

Avaliação bioquímica, funcional e modificação química por PEGuilação
do fator de crescimento endotelial vascular da peçonha da serpente
Crotalus durissus terrificus

Isabela Gobbo Ferreira

Ribeirão Preto
2022

ISABELA GOBBO FERREIRA

Avaliação bioquímica, funcional e modificação química por PEGuilação
do fator de crescimento endotelial vascular da peçonha da serpente
Crotalus durissus terrificus

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Toxicologia no dia 20/12/2022. A versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

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

Ferreira Gobbo, Isabela

Avaliação bioquímica, funcional e modificação química por PEGuilação de um fator de crescimento endotelial vascular da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, 2022.

112 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani

1. Fator de crescimento endotelial vascular. 2. *Crotalus durissus terrificus*. 3. Peçonha de serpente 4. PEGuilação. 5. Migração celular.

RESUMO

FERREIRA, I. G. **Avaliação bioquímica, funcional e modificação química por PEGuilação de um fator de crescimento endotelial vascular da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*. 2022.** 112f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

As peçonhas de serpentes são consideradas ricas fontes de componentes com importantes ações farmacológicas. Portanto, estudar os diversos componentes presentes nessas peçonhas permite esclarecer a patogenia do envenenamento e identificar moléculas com potenciais aplicações biotecnológicas. No Brasil, as serpentes do gênero *Crotalus*, representado pela espécie *Crