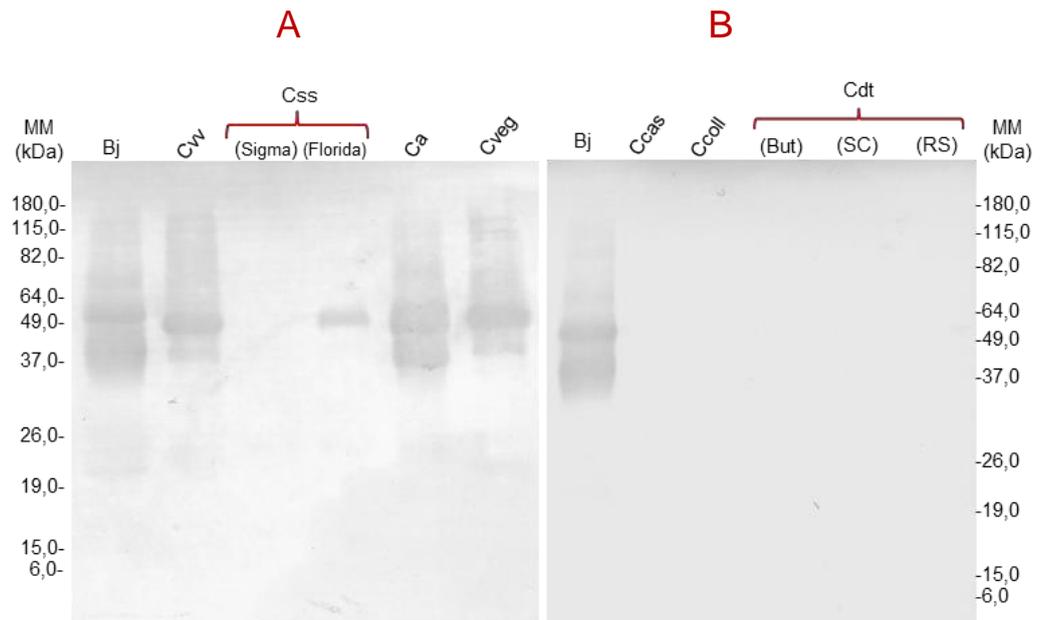
Fonte: próprio autor

4.12 Reconhecimento dos componentes dos venenos crotálicos pelo soro anti-jararagina (anti-jar) por *Western Blotting*

A reatividade antigênica entre os componentes dos venenos crotálicos frente a anticorpos anti-jararagina pode ser verificada na figura 10. É possível observar que apenas as amostras oriundas da região Norte do continente Americano apresentaram componentes que foram reconhecidos pelo anticorpo testado. Quando comparados ao controle positivo (Bj), os venenos de Cvv, Ca e Cveg. apresentaram semelhança na intensidade da reatividade, além disso, observa-se componentes de aproximadamente 115 a 35 kDa, ademais, bandas

na região de 37 e 50 kDa também foram reveladas. Entre os venenos de Css, o resultado demonstrou que apenas o lote proveniente do serpentário da Flórida-USA foi imunorreativo, com somente uma banda na região de 50 kDa sendo revelada por essa técnica (Fig 25A). Os venenos Sul-Americanos não foram reconhecidos pelo soro (Fig 25B).

Figura 25- Reconhecimento de componentes dos venenos crotálicos (25 µg/20µL) pelo soro anti-jararagina (ANTI-JAR) através da técnica de *Western Blotting*. A) *C. viridis viridis* (Cvv), *C. scutulatus. scutullatus* (Cs), *C. atrox* (Ca), *C. vegrandis* (Cveg). B) *C. d. cascavella* (Cdcas), *C. d. collilineatus* (Cdcoll), *C. d. terrificus* (Cdt). O veneno de *Bothrops jararaca* (Bj) foi utilizado como controle positivo. Após a separação por SDS-PAGE (12 %), os venenos foram transferidos para membrana de nitrocelulose, incubados com (ANTI-JAR) (1:3000) e revelados 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), conforme descrito no item 3.9.



Fonte: próprio autor

5 DISCUSSÃO

As cascavéis são serpentes peçonhentas que habitam praticamente todo o continente Americano, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina, as quais se restringem a ocupar preferencialmente ambientes abertos, geralmente pedregosos e desérticos, quentes e com pouca umidade (CAMPBELL e LAMAR, 2004). Na literatura, é possível encontrar relatos de variabilidade entre os componentes de peçonhas de serpentes da mesma espécie, além disso, alguns fatores bióticos e/ou abióticos como hábitos alimentares, ontogenia, sexo e distribuição geográfica também contribuem para tal variabilidade (CHIPPAUX et al., 1991; GUTIÉRREZ et al., 1991; FURTADO et al., 2006; MENEZES et al., 2006; ZELANIS et al., 2010; PREZOTTO-NETO et al., 2016). O perfil proteico obtido por SDS-PAGE dos venenos crotálicos do presente trabalho demonstrou diferenças entre as amostras intraespecíficas nos venenos de *C. scutulatus scutulatus*, onde foram evidenciadas proteínas ao redor de 45 kDa presente na amostra oriunda do serpentário da Flórida (USA), ausentes no lote comercial (Sigma®), além disso, entre as subespécies de *C. durissus* (Cdcoll, Cdcas e Cdt) observa-se variabilidade nos componentes de menor massa (\cong entre 20 e 10 kDa). Em outro estudo, SARAIVA e colaboradores (2002), por SDS-PAGE sob condições redutoras, constataram variação intraespecífica e ontogênica nos componentes proteicos do veneno de *C. durissus terrificus* (Brasil), *C. d. durissus* provenientes da Costa Rica (jovens e adultos) e Guatemala. Os pesquisadores demonstraram que nos venenos de indivíduos adultos, a espécie *C. d. terrificus* brasileira apresentou bandas de 35, 15 e abaixo de 14 kDa com intensa revelação, diferentemente dos venenos da América Central, que apresentaram quatro bandas intensamente reveladas acima de 20 kDa, porém abaixo de 14 kDa foi observado proteínas apenas na amostra da Guatemala. Ainda, o mesmo trabalho indica que entre espécimes jovens e adultos de *C. d. durissus* (Costa Rica) as diferenças eletroforéticas foram entre componentes de aproximadamente 67 e 28 kDa. Em relação à variabilidade de venenos ofídicos baseado no dimorfismo sexual, MENEZES e pesquisadores (2006) investigaram diferenças individuais dos componentes de venenos entre machos e fêmeas de *Bothrops*

jararaca derivados da mesma ninhada (18 filhotes). O resultado demonstrou distinção entre os venenos de cada sexo, sendo que as fêmeas possuíram um perfil proteico mais homogêneo, com bandas entre 50, 20, 14 e 10 kDa em ambos os sexos, porém na região de 50 kDa as amostras dos machos apresentaram menor intensidade na coloração, o que segundo os autores, indica baixa concentração desses componentes. Além disso, quatro dos venenos de machos apresentaram bandas ao redor de 48 a 45 kDa que não foram evidenciadas nas demais amostras.

Os venenos têm como principal finalidade subjugar as presas, e esse dado é bem retratado na literatura, porém a complexidade bioquímica dos componentes pertencentes a uma mesma família proteica, como por exemplo fosfolipases, metalopeptidases e serinopeptidases ainda não foi completamente elucidada. Estudos proteômicos, assim como os avanços de outras técnicas “ômicas” (transcriptômica, genômica, peptidômica, etc.) surgiram a partir do final do século XX e contribuem para um melhor entendimento das diversas propriedades das proteínas (no caso, proteômica), assim como na identificação e quantificação dos componentes (variabilidade), estrutura e funções fisiológicas (RIOUX et al, 1998; KAMIGUTI et al., 2000; PATTERSON e AEBERSOLD, 2003; CALVETE, 2018). A variabilidade entre composição dos venenos ofídicos é um fenômeno que ocorre em todos os níveis taxonômicos (CHIPPAUX et al 1991; CASWELL, et al., 2013) e alguns componentes dos venenos de serpentes já descritos, estão presentes mesmo em níveis filogenéticos distantes, como por exemplo gênero e até família. Recentemente, TASOULIS e ISBISTER (2017) divulgaram um trabalho de revisão sobre venenos ofídicos abordando pesquisas proteômicas publicadas na última década. O estudo revelou que alguns componentes como as PLA₂, SVSPs, SVMPs, LAAOs e CRISPs são constituintes das secreções veneníferas tanto nas espécies de serpentes das famílias Elapidae quanto Viperidae. Além disso, em relação às serpentes do gênero *Crotalus* ssp. os autores demonstram que entre 10 espécies, sendo 6 provenientes da América do Norte, 3 da América Central e 1 América do Sul o padrão proteico apresentou maior abundância de PLA₂s, SVMPs e SVSPs, e outros componentes em menor quantidade como LAAO e CTLs, confirmando nossos dados, uma vez que essas classes de proteínas foram identificadas nas amostras. Em outro trabalho com

abordagem proteômica, MELANI e colaboradores (2005) identificaram no veneno de *C. d. terrificus* 64 componentes, sendo 14 (21,9 %) deles classificados como toxinas e, além disso, 3 novas famílias de toxinas que não havia sido relatadas para essa subespécie: CRISP, fosfolipases B e fator de crescimento do endotélio vascular. Ademais, SVMPs foram identificadas pelos pesquisadores no veneno da cascavel brasileira, o que corrobora com nossos dados proteômicos, na qual a mesma classe enzimática foi caracterizada tanto nos venenos norte-americanos, quanto no veneno da Cdt do lote oriundo do estado de Santa Catarina. As metalopeptidases de venenos de *Crotalus* ssp. provenientes na região sul da América, já foram relatados em alguns trabalhos (MACKESSY, 2008; BOLDRINI-FRANÇA, et al., 2009; CALVETE et al., 2010; GEORGIEVA, et al., 2010), porém em quantidades relativamente inferiores à venenos de crotalídeos norte-americanos, os quais apresentam maior abundância de componentes proteolíticos na composição dos venenos em relação aos componentes neurotóxicos (CALVETE et al., 2009; 2010). Uma vez que MACKESSY (2008) estabeleceu a relação entre as diferenças fenotípicas de venenos de *Crotalus* ssp., isto é, Tipo I para os venenos que possuem maior quantidade de componentes proteolíticos/hemorrágicos e Tipo II os que apresentam abundância de neurotoxinas (alta letalidade) e poucas enzimas hidrolíticas, foi possível visualizar em nossos resultados que todos os venenos sul-americanos apresentaram fragmentos de peptídeos, os quais foram identificados com a crotoxina (subunidades básica e ácida), que é uma PLA₂ pré-sináptica (β -neurotoxina) responsável pela alta letalidade no envenenamento. Calvete e colaboradores (2010) demonstraram altos índices de crotoxina em outras subespécies de *C. durissus* sul-americanas (*C. d. durissus* e *C. d. ruruima*), além disso, foi verificada uma variabilidade pedomórfica em relação a essa toxina no veneno de *C. simus* (encontrada na América Central), uma vez que para indivíduos jovens, essa PLA₂ representa mais de 50 % da composição da peçonha, sendo que nas serpentes adultas o veneno tende às características proteolíticas, sendo composto de 77 % de SVMPs e SVSPs e apenas 4,1 % de crotoxina. No que refere à classificação dos fenótipos Tipo I e II nos venenos de *Crotalus* ssp., nossos resultados indicaram que entre as amostras estudadas, o veneno de *C. vegrandis* apresentou em sua composição, uma característica fenotípica tanto Tipo I, quanto

Tipo II, uma vez que após a tripsinização e análise por espectrometria (MS/MS), foram identificados peptídeos pertencentes à proteínas/peptídeos das classes SVMPs, SVSPs, PLA₂ (subunidades básica e ácida), BPPs, LAAO, CTLs e calicreínas, demonstrando (pela metodologia empregada) um fenótipo intermediário. Mesmo com poucos trabalhos elucidando o veneno desta espécie, VIALA e pesquisadores (2015) investigaram o proteoma do veneno de *C. vegrandis* e por análise em SDS-PAGE bidimensional e LC-MS², demonstraram que a peçonha é constituída por um complexo “arsenal” de toxinas, como por exemplo: fosfolipases B, fosfodiesterases, CRISPs, NGFV, enzima tipo trombina, subunidades básica e ácida da crotoxina, além dos componentes já citados.

As secreções veneníferas ofídicas, como já relatado acima, apresentam vasta diversidade entre seus constituintes proteicos e não proteicos, que agem sinergicamente alterando alguns processos fisiológicos. Portanto, foram realizados alguns ensaios enzimáticos com a finalidade de avaliar e comparar as atividades proteolíticas dos venenos crotálicos. A técnica de zimografia é um ensaio rápido, de baixo custo, sensível e reprodutível (YASUMITSU, 2017) e, além disso, podem ser utilizados diversos substratos para avaliar qualitativamente proteases (específicas ou não). Por zimografia, avaliamos que os venenos estudados degradaram visivelmente a caseína. As amostras norte-americanas demonstraram maior intensidade na degradação do substrato, principalmente os venenos de *Cv* e *Ca* e os diferentes lotes dos venenos de *Cdt* também apresentaram caseinases com um padrão de hidrólise semelhante entre as amostras. Dos venenos sul-americanos as caseinases menos ativas foram aquelas dos venenos das espécies *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*, que apresentaram atividade hidrolítica quase imperceptível. Na toxinologia, poucos pesquisadores utilizaram a técnica zimográfica com caseína como substrato para estudar as proteases de venenos de serpentes do gênero *Crotalus* ssp. Esse ensaio foi realizado por MACKESSY (2010) utilizando venenos de duas subespécies de *C. viridis* e sete de *C. oreganus* e o pesquisador demonstrou alta variabilidade na degradação da caseína, com bandas de aproximadamente 95 a 20 kDa, corroborando com nossos resultados. Além disso, nossos dados são reforçados pelas informações proteômicas já relatadas de que os venenos crotálicos são constituídos por proteases, principalmente os espécimes norte-

americanos. Esse substrato é comumente utilizado para caracterização proteolítica de outros venenos ofídicos, uma vez que componentes como Metalo- e Serinopeptidases (enzimas presentes em praticamente todos os venenos ofídicos) afetam diretamente a regulação da homeostase (MENEZES et al., 2006).

Além da caseína, outro substrato utilizado no processo zimográfico para detecção de proteases em amostras biológicas, é a gelatina. A gelatina é uma das principais proteínas teciduais com características bioquímicas muito semelhantes ao colágeno, que por sua vez possui 3 cadeias α com aproximadamente 1.000 aminoácidos em cada cadeia e em cuja sequência predomina Gly-X-Y, onde X é principalmente Pro e Y é Hyp (Gly: Glicina, Pro: Prolina e Hys: Hidroxiprolina) (ZHOU et al., 2006; LIU et al., 2015). Nossos resultados demonstraram que todas as amostras estudadas degradaram o substrato, sendo que os venenos norte-americanos apresentaram um perfil gelatinolítico mais diversificado e mais intenso em comparação com os sul-americanos. Em outro estudo, Serrano e colaboradores (2005) utilizaram a técnica zimográfica com gelatina, porém em gel bidimensional para avaliar a complexidade dos componentes de venenos de *C. atrox* e *B. jararaca*. Os pesquisadores demonstraram que os componentes de ambos os venenos hidrolisaram a gelatina em regiões de massa molecular relacionadas a proteinases das classes das metalopeptidases P-I e P-III, apresentando similaridade entre os componentes dos venenos dessas serpentes. Como já demonstrado que o veneno botrópico também possui componentes que degradam a gelatina, Lira e colaboradores (2007) avaliaram o padrão proteolítico do veneno da serpente *B. insularis*. Essa espécie alimenta-se exclusivamente de aves migratórias e é endêmica da Ilha da Queimada Grande, cuja separação com o continente ocorreu há cerca de 11.000 anos (BENNETT e GLASSER; 1996; SUGUIO e SALLUN, 2004). Os autores avaliaram que mesmo separadas por uma barreira geográfica, o veneno estudado apresentou gelatinases com perfil zimográfico semelhante ao veneno de *B. jararaca*, com diversas bandas entre 190 e 31 kDa aproximadamente. Em relação ao veneno crotálico, recentemente uma pesquisa foi realizada utilizando o veneno de *C. scutulatus scutulatus* provenientes de cinco regiões diferentes do México (BORJA et al., 2014). Segundo os autores, os venenos dessa espécie possuem variabilidade na

toxicidade de seus componentes, considerando a nomenclatura: tipo A (neurotóxico), Tipo B: (proteolítico) e Tipo A + B. Os pesquisadores revelaram que ambos os fenótipos dos venenos degradaram a gelatina, sendo que o Tipo A apresentou hidrólise intensa na região de 46 kDa e outras bandas com menor intensidade em torno de 35 e abaixo de 30 kDa e o Tipo B demonstrou maior número de bandas com aproximadamente 175, 55, 35 e 18 kDa, o que justifica as diferenças nos lotes dos venenos de *Css* do presente estudo.

Visto que há essa diferença fenotípica entre os venenos crotálicos e que os dados proteômicos demonstraram certa variabilidade entre os componentes das peçonhas, o próximo experimento foi verificar se a atividade hidrolítica observada em gelatina era devido à presença de metalopeptidases e/ou serinopeptidases, utilizando EDTA (quelante de cátions divalentes) ou PMSF. Ainda que a abordagem proteômica tenha identificado ambas as classes enzimáticas, os dados indicam que a hidrólise observada em gelatina foi causada principalmente por serinopeptidases, pois houve inibição significativa em praticamente todos os venenos analisados na presença de PMSF, enquanto a presença de EDTA promoveu uma inibição da atividade de poucas bandas. Essa inibição parcial das metalopeptidases pode ser devido à escolha do EDTA como inibidor, pois assim como o reagente 1,10-fenantrolina, ambos são quelantes de íons dicatiônico e a atividade gelatinolítica induzida pelo veneno de *B. jararaca* (constituído por aproximadamente 45 % de SVMPs) no trabalho de Lira e colaboradores (2007) também apresentou inibição parcial (TASOULIS e ISBISTER, 2017). Além disso, as amostras crotálicas dos venenos provenientes da América do sul, não apresentaram inibição, provavelmente, devido à baixa presença de enzimas dependentes de metal (MELANI *et al.*, 2015).

Em relação à degradação do ácido hialurônico causada pelos venenos crotálicos, os resultados mostraram neste modelo experimental, que as amostras possuem diversidade quanto à massa molecular das hialuronidases, principalmente nos componentes de menor massa molecular (abaixo de 30 kDa), os quais são visualizados apenas nos venenos norte-americanos, além disso, destaca-se maior intensidade da atividade catalítica em todos os veneno de *Crotalus* ssp. quando incubadas em pH 5,0 do que em pH fisiológico. Isso foi observado por WIEZEL e colaboradores (2015), que por meio de turbidimetria

determinaram que o pH ótimo para a atividade das hialuronidases do veneno da serpente *Lachesis muta rhombeata*, é 6,0 e que nos pHs 5,0 e 7,5, houve uma diminuição na atividade hialuronidásica de aproximadamente 53 % quando o veneno foi incubado no pH 5,0 e 85 % em pH fisiológico. Os resultados corroboram com os poucos dados na literatura, os quais demonstram diversidade na estrutura molecular dessa classe enzimática, e que hialuronidases de venenos ofídicos possuem uma atividade ótima em pH ligeiramente ácido, o que faz sentido quando consideramos o acidente ofídico, o qual atinge, na maioria das vezes a derme, que possui pH normal entre 4,6 – 5,8 (SCHMID-WENDTNER e KORTING, 2006).

Como visto, os venenos das *Crotalus* ssp. são constituídos por muitos componentes enzimáticos que atuam sobre diversos substratos. No intuito de comparar quali e quantitativamente os venenos em relação à atividade de algumas das enzimas mais abundantes, foram realizados ensaios zimográficos e colorimétricos. A variabilidade observada no perfil zimográfico (caseína e gelatina) foi confirmada pelo ensaio com azocaseína. Verificou-se que os venenos norte-americanos são constituídos por componentes proteolíticos mais ativos em relação aos sul-americanos. Mackessy (2010) utilizou esse mesmo substrato para comparar a atividade hidrolítica de metalopeptidases, juntamente com zimografia em caseína (já citado anteriormente) e os resultados foram semelhantes, pois além da variabilidade das bandas no perfil zimográfico, foi verificado também diversidade na atividade azocaseinolítica.

Uma das enzimas mais abundantes em venenos de serpentes do gênero *Crotalus* ssp. são as fosfolipases A_2 (TASOULIS e ISBISTER, 2017). Essas enzimas pertencem à classe das PLA_2 secretadas, sendo que sua ação hidrolítica em fosfolipídeos de membrana acarreta, além de alterações na permeabilidade da membrana, a liberação de lisofosfolípidos e ácidos graxos que, por sua vez, desencadeia vários processos farmacológicos como a liberação de mediadores inflamatórios e miotoxicidade, entre outros. Nossos resultados demonstraram que o veneno de *C. vegrandis* foi o mais ativo no substrato utilizado (NOBA), em seguida os venenos de Ca e Css (Sigma e Flórida). A baixa atividade fosfolipásica observada nos venenos de Cdt pode ser explicada devido a alta concentração de crotoxina (PLA_2 pré-sináptica com alta atividade

farmacológica), a qual é constituída por duas sub-unidades: A (ácida), denominada crotapotina, e B (básica), com elevada atividade farmacológica e baixa atividade hidrolítica.

Em relação aos dados epidemiológicos descritos na literatura e em banco de dados governamentais *on-line* disponíveis ao acesso da população, foi publicado recentemente por Chippaux (2017) a incidência de picadas por serpentes na América, apresentando índices ao redor de 60.000 acidentes ofídicos/ano, sendo que a taxa de mortalidade foi de aproximadamente 350 por ano. O tratamento eficaz frente ao envenenamento por serpentes peçonhentas, preconizado pela Organização Mundial da Saúde é o antiveneno (soro antiofídico) mono ou polivalente, cuja utilização se iniciou no final do século XIX por Calmette (1894). Atualmente, no continente americano, onze países produzem soros antiofídicos, sendo que nove utilizam o veneno de *Crotalus* sp. no *pool* de imunização para obtenção desses imunobiológicos (diferentes protocolos) (www.toxinfo.org) e assim utilizar no tratamento dos acidentes. As principais manifestações clínicas locais do envenenamento ofídico tem a participação de proteases presente nos venenos que degradam tecido endotelial e matriz extracelular, entre outros. Uma vez classificados os venenos crotálicos como Tipo I ou Tipo II, observa-se na clínica, que o quadro clínico dos envenenamentos por cascavéis Norte Americanas apresenta sintomas semelhantes ao acidente botrópico, caracterizado por alterações inflamatórias no local da picada como dor, edema, hemorragia e necrose. Manifestações sistêmicas também são observadas como distúrbios na coagulação. Alguns pacientes desenvolvem sequelas significativas e, em alguns casos, amputação do membro acometido. Tal fato pode ser devido à abundância de enzimas das famílias metalo- e serinopeptidases encontradas nos venenos (SAVIOLA et al., 2015; CALVETE, et al., 2009), corroborando com os ensaios enzimáticos do presente trabalho. Por outro lado, os principais mecanismos de ação dos venenos crotálicos sul-americanos, principalmente *C. d. terrificus* são coagulante, miotóxico, neurotóxico, sendo mais evidentes os sintomas sistêmicos como: náuseas, cefaleia, sonolência, rabdomiólise, ptose palpebral, mialgia e mioglobinúria, porém, o quadro clínico local é caracterizado por edema e eritema discretos, pouca dor (quando há) e parestesia, e mesmo em casos de envenenamento leve, a

administração do SAC é indicado (AZEVEDO-MARQUES, et al., 2009). Mesmo com a experiência de alguns profissionais da saúde em relação ao ofidismo, a variabilidade entre os componentes dos venenos e os sintomas induzidos pelas toxinas podem acarretar num tratamento equivocado. Bucarechi e colaboradores (2014) relataram um caso de ofidismo, na qual o paciente apresentou evidentes manifestações clínicas locais (muita dor, edema e eritema), além de observarem incoagulabilidade sanguínea e alteração no nível sérico de creatino quinase no plasma do paciente. Com esses sintomas, o paciente foi submetido ao tratamento com SAB, porém após 13-14 horas da picada, foi observado pouca melhora no quadro clínico local e nenhuma alteração da coagulopatia, além disso, foi diagnosticado mialgia, ptose palpebral e intensa rabdomiólise, sendo então submetido ao tratamento com SAC. O ensaio imunológico ELISA foi realizado antes da soroterapia e revelou que o paciente foi picado por uma *C. d. terrificus*.

Alguns trabalhos da literatura científica, utilizando técnicas imunológicas e ensaios de toxicidade *in vivo* comprovam a existência de alta reatividade antigênica cruzada entre soros específicos e venenos heterólogos (FERREIRA et al., 1992; LIRA et al., 2007; QUEIRÓZ et al., 2008; PREZOTTO-NETO et al., 2016). Por *Western Blotting*, nossos resultados demonstraram que ambos os soros comerciais antiofídico e crotálico reconheceram componentes tanto homólogos quanto heterólogos. Foi observado que os soros comerciais utilizados no ensaio (SAB e SAC) reconheceram os principais componentes dos venenos heterólogos, isto é, os mais importantes frente aos sintomas clínicos do envenenamento por *Crotalus* spp. (SVMPs, SVSPs e PLA₂s) tanto dos venenos dos crotálicos do norte quanto do sul do continente americano. Além disso, houve reconhecimento de SVMPs dos venenos estudados norte-americanos pelo soro anti-jararagina (principal toxina hemorrágica do veneno de *B. jararaca*).

A junção dos dados proteômicos, enzimáticos e imunoenzimáticos demonstra homologia entre os componentes das serpentes estudadas e sugere que todos os venenos estudados apresentam um repertório finito de toxinas, ainda que com variações quantitativas, o que sugere ser possível elaborar um soro polivalente que, ao neutralizar fosfolipases, metalo e serinopeptidases seria eficiente em mitigar os principais sintomas do envenenamento crotálico.

6. CONCLUSÃO

- Foi observado um padrão de migração semelhante para os venenos de serpentes do gênero *Crotalus* ssp., sendo que a intensidade da coloração das bandas indica variabilidade na concentração relativa dos seus componentes.

- Por meio de zimografia foi possível detectar bandas com atividade hidrolítica sobre caseína, gelatina e ácido hialurônico nos venenos estudados com maior abundância destes componentes nas espécies mais ao norte. Além disso, alguns componentes foram inibidos (atividade gelatinolítica) na presença do EDTA ou PMSF.

- Os ensaios de atividade azocaseinolítica, fosfolipásica e peptidásica apresentaram variação quantitativa entre as amostras.

- Alguns componentes dos venenos crotálicos foram reconhecidos pelos anticorpos presentes nos soros anticrotálico, antibotrópico e antijararagina.

5. REFERÊNCIAS

ANTUNES, T. C.; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI, M.; SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, 2010, 56, p. 1443-1458.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANCA; F. O. S., WEN; F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. (Ed.2). **Animais Peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapeutica dos Acidentes**. São Paulo: Sauvier, 2009; p. 108-115.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN. W. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica**. São Paulo: Sauvier, 2009, p. 22-41.

BAKKEN, G. S.; KROCHMAL, A. R. The imaging properties and sensitivity of the facial pit of pitvipers as determined by optical and heat-transfer analysis. **J. Exp. Biol.**, 2007, 210, p. 2801-2810.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DASILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS.Negl. Trop. Dis.** 2010, 4(6), p. 1-10.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch.Biocham.Biophys**, 1995, 318, p. 247-250.

BARLOW, A.; POOK, C. E.; HARRISON, R. A.; WÜSTER, W. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proc. Biol. Sci.**, 2009, 276, p. 2443-2449.

BEAUPRE, S. J.; DUVALL, D.; O'LEILE, J. Ontogenetic variation in growth and sexual size dimorphism in Central Arizona population of the Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Copeia**, 1998, 1, p. 45-56.

BENNETT, M. R.; GLASSER, N. F. Chapter 2 The history of ice on Earth. In: BENNETT, M. R.; GLASSER, N. F. (Ed). **Glacial geology - Ice sheets and landforms**. England: John Wiley & Sons, 1996, p. 7-28.

BOLDRINI-FRANÇA, R. S.; RODRIGUES, F. P.; FONSECA, D. L.; MENALDO, F. B.; FERREIRA, F.; HENRIQUE-SILVA, A. M.; SOARES, A.; HAMAGUCHI, V. M.; RODRIGUES, A. R.; OTAVIANO, M. I. Homsí-Brandeburgo, *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, 2009, 91 (5), p. 586–595.

BORJA, M.; Castañeda, G.; Espinosa, J.; Neri, E.; Carbajal, A.; Clement, H.; García, O.; Alagon, A. Mojave Rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* with Type B Venom from Mexico. **Copeia**. 2014, 2014, p. 7–13.

BUCARETCHI, F.; DE CAPITANI, E. M.; HYSLOP, S.; MELLO, S. M.; FERNANDES, C. B.; BERGO, F.; NASCIMENTO, F. B. P. Compartment syndrome after South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation. **Clin. Toxicol. (Phila.)**, 2014, 52(6), p. 639-641.

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

BUSH, S. P.; SEIFERT, S. A.; OAKES, J.; SMITH, S. D.; PHAN, P. H.; PEARL, S. R.; REIBLING, E. T. Continuous IV Crotalidae Polyvalent Immune Fab (Ovine) (FabAV) for selected North American rattlesnake bite patients. **Toxicon**, 2013, 69, p. 29-37.

CALMETTE, A. Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. **Ann. Inst. Pasteur**, 1984, 8, p. 275-291.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function., **Toxicon**, 2005, 45, p. 1063–1074.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom.** 2007, 42, p. 1405-1414.

CALVETE, J. J.; FASOLI, E.; SANZ, L.; BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P. G. Exploring the Venom Proteome of the Western Diamondback Rattlesnake, *Crotalus atrox*, via Snake Venomomics and Combinatorial Peptide Ligand Library Approaches. **J. Prot. Res.**, 2009, 8, p. 3055-3067.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CID P.; DE LA TORRE P.; FLORES-DÍAZ, M.; CRISTINA DOS SANTOS, M.; BORGES, A.; BREMO, A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; ALAPE-GIRÓN, A.; JOSÉ MARIA GUTIÉRREZ. Snake Venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. **J. Prot. Res.**, 2010, 9, p. 528-544.

CALVETE, J. J. Snake venomomics – from low-resolution toxin-pattern recognition toxin-resolved venom proteomes with absolute quantification. **Expert Rev. Proteomics**, 2018, 20, p. 1-14. Review

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. **Comstock Publish Associates**: Ithaca, NY, 2004.

CASEWELL, N. R.; WAGSTAFF, S. C.; HARRISON, R. A.; RENJIFO, C.; WÜSTER, W. Domain loss facilitates accelerated evolution and

neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes.,
Mol. Biol. Evol., 2011, 28, p. 2637–2649.

CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.;
FRY, B. G. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. **Trends Ecol.
Evol.** 2013, 28, p. 219-129

CEVALLOS, M. A.; NAVARRO-DUQUE, C.; VARELA-JULIA, M.;
ALAGON, A. C. Molecular mass determination and assay of venom
hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
Toxicon. 1992, 30(8): p. 925 – 930.

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

CHIPPAUX, J. P. Incidence and mortality due to snakebite in the
Americas. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 2017, 11(6), p. 1-39.

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

ERLANGER, B. F.; KOKOWSY, N.; COHEN, W. The preparation and
properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of
biochemistry and biophysics**, 1961, 96, p. 271-278.

EVANS, S. E. At defeat of the dinosaurs: the origing, evolution and
early diversification of squamate reptiles (Lepdosauria: Diapsida). **Biol. Rev.
Cambr.**, 2003, 78, p. 513-551

FISZER-SZAFARZ B. Hyaluronidase polymorphism detected by
polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria,

slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. **Anal Biochem.** 1984;143(1), p.76 – 81

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN. W. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica.** São Paulo: Sauvier, 2009, p. 81-95.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN. W. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica.** São Paulo: Sauvier, 2009, p. 22-41.

FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome Res.** 2005, 15, p. 403-420.

FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S. F.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S.B.; RICHARDSON, M. K.; HODGSON, W. C.; IGJATOVICK, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature.** 2006, 439, p. 584-588.

FRY, B. G.; SCHEIB, H.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M; SILVA, D. A.; CASEWELL, N. R. Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. **Toxicon.** 2012, 59, p. 696-708.

FURTADO, M. F. D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. T. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon,** 2006, 48, p. 401-410.

GEORGIEVA, D.; ÖHLER, M.; SEIFERT, J; VON BERGEN, M.; ARNI, R. K.; GENOV, N.; BETZEL, C. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus* -

correlation with pharmacological activities. **J. Proteome Res.** 2010, 9(5), p. 2302–2316.

GIRISH, K. S.; MOHANAKUMARI, H. P.; NAGARAJU, S.; VISHWANATH, B. S.; KEMPARAJU, K. Hyaluronidase and protease activities from Indian snake venoms: neutralization by *Mimosa pudica* root extract. **Fitoterapia**, 2004, 75, p. 378-380.

GIRISH, K. S.; SHASHIDHARAMURTHY, R.; NAGARAJU, S.; GOWDA, T. V.; KEMPARAJU, K. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **Biochimie**. 2004;86(3):193-202.

GIRÓN, M. E.; AGUILAR, I.; ROMERO, L.; SANCHES, E. E.; PÉREZ, J. C.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. a low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (SERPENTES:VIPERIDAE) venom on kidney cell cultures

GOLD, B. S.; DART, R. C.; BARISH, R. A. Bites of venomous snakes. **N. Engl. J. Med.**, 2002, 347, p. 347-356. Review.

GOMES, M. S. R.; DE QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C. N.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA, M. V.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; DE OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, 2011, 153, p. 290-300.

GREENE, H. Snakes: The Evolution of Mystery in Nature. Univ. of California Press: Berkeley, 1997.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, 2000, 82, p. 841-850, Review.

GUTIÉRREZ, J. M.; HIGASHI, H. G.; WEN, F. H.; BURNOUF, T.
Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: report of a workshop. **Toxicon**, v. 49, n. 1, p. 30-35, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G. Snake antivenomics. Technological, clinical and public health issues. In: DE LIMA, M. E.; PIMENTA, A. C. M.; MARTIN-EUCLAIRE, M. F.; ZINGALI, R. B.; ROCHAT, H. (Ed.). **Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, p. 393-421, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, W. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica**. São Paulo: Savvier, 2009, p. 352-365.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Eletrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates. **Anal. Biochem.**, 1980, 102, p. 196-202.

HOLZER, M; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, 1996, 34, p. 1149-1155.

JACKSON, T. N. W.; SUNAGAR, K.; UNDHEIM, E. A. B.; KOLUDAROV, I.; CHAN, A. H. C.; SANDERS, K.; ALI, S. A.; HENDRIKX, I.; DUNSTAN, N.; FRY, B. G. Venom down under: dynamic evolution of Australian elapid snake toxins. **Toxins**, 2013, 5, p. 2621–2655.

KANG T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic

toxins from snake venom: structural, characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.**, 2011, 278, p. 4544-4576.

KAISER, I. I.; AIRD, S. D. A crotoxin homolog from the venom of the Uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis*). **Toxicon**. 1987, 25, p. 1113-1120.

KARLSSON, E. In: Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology. v. 52, Berlin, **Springer-Verlag**, 1979, p. 159-212.

KINI, R. M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venoms. **Toxicon**, 2005, 45, p. 1133-1145.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, 1987, 25,(1), p. 65–106.

KREIL, G. Hyaluronidases-A group of neglected enzymes. **Protein Sciences**, 1995, 5(4), p. 1666–1669

LIRA, M. S.; FURTADO, M. F.; MARTINS, L. M. P.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C. Enzymatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific Bothrops antivenom. **Toxicon**, 2007, 49, p. 982–994

LIU, D.; NIKOO, M.; GOKHAN, B.; PENG, Z.; JOE, M. R. Collagen and Gelatin. **Annual Review**, 2015, 6, p. 527–557.

MACKESSY, S. P. Morphology and ultrastructure of the venom gland of the Northern Pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. **J. Morphol.**, 1991, 208, p. 109-128.

MACKESSY, S. P. Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance. In: HAYES, W. K.; BEAMAN, K. R.; CARDWELL, M. D.;

BUSH, S. P. (Eds.), **The Biology of Rattlesnakes. Loma Linda University Press**, Loma Linda, California, 2008, p. 495–510.

MACKESSY, S. P. Evolutionary trends in venom composition in the western rattlesnakes (*Crotalus viridis sensu lato*): Toxicity vs. Tenderizers. **Toxicon**, 2010, 55, p. 1463–1474.

MA, B.; ZHANG, K.; HENDRIE, C.; LIANG, C.; LI, M.; DOHERTY-KIRBY, A.; LAJOIE, G. PEAKS: powerful software peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid commun mass spectrom**. 2003, 17(20), p. 2337-2342.

MALTA, M. B.; LIRA, M. S.; SOARES, S. L.; ROCHA, G. C.; KNYSAK, I.; MARTINS, R.; GUIZZE, S. P. G.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C. Toxic activities of Brazilian centipede venoms. **Toxicon**, 52(2), p. 255-263, 2008.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. História natural das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, W. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica**. São Paulo: Savvier, 2009, p. 71-80.

MARTINS, A. M.; MONTEIRO, H. S.; JÚNIOR, E. O.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney **Toxicon**. 1998, 10 p. 1441-50.

MELANI, R. D.; ARAUJO, G. D. T.; CARVALHO, P. C.; GOTO, L.; NOGUEIRA, F. C. S.; JUNQUEIRA, M.; DOMONT, G. B. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venome of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **EuPA Open Proteomics**, 2015, p. 144-156.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. R.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V.

(Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33-61.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, W. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica**. São Paulo: Sauvier, 2009, p. 42-70.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, 2006, 47, p. 304-312.

MIURA, R. O.; YAMAGATA S.; MIURA, Y.; HARADA, T.; YAMAGATA, T. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (Zymography). **Anal Biochem**, 1995, 225, p. 333–340.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, 2003, 65, p. 2897-2912.

MORA-ABANDO, D.; GUERRERO-VARGAS, J.; PRIETO-SÁNCHEZ, R.; BELTRÁN, J.; RUCAVADO, A.; SASSA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; AYERBE, S.; LOMONTE, B. Proteomic and functional profiling of the of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interespecific variation with *Bothrops asper* venom. **Journal of Proteomics**, 2014, 96, p. 159-172.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DELLA-CASA, M. S.; DAVID, A. S.; ASSAKURA, M. T.; BUTERA, D.; LEBRUN, I.; SHANNON, J. D.; SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch. Biochem. Biophys.**, 2003, 409, p. 395-401.

NAKASHIMA, K.; OGAWA, T.; ODA, N.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; KIHARA, H. OHNO, M. Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A₂ isozymes., **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1993, 90, p. 5964–5968.

OHNO, M.; MÉNEZ, R.; OGAWA, T.; DANSE, J. M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FROMEN, C.; DUCANCEL, F.; ZINN-JUSTIN, S.; LE DU, L. H.; BOULAIN, J. C.; TAMIYA, T.; MÉNEZ, A. Molecular Evolution of Snake Toxins: Is the Functional Diversity of Snake Toxins Associated with a Mechanism of Accelerated Evolution?. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, 1998, 59, p. 307–364.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M. B.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J. L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRÍGUEZ, L. M.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L. M.; URIBE, F. L.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p.1107-1114, 2002.

PARKINSON, C. L., CAMPBELL, J. A., CHIPPINDALE, P. Multigene phylogenetic analysis of pitvipers, with comments on their biogeography. In: HÖGGREN, M., SHUETT, G. W., GREENE, H., DOUGLAS, M. E. (Ed.). *Biology of the Vipers*. **Eagle Montain Publishing**, Eagle Monatain, UT, 2002, p. 93-110.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. D. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Publishing Group**. 2003, 33, p. 311-323.

PÉREZ, A. V.; SARAVIA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C. D.; SOARES, A. M; GUTIÉRREZ, J. M. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, 2007, 49, p. 1063-1069.

PLACE, A. J.; ABRAMSON, C. I. A Quantitative analysis of the ancestral area of rattlesnakes. **Journal of Herpetology**. 2004, 38, p. 151-156.

PONNUDURAI, G.; CHUNG, M. C.; TAN, N. H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Arch. Biochem. Biophys.** 1994, 313, p. 373–378.

PREZOTTO-NETO, J. P.; KIMURA, L. F.; ALVES, A. F.; GUTIEÉRREZ, J. M.; OTERO, R.; SUÁREZ, A. M.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C. Biochemical and biological characterization of *Bothriechis schlegelii* snake venoms from Colombia and Costa Rica. **Exp. Biol. Med.**, 2016, 0, p. 1–11.

QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; FERGUSON, J. E.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S.; WÜSTER, W. Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. **J. Biogeogr.**, 2007, 34, p. 1296-1312.

REZA, M. A.; LE, T. N. M.; SWARUP, S; KINI, R. M. Molecular evolution caught in action: gene duplication and evolution of molecular isoforms of prothrombin activators in *Pseudonaja textilis* (brown snake). **J. Thromb. Haemost.** 2006, 4 p. 1346–1353.

RIOUX, V.; GERBOD, M. C.; BOUET, F.; MÉNEZ, A.; GALAT, A. Electrophoresis, 1998, 19, p. 788–796.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, 2007, 50, p. 153-165.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; AGUILAR, I.; GIRON, M.; RODRIGUEZ-PULIDO, V. Haemorrhagic activity of neotropical rattlesnake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941) venom. **Nat. Toxins.** 1998, 6, p. 15-18.

RUSSEL, F. E. Toxic effects of terrestrial animal venoms and poisons. In: Klaasse C. D. (Ed.). Casarett and Doull's **Toxicology: The Basic Science of Poisons**, New York: McGraw-Hill Co, 2001, p. 945-964.

SANO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN. W. H.; MÁLAQUE, C. M.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica**. São Paulo: Sauvier, 2009, p. 335-336.

SAMPAIO S. C.; HYSLOP S.; FONTES M. R.; PRADO-FRANCESCHI J.; ZAMBELLI V. O.; MAGRO A. J.; BRIGATE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, 2010, 55, p. 1045-60.

SAVIOLA, A. J.; PLA, D.; SANZ, L.; CASTOE, T. A.; CALVETE, J. J.; MACKESSY, S. P. Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab®, **J. Proteome**, 2015, 121, p. 28–43.

SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V.; GUEVARA, C.; LÓPEZ, J. C.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. **Rev. Bio. Top.**, 2002, 50(1), 337-346

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, 2006 v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacol. Physiol.**, 2006, 19, p. 296-302. Review.

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

STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.** 2007, 41, p.132-140.

SUGUIO, K.; SALLUN, A. E. M. Capítulo 27: Geologia do Quaternário e Geologia Ambiental. In: NETO, V. M. BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C. D, R.; NEVES, B. B. B. (Organizadores). São Paulo: Beca, 2004, p. 461-465.

SUNAGAR K.; FRY B. G.; JACKSON T. N.; CASEWELL N. R.; UNDHEIM E. A.; VIDAL N., ALI S. A.; KING G. F.; VASUDEVAN K.; VASCONCELOS V.; ANTUNES A. Correction: Molecular Evolution of Vertebrate Neurotrophins: Co-Option of the Highly Conserved Nerve Growth Factor Gene into the Advanced Snake Venom Arsenal. **PLoS One**. 2013, 8, 11.

TASOULIS, T.; ISBISTER, K. G. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, 2017, 9, 290. Review

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A**, 1979, 76, p. 4350–4354

VIALA, V. L.; HILDEBRAND, D.; FUCASE, T. M.; SCIANI, J. M.; PREZOTTO-NETO, J. P.; RIEDNER, M.; SANCHES, L.; NISHIMURA, P. J.;

OGUIURA, N.; PIMENTA, D. C. Proteomic analysis of the rare Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis* venom: evidence of a broad arsenal of toxins. **Toxicon**. 2015, 107, p. 234–251.

WANAGA S, SUZUKI T. Enzymes in snake venom. In: LEE C. Y., editor. Snake venoms. Berlin: Springer; 1979. p. 95–99

WARRELL D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: CAMPBELL J. A.; LAMAR W. W., editors. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca and London: **Comstock Publishing Associates**; 2004. p. 709-61.

WIEZEL, G. A.; DOS SANTOS P. K.; CORDEIRO F. A., BORDON K. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO H. S.; UEBERHEIDE, B., ARANTES E. C. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**. 2015 Dec 1;107(Pt B):359-68.

WÜSTER, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **J. Mol.**, 2005, 14, p. 1095-1108.

WWW.REPTILE-DATABASE.ORG. Acessado dia 14 de agosto de 2018.

WWW.TOXINFO.ORG/ANTIVENOMS/INDEX_PRODUCT.HTML. Acessado dia 03 de setembro de 2018.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D.; CAMARGO, A. C. M.; HO, P. L.; SERRANO, S. M. T. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **J. Prot. Res.**, 2010, 9, p. 2278-2291.

ZHOU, P.; MULVANEY, S. J.; REGENSTEIN, J. M. Properties of Alaska Pollock Skin Gelatin: A Comparison with Tilapia and Pork Skin Gelatins. **C: Food Chemistry and Toxicology**, 2006, 71(6), p. 313-321.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; GONÇALVES, L. R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, 2010, 55, p. 227-234.

ZULIANI, J. P.; KAYANO, A. M.; ZAQUEO, K. D.; NETO, A. C., SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; STABELI, R. G. Snake venom L-amino acid oxidases: some considerations about their functional characterization. **Protein Pept. Lett.** 2009, 16, p. 908–912.

APÊNDICE: Identificação pelo PEAKS STUDIO® V8.5 das proteínas dos venenos das serpentes do gênero *Crotalus* ssp. pelo programa Peaks. Após fracionamento por gel filtração, cada eluato (20 µL) foi submetido à digestão triptica e em seguida analisado por espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF. Score da proteína (-10lgP), Cobertura (%) porcentagem de cobertura na proteína; Massa: massa molecular dos peptídeos gerados em Dalton (Da); m/z: razão massa sobre carga em Da. A) *C. v. viridis*, B e C) *C. s. scutulatus* (Sigma), D) *C. s. scutulatus* (Flórida), E) *C. atrox*, F) *C. veigrandis*, G) *C. d. cascavela*, H) *C. d. collilineatus*, I) *C. d. terrificus* (Butantan), J) *C. d. terrificus* (SC), K) *C. d. terrificus* (RS).

A

C. viridis viridis						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
trJ3S058J3S058_CROAD	26,53	1	K.SNFQPPK.L	816,4130	817,4322	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1
trJT1E6V1JT1E6V1_CROOH	33,22	2	R.VIEIQNDR.E	1113,5778	557,8101	LAO-CohPH-1 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1
sp[C9E1R8]VM3V3_CROVV	171,16	22	R.MYEIVNTVNEIYR.Y	1642,8025	822,4016	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VMP-III OS=Crotalus viridis viridis PE=2 SV=1
			R.M(+15.99)YEIVNTVNEIYR.Y	1658,7974	830,3795	
			R.FVELFLVVDK.A	1207,6852	604,8286	
			R.KKHDNAQLLTAIDLDR.V	1850,0010	617,6686	
			R.VIGLAYVGSVC(+57.02)HPKR.S	1686,8698	563,2778	
			R.NQKGNYYGYC(+57.02)R.K	1421,6146	711,8041	
			R.VIGLAYVGSVC(+57.02)HPK.R	1530,7687	766,3793	
			K.MFYSDNEDEHKGMVLPGTK.C	2081,9551	694,9883	
			R.FVELFLVVDKAMVTK.N	1737,9739	580,3287	
			R.LYC(+57.02)KDNSPQGNNPC(+57.02)K.M	1793,7825	897,8925	
			K.FSKSGTEC(+57.02)R.A	1070,4814	536,2551	
			K.NNGDLKIKTR.M	1272,6786	637,3647	
R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7703				
K.GNYGYC(+57.02)RK.E	1179,5131	590,7665				
trJ3S3W0J3S3W0_CROAD	67,69	5	K.NSVGIVQDHR.S	1123,5734	562,7766	Snake venom metalloproteinase (Type II) 5h OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1
			R.IYETVNALNVFQR.M	1678,9042	840,4493	
			L.VIGGDEC(+57.02)NINEHR.F	1511,6787	756,8370	
spJ3RY93IVSPC_CROAD	120,68	17	L.SLPSPSPSVGSVC(+57.02)R.I	1428,7031	715,3502	Snake venom serine proteinase 12 OS=Crotalus adamanteus PE=1 SV=1
			K.TVPNEDEQTR.V	1187,5419	594,7585	
trJ3S0F3J3S0F3_CROAD	28,13	0	R.GPAESK.G	587,2914	588,2976	Nuclear receptor coactivator 3 isoform X7 OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1
tr[A0A1W7RB84]A0A1W7RB84_CROAD	63,81	8	K.IHLGVHVK.K	889,5134	445,7769	Cadam10_SVSP-6 OS=Crotalus adamanteus PE=3 SV=1
trJT1E6S9JT1E6S9_CROOH	132,01	25	K.VILPDVPHC(+57.02)VNINLLNYSVC(+57.02)R.A	2494,2825	832,4216	Kallikrein-CohCl-4 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1
trJT1DP94JT1DP94_CROOH	101,25	15	K.VFDYTDWISIIAGKK.T	1882,9829	628,6578	Kallikrein-CohLL-7 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1
sp[Q8QHK2]VSP2_CROAT	122,93	14	L.VVGGDEC(+57.02)NINEHR.S	1497,6630	749,8322	Snake venom serine protease catroxase-2 OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1
			K.KVPNEDEQTR.N	1214,5891	608,2869	
			H.IMGWGSITPIEK.T	1330,6954	666,3628	

C. scutulatus (Sigma)						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
spjP62022 PA2BC_CRODU	191,58	80	R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	2015,8699	1008,9424	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1
			K.YGMFYPPDSR.C	1297,5437	649,7822	
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	502,5200	
			F.YAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1615,6337	808,8160	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	763,0088	
			F.YGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1234,4648	618,2432	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2109	
			K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	720,3077	
			Y.GC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1071,4015	536,7031	
			K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,8134	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1612,7384	807,3705	
			G.HLLQFNK.M	898,5024	450,2617	
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965,3695	483,6917	
			K.C(+57.02)NWKWDIYPYSLK.S	1686,8075	844,4063	
			E.GHLLQFNK.M	955,5239	478,7636	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,7073	
			R.KNAIPFYAFY.G	1232,6229	617,3169	
			R.KNAIPFYAF.Y	1069,5596	535,7868	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7597	
			Y.SLKSGYITC(+57.02)GK.G	1212,6172	607,3130	
R.SLSTYKGYMFYPPDSR.C	1976,8978	659,9597				
R.SLSTY.K	569,2697	570,2793				
R.RSLSTYK.Y	853,4658	427,7513				
K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DRVAAEC(+57.02)LR.R	2541,0505	848,0104				
Y.ITC(+57.02)GK.G	577,2894	578,2903				
trjT1DP86 T1DP86_CROOH	129,09	39	R.ILC(+57.02)AGILEGGK.D	1129,6165	565,8167	Kallikrein-CohCl-5 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1
			L.VVGGDEC(+57.02)NINEHR.S	14976,6300	749,8714	
			L.SLPSSPPSVGSVC(+57.02)R.I	1428,7031	715,3532	
			S.NSEIAPLSLPSSPPSVGSVC(+57.02)R.I	2290,1375	764,3860	
			V.GGDEC(+57.02)NINEHR.S	1299,5262	650,7680	
			R.AAYPELPATSR.I	1174,5981	588,3118	
			R.IMGWGISPTK.E	1201,6530	601,8469	
			K.ILNEDEQTR.D	1116,5411	559,2849	
			K.ETYPDVPHC(+57.02)ANINLLEYEVC(+57.02)R.A	2591,1785	864,7391	
			K.ILNEDEQTRDPK.E	1456,7157	486,5736	

B

C. scutulatus (Sigma)						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
tr J3S3W7 J3S3W7_CROAD	75,2	14	L.VIGGDEC(+57.02)NINEHR.S R.TLC(+57.02)AGILEGGK.G I.LGGDEC(+57.02)NINEHR.S K.DNEKDKDMLLR.L	1511,6787 1117,5801 1299,5262 1488,7606	504,9130 559,7937 650,7680 497,2727	Snake venom serine proteinase 7c OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1
tr A0A1J0R046 A0A1J0R046_CROSS	191,58	80	R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G K.YGYMFYPSR.C R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L F.YAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G F.YGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G K.SGYITC(+57.02)GK.G K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G Y.GC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G K.WDIYPYSLK.S R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)Y.C G.HLLQFNK.M R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02) K.C(+57.02)INTKWDIYPYSLK.S E.GHLLQFNK.M R.VAAEC(+57.02)LR.R R.KNAIPFYAFY.G R.KNAIPFYAF.Y K.MIKFETR.K Y.SLKSGYITC(+57.02)GK.G R.SLSTYKYGYMFYPSR.C R.SLSTY.K R.RSLSTYK.Y K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DRVAAEC(+57.02)LR.R Y.ITC(+57.02)GK.G	2015,8699 1297,5437 1504,5356 1615,6337 2286,0139 1234,4648 884,4062 2157,9189 1071,4015 1183,5913 1612,7384 898,5024 965,3695 1686,8075 955,5239 817,4116 1232,6229 1069,5596 923,4899 1212,6172 1976,8978 5692,6970 853,4658 2541,0505 577,2894	1008,9424 649,7822 502,5200 808,8160 763,0088 618,2432 443,2109 720,3077 536,7031 592,8134 807,3705 450,2617 483,6917 844,4063 478,7636 409,7073 617,3169 535,7868 462,7597 607,3130 659,9597 570,2793 427,7513 848,0104 578,2903	Phospholipase A2, group IIG B2, Mojave toxin B-subunit OS=Crotalus scutulatus scutulatus
sp O93364 OXLA_CROAD	113,25	26	R.VIEIQNDR.E K.LNEFSQENENAWYFIK.N K.STTDLPSR.F K.YILDKYDYSTK.E K.SAAQLYVESLR.K K.NGLTATSNPK.R G.KSAAQLYVESLR.K K.VQVHFNAR.V K.VVEELR.S K.NNPGLLEYPVKPSEEGK.S K.EYLLK.E R.SGTKIFLTC(+57.02)TK.K K.NNPGLLEYPVKPSEEGKSAAQLYVESLR.K R.DVNRASENPSG.I C.AHDRNPLEE(+57.02)FR.E	1113,5778 2030,9374 875,4348 1508,7399 1235,6510 1001,5142 1363,7460 969,5144 743,4177 1869,9471 664,3795 1254,6642 3087,5876 1144,5109 1542,6997	557,8079 677,9781 438,7311 503,9183 618,8322 501,7755 682,8699 485,7787 372,7254 624,3232 665,3551 628,3340 1030,1969 573,2727 515,2413	L-amino-acid oxidase OS=Crotalus adamanteus PE=1 SV=1

C

C. scutulatus (Flórida)						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
s p P62023 PA2B1_CROSS	145,61	78	K.YGYMFYFSDSR.C	1297,5437	649,7764	Bas ic phos pholipas e A2 Mtx-b OS=Crotalus s cutulatus s cutulatus PE=1 SV=1
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2708	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	762,9952	
			F.YGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1234,4648	618,2438	
			K.C(+57.02)NTKWDIYPYSLK.S	1686,8075	844,4082	
			K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	720,309	
			F.YAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1615,6337	808,8123	
			Y.GC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1071,4015	536,7115	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	2015,8699	1008,9603	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2188	
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DRVAEC(+57.02)LR.R	2541,0505	848,0165	
			R.SLSTYKYGYMFYFSDSR.C	1976,8978	659,9725	
			G.HLLQFNK.M	898,5024	450,2596	
			K.WDIYPYSLK.S	1183,6913	592,8005	
			R.KNAIPFYAF.Y	1069,5596	535,7866	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7521	
			Y.SLKSGYITC(+57.02)GK.G	1212,6172	607,315	
			R.SLSTYK.Y	697,3646	698,3792	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,716	
			E.GHLLQFNK.M	955,5239	478,7691	
R.DATDRC(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	2062,7754	688,5944				
R.KNAIPFYAFY.G	1232,6229	617,3135				
R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1612,7384	807,3763				
tr T1DP95 T1DP95_CROOH	103,97	37	K.TVPSPPSVGTR.V	1187,5419	594,7761	Kallikrein-CohLL-2 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1
			L.SLPSSPPSVGVC(+57.02)R.I	1428,7031	715,3489	
			K.TLC(+57.02)AGILEGGK.D	1117,5801	559,8348	
			R.LDSPVNSNIEHAPLSLPSSPPSVGVC(+57.02)R.I	2888,4338	963,8246	
			L.VIGGDEC(+57.02)NINEHR.F	1511,6787	756,8413	
			L.SWGGDDPC(+57.02)AQPR.L	1287,5302	644,7706	
			R.LPAVYTK.V	790,4589	396,244	
			L.GGDEC(+57.02)NINEHR.F	1299,5262	650,7681	
			K.TLC(+57.02)AGILEGGKDC(+57.02)K.G	1607,7646	536,9279	
			A.AYPEFGLPATSK.T	1279,6448	640,8303	
			L.SLPSSPPSVGVC(+57.02)R.I	1418,6824	710,3401	
			R.TLC(+57.02)AGILEGGK.D	1117,5801	559,8348	
tr A0A1W7RB66 A0A1W7RB66_CROAD	85,82	23	K.ILNEDEQTR.D	1116,5411	559,2708	Cadam 10_SVSP-12 OS=Crotalus adam anteus PE=3 SV=1
			R.JMGWGTISPTK.K	1189,6166	595,8075	
			V.GGDEC(+57.02)NINEHR.S	1299,5262	650,7681	
			K.ILNEDEQTRDPK.E	1456,7157	486,5791	
			R.VIEIQNDR.E	1113,5778	557,7994	
s p O93364 OXLA_CROAD	81,56	14	K.NGLTATSNPK.R	1001,5142	501,7731	L-am ino-acid oxidas e OS=Crotalus adam anteus PE=1 SV=1
			K.LNEFSQENENAWYFIK.N	2030,9374	677,9851	
			K.SAAQLYVESLR.K	1235,651	618,8293	
			R.KVVEELR.S	871,5127	436,7407	
			K.STDDLPSR.F	875,4348	438,7217	
			K.VGVHFNAR.V	969,5144	485,7676	
			K.EYLLK.E	664,3795	665,387	
s p Q8QHK2 VSP2_CROAT	66,03	13	H.IMGWGSITPIEK.T	1330,6954	666,3454	Snake venom s erine proteas e catroxas e-2 OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1
			R.TLC(+57.02)AGIPEGGK.D	1101,5488	551,7959	
			V.GGDEC(+57.02)NINEHR.S	1299,5262	650,7681	
s p Q90282 VM3VB_CROAT	74,52	12	R.LYC(+57.02)KDNPSGQNNPC(+57.02)K.M	1793,7825	598,9405	Zinc m etalloproteinas e-dis integrin-like VAP2B OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1
			R.FVELFLVVDKAMVTK.N	1737,9739	580,3322	
			R.FVELFLVVDK.A	1207,6852	604,8415	
			R.NQKGNYYGYC(+57.02)R.K	1421,6146	711,8059	
			Y.TLNAFGEWR.K	1092,5352	547,3001	
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7569	
tr J3SBP4 J3SBP4_CROAD	57,99	20	R.KKHDAQLLTAIDLDR.V	1850,001	617,6775	Phos pholipas e A2 4 OS=Crotalus adam anteus PE=2 SV=1
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.A	1504,5356	753,2708	
			Q.DATDRC(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.A	2062,7754	688,5944	
G.SLVQFETLIMK.V	1307,7159	654,8619				

D

C. atrox						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
gj 152149001	142.49	29	R.MYEIVNTVNEIYR.Y	1642,8025	822,4140	Chain B, Crystal Structure Of Vap2 From Crotalus Atrox Venom (Form 2-5 Crystal)
			R.VIGLAYVGS MC(+57.02)HPKR.S	1686,8698	563,3007	
			R.FVELVLVVDKAMVTK.N	1689,9739	845,9937	
			R.NQKGNYYGYC(+57.02)R.K	1421,6146	711,8049	
			K.MFYSDNEDEHKGMVLPGTK.C	2081,9551	694,9819	
			R.LYC(+57.02)KDNSPGQNNPC(+57.02)K.M	1793,7825	598,9453	
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7560	
			K.C(+57.02)ADGKVC(+57.02)SNGHC(+57.02)VDVATAY	2082,8557	695,2948	
Y.TLNAFGEWR.K	1092,5352	547,2672				
sp A4PBQ9 VM3VA_CROAT	140.22	20	R.MYELANTVNDIYR.Y	1600,7555	801,3763	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VAP2A OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1
			R.LYC(+57.02)KDNSPGQNNPC(+57.02)K.M	1783,7617	595,5840	
			R.VIGLAYVGS MC(+57.02)HPKR.S	1686,8698	563,3007	
			R.FVELVLVVDKAMVTK.N	1689,9739	845,9937	
			R.NQKGNYYGYC(+57.02)R.K	1421,6146	711,8049	
			K.MFYSDNEDEHKGMVLPGTK.C	2081,9551	694,9819	
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7560	
			K.C(+57.02)ADGKVC(+57.02)SNGHC(+57.02)VDVATAY	2082,8557	695,2948	
Y.TLNAFGEWR.K	1092,5352	547,2672				
gj 710354	138.06	18	R.MYEIVNTVNEIYR.Y	1642,8025	822,4140	catrocollastatin precursor OS=Crotalus atrox
			R.VIGLAYVGS MC(+57.02)HPKR.S	1686,8698	563,3007	
			R.NQKGNYYGYC(+57.02)R.K	1421,6146	711,8049	
			K.MFYSDNEDEHKGMVLPGTK.C	2081,9551	694,9819	
			R.LYC(+57.02)KDNSPGQNNPC(+57.02)K.M	1793,7825	598,9453	
			R.KTDLLTR.K	845,4971	423,7560	
			K.C(+57.02)ADGKVC(+57.02)SNGHC(+57.02)VDVATAY	2082,8557	695,2948	
			Y.TLNAFGEWR.K	1092,5352	547,2672	
sp P00624 PA2A_CROAT	93.72	20	G.SLVQFETLIMK.I	1307,7159	654,8599	Acidic phospholipase A2 OS=Crotalus atrox PE=1 SV=2
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.A	1504,5356	502,4801	
			G.SLVQFETLIMKIAGR.S	1704,9596	569,3323	
			E.GSLVQFETLIMK.I	1364,7373	683,3726	
tr A0A1W7RB69 A0A1W7RB69_CROAD	65.44	11	L.VVGGDEC(+57.02)NINEHR.S	1497,6630	749,8468	Cadam10_SVSP-9 OS=Crotalus adamanteus PE=3 SV=1
			L.SLPSSPPSVGSVC(+57.02)R.I	1428,7031	715,3289	
tr A0A1J0R063 A0A1J0R063_CROAT	56.04	8	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.A	1504,5356	502,4801	Phospholipase A2, group IIG, acidic-Pla2-gA1 OS=Crotalus atrox GN=Pla2g2gA1 PE=3 SV=1
tr A0A1L8D5W4 A0A1L8D5W4_BOTAT	22.41	5	L.VVGGDEC(+57.02)DINEHR.F	1498,8470	500,5458	BATXSVP3 OS=Bothrops atrox PE=2 SV=1

m

C. vegrandis						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
gij743540688	153.26	16	R.MYELANTVNDIYR.Y	1600.7555	801.4034	Metalloproteinase (type III) 4a OS=Crotalus horridus
			R.LYCI(+57.02)KDNSPGQNNPC(+57.02)K.M	1793.7825	598.9468	
			R.FVELVLVVDKAMVTK.N	1689.9739	564.3440	
			R.FVELVLVVDK.A	1159.6852	580.8587	
			R.KTDLLTR.K	8454.9710	423.7668	
			K.MFYSDNEDEHKGMLVPGTK.C	2081.9551	695.0048	
			K.GNYYGYC(+57.02)R.K	1051.4181	526.7249	
			Y.TLNAFGEWR.K	1092.5352	547.2811	
			K.SGSQC(+57.02)GHGDC(+57.02)C(+57.02)EQC(+57.02)K.F	1768.6022	590.5589	
			M.YELANTVNDIYR.Y	1469.7151	735.8776	
K.AMVTK.N	548.2992	549.3244				
gij144905068	143.20	15	R.MYELANTVNDIYR.Y	1600.7555	801.4034	vascular apoptosis-inducing protein 2A OS=Crotalus atrox
			R.FVELVLVVDKAMVTK.N	1689.9739	564.3440	
			R.FVELVLVVDK.A	1159.6852	580.8587	
			R.KTDLLTR.K	845.4971	423.7668	
			K.MFYSDNEDEHKGMLVPGTK.C	2081.9551	695.0048	
			K.GNYYGYC(+57.02)R.K	1051.4181	526.7249	
			Y.TLNAFGEWR.K	1092.5352	547.2811	
			K.SGSQC(+57.02)GHGDC(+57.02)C(+57.02)EQC(+57.02)K.F	1768.6022	590.5589	
			M.YELANTVNDIYR.Y	1469.7151	735.8776	
			Q.LLTAIDLDR.V	1028.5865	515.3109	
K.AMVTK.N	548.2992	549.3244				
L.LTAIDLDR.V	915.5025	458.7795				
trjA0A0K8RYQ8jA0A0K8RYO8_CROHD	118.09	12	K.LRPGAQC(+57.02)ADGLC(+57.02)C(+57.02)DQC(+57.02)R.F	2035.8445	679.6262	Metalloproteinase (Type II) 3a OS=Crotalus horridus PE=3 SV=1
			R.HDTGSC(+57.02)SC(+57.02)GGY.S	1199.3972	600.7189	
			A.GEEC(+57.02)DC(+57.02)SSPANPC(+57.02)C(+57.02)DAATC(+57.02)K.L	2257.7803	1129.8981	
			K.YNGSDSKIR.R	1066.5043	534.2700	
spjP86169jPA2BA_CRODR	113.26	75	R.HDTGSC(+57.02)SC(+57.02)GGYSC(+57.02).I	1446.4598	724.2431	Basic phospholipase A2 A OS=Crotalus durissus ruruima PE=1 SV=1
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504.5356	502.5261	
			K.YGYMFYPSR.C	1297.5437	649.7826	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884.4062	443.2216	
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965.3695	483.9000	
			HLLQFNK.M	898.5024	450.2634	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817.4116	409.7207	
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DR.V	1741.6494	871.8344	
			R.KNAIPFYFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286.0139	763.0229	
			K.WDIYPYSLK.S	1183.5913	592.8180	
trjC9E7C4jC9E7C4_CRODC	80.32	25	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.V	1504.5356	502.5261	Acidic PLA2 OS=Crotalus durissus cascavella PE=2 SV=1
			K.QTC(+57.02)EC(+57.02)DGVAAVC(+57.02)FR.D	1671.6803	836.8552	
			R.DNIPSYDKK.Y	1078.5294	540.2782	
gij426205815	59.19	2	R.NGLTIVTSNPK.H	1029.5454	515.7921	L-amino acid oxidase, partial OS=Crotalus durissus cumanensis
trjJ3S817jJ3S817_CROAD	51.40	16	R.FC(+57.02)TEQAK.G	882.3906	442.2111	C-type lectin 11b OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1
			K.TWDDAERFC(+57.02)TEQAK.G	1755.7522	586.2694	
			K.GISYIWIGLR.V	1176.6655	589.3563	
trjT1E7K6jT1E7K6_CROOH	43.64	11	A.LSLPSSPPSVGSVC(+57.02)R.I	1541.7871	771.9002	Kallikrein-CohPH-4 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1
			R.AAYPEYGLPATSR.T	1394.6830	698.3350	
spjQ8QHK3jVSP1_CROAT	43.64	11	P.LSLPSSPPSVGSVC(+57.02)R.I	1541.7871	771.9002	Snake venom serine protease catroxase-1 OS=Crotalus atrox PE=1 SV=1
			R.AAYPEYGLPATSR.T	1394.6830	698.3350	
trjG9DCH9jG9DCH9_CROOH	24.83	10	K.YEDWAEESYC(+57.02)VYFK.S	1887.7661	944.8947	C-type lectin 3 OS=Crotalus oreganus helleri PE=2 SV=1
gij82217207	25.08	7	L.DTPAGPDGGPR.G	1135.5258	568.7687	RecName: Full=Bradykinin potentiating and C-type natriuretic peptides

7

C. cascavella						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
sp P62022 PA2BC_CRODU	167.99	67	K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	1080,0785	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1
			R.SLSTYKYGYMFYDPSR.C	1976,8978	659,9698	
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2663	
			K.YGYMFYDPSR.C	1297,5437	649,7372	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1612,7384	807,3641	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	2015,8699	1008,8804	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6820	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	763,0245	
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965,3695	483,6698	
			K.NAIPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1484,6434	743,3428	
			Y.GC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1071,4015	536,6655	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2244	
			P.YSLKSGYITC(+57.02)GK.G	1375,6805	459,5692	
			R.KNAIPFYAFY.G	1232,6229	617,2773	
			K.DATDRC(+57.02)C(+57.02)F.V	1043,3800	522,7126	
K.MIKFETR.K	923,4899	462,7567				
K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	1887,7749	944,8905				
E.GHLLQFNK.M	955,5239	478,7879				
sp P86806 PA2BA_CRODM	104.07	47	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2663	Basic phospholipase A2 10 OS=Crotalus durissus cumanensis PE=1 SV=1
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6820	
			Y.GC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.R	1071,4015	536,6655	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2244	
			S.YSLKSGYITC(+57.02)GK.G	1375,6805	459,5692	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7567	
			Y.KNEYMFYDPSR.C	1448,6394	725,3232	
sp P08878 PA1A_CRODU	100.32	38	K.YLQFSPENC(+57.02)QGESQPC(+57.02)	1942,7826	972,4367	Phospholipase A2 homolog crotoxin acid subunit CA OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1
			R.NSMPTYDYK.Y	1135,4492	568,6528	
			G.SLVEFETLMMK.I	1326,6564	664,3409	
			K.AAAIC(+57.02)FR.N	807,4061	404,7090	
K.LTGC(+57.02)DPTTD.V	978,3964	979,3920				

G

<i>C. d. collilineatus</i>						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
sp P86169 PA2BA_CRODR	136.25	81	K.YGYMFYPDSR.C	1297,5437	649,7307	Basic phospholipase A2 A OS=Crotalus durissus ruruima PE=1 SV=1
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DR.V	1741,6494	871,8286	
			K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	1079,8132	
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2739	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	763,0632	
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965,3695	483,7552	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2325	
			K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,8174	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,8076	
			F.YAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1615,6337	808,8568	
HLLQFNK.M	898,5024	450,2576				
R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6739				
gi 171848870	77.25	40	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2739	Chain D, Crotoxin B, The Basic Pla2 From Crotalus Durissus Terrificus.
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2325	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,8076	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6739	
			R.SLSTYKNEYMFYPDSR.C	1999,8986	667,5853	
gi 62697	77.25	36	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2739	crotoxin CB2 OS=Crotalus durissus
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2325	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,8076	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6739	
			R.SLSTYKNEYMFYPDSR.C	1999,8986	667,5853	

H

C. d. terrificus (But)						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
sp P62022 PA2BC_CRODU	146.02	80	K.YGYMFYPDSR.C	1297,5437	649,7516	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	502,5031	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	762,9828	
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DR.V	1741,6494	871,8023	
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DRVAAEC(+57.02)LR.R	2541,0505	847,9959	
			K.DATDRC(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	2062,7754	688,5736	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,1939	
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965,3695	483,6790	
			K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,7831	
			F.YAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1615,6337	808,7959	
			E.GHLLQFNK.M	955,5239	478,7559	
			Y.GC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1071,4015	536,6901	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7465	
			G.HLLQFNK.M	898,5024	450,2438	
			R.SLSTYK.Y	697,3646	698,3459	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6971	
sp P0CG56 PA2BB_CRODU	134.60	93	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	502,5031	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBb OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DR.V	1741,6494	871,8023	
			K.C(+57.02)NTKWDIYR.Y	1254,5815	628,2649	
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DRVAAEC(+57.02)LR.R	2541,0505	847,9959	
			R.KNAVPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	2001,8541	1001,9048	
			K.DATDRC(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	2062,7754	688,5736	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,1939	
			K.NGYMFYPDSR.C	1248,5233	625,2906	
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965,3695	483,6790	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7465	
			HLLQFNK.M	898,5024	450,2438	
			K.WDIYR.Y	751,3653	376,6649	
			R.KNAVPFYAFY.G	1218,6073	610,2894	
			Y.C(+57.02)GWGGQGRPK.D	1101,5138	551,7442	
			R.SLSTYK.N	697,3646	698,3459	
			R.KNAVPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1598,7228	800,3350	
R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6971				
g I171848870	119.63	75	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	502,5031	Chain D, Crotoxin B, The Basic Pla2 From Crotalus Durissus Terrificus.
			K.C(+57.02)NTKWDIYR.Y	1254,5815	628,2649	
			R.KNAVPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	2001,8541	1001,9048	
			K.DATDRC(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	2062,7754	688,5736	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,1939	
			R.C(+57.02)REPSETC(+57.02)	1037,3906	519,6858	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7465	
			SLLQFNK.M	848,4756	425,2436	
			K.WDIYR.Y	751,3653	376,6649	
			R.KNAVPFYAFY.G	1218,6073	610,2894	
			Y.C(+57.02)GWGGQGRPK.D	1101,5138	551,7442	
			R.SLSTYK.N	697,3646	698,3459	
			R.KNAVPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1598,7228	800,3350	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6971	
t A0A0F7ZAA3 A0A0F7ZAA3_CROAD	26.26	1	K.GGPYSNQ.K	721,3031	722,2470	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2-like OS=Crotalus adamanteus PE=2 S
g I38493077	20.08	6	K.GAHLVSIK.S	823,4916	412,7385	Chain C, The Crystal Structure Of The Snake Venom Toxin Convulxin

C. d. terrificus (SC)						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
sp P86169 PA2BA_CRODR	144.96	76	K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	1079,8934	Basic phospholipase A2 A OS=Crotalus durissus ruruima PE=1 SV=1
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2688	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	763,0175	
			R.C(+57.02)RGPSETC(+57.02)	965,3695	483,6973	
			Y.SLKSGYITC(+57.02)GK.G	1212,6172	607,3638	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2101	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	2015,8699	1008,9617	
			K.C(+57.02)NTKWDIYPYSLK.S	1686,8075	844,4023	
			K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	1887,7749	944,9001	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6772	
			R.KNAIPFYAFY.G	1232,6229	617,3451	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7631	
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DRVAAEC(+57.02)LR.R	2541,0505	848,0193	
			HLLQFNK.M	898,5024	450,2491	
sp P24027 PA2BA_CRODU	121.10	63	R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	753,2688	Phospholipase A2 crotoxin basic chain CBa2 OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1
			K.C(+57.02)NTKWDIYR.Y	1254,5815	628,2847	
			R.C(+57.02)REPSETC(+57.02)	1037,3906	519,7369	
			R.RSLSTYKNEYMFYFSDR.C	2155,9998	719,6774	
			Y.SLKSGYITC(+57.02)GK.G	1212,6172	607,3638	
			R.SLSTYKNEYMFYFSDR.C	1999,8986	667,6434	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2101	
			R.KNAIPFYAFY.G	1218,6073	610,3067	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6772	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7631	
			G.SLLQFNK.M	848,4756	425,2520	
sp P0CAS7 PA2BG_CRODU	96.99	47	R.C(+57.02)REPSETC(+57.02)	1037,3906	519,7369	Basic phospholipase A2 F17 OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1
			R.RSLSTYKNEYMFYFSDR.C	2155,9998	719,6774	
			Y.SLKSGYITC(+57.02)GK.G	1212,6172	607,3638	
			R.SLSTYKNEYMFYFSDR.C	1999,8986	667,6434	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2101	
			R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,6772	
			K.MLKFETR.K	923,4899	462,7631	
HLLQFNK.M	898,5024	450,2491				
tr A0A0F7Z4J9 A0A0F7Z4J9_CROAD	27.38	0	Y.THDMR.K	658,2857	659,3898	Transcription initiation factor TFIID subunit 2 isoform X1 OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1
gj 698375159	21.72	1	R.SSPGK.D	621,3122	622,2706	Metalloproteinase, ADAM28-like protein OS=Eublepharis macularius

C. d. terrificus (RS)						
Proteína	Score (-10lgP)	Cobertura (%)	Peptídeos	Massa (Da)	m/z	Descrição
sp P62022 PA2BC_CRODU	144.46	64	K.NAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2157,9189	1079,9611	Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBc OS=Crotalus durissus terrificus PE=1 SV=1
			F.YAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1615,6337	808,8172	
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.L	1504,5356	502,5198	
			K.C(+57.02)NTKWDIYPYSLK.S	1686,8075	844,4038	
			F.YGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1234,4648	618,2310	
			K.SGYITC(+57.02)GK.G	884,4062	443,2114	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	2286,0139	763,0070	
			Y.GC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1071,4015	536,7030	
			K.GTWC(+57.02)EEQIC(+57.02)EC(+57.02)DRVAAEC(+57.02)LR.R	2541,0505	848,0218	
			P.YSLKSGYITC(+57.02)GK.G	1375,6805	688,8486	
			Y.SLKSGYITC(+57.02)GK.G	1212,6172	607,3032	
			Y.AFYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1452,5703	727,2836	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)YC(+57.02)GW.G	2015,8699	1008,9355	
			R.KNAIPFYAFYGC(+57.02)Y.C	1612,7384	807,3877	
			K.MIKFETR.K	923,4899	462,7531	
			R.KNAIPFYAF.Y	1069,5596	535,7871	
			G.HLLQFNK.M	898,5024	450,2610	
			R.C(+57.02)C(+57.02)FVHDC(+57.02)C(+57.02)YGK.LAK.C	1816,7517	606,5922	
			K.WDIYPYSLK.S	1183,5913	592,8025	
			A.FYGC(+57.02)YC(+57.02)GWGGR.G	1381,5332	691,7549	
R.VAAEC(+57.02)LR.R	817,4116	409,7170				
gjl426205815	89.99	18	K.YILDKYDITYSTK.E	1508,7399	755,3722	L-amino acid oxidase, partial OS=Crotalus durissus cumanensis
			R.NGLTVTSNPK.H	1029,5454	515,7797	
			K.RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIEK.V	2656,2876	886,4361	
			K.VQVHFNR.V	969,5144	485,7717	
			K.STTDLPSR.F	875,4348	438,7302	
			K.SAAQLYVESLR.K	1235,6510	618,8184	
			G.KSAAQLYVESLR.K	1363,7460	682,8672	
			K.IFLT(+57.02)K.R	780,4204	391,2000	
			R.ETDYEEFLEIAR.N	1513,6936	757,8466	
			K.YILDKYDITYSTK.E	1508,7399	755,3722	
tr A0A0F7Z0X7 A0A0F7Z0X7_CROAD	81.64	13	K.RFDEIVGGMDQLPTSMYEAIEK.V	2656,2876	886,4361	Cadaml0_LAAO-1 OS=Crotalus adamanteus PE=2 SV=1
			K.VQVHFNR.V	969,5144	485,7717	
			K.STTDLPSR.F	875,4348	438,7302	
			K.SAAQLYVESLR.K	1235,6510	618,8184	
			G.KSAAQLYVESLR.K	1363,7460	682,8672	
			K.IFLT(+57.02)K.K	780,4204	391,2000	

K



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.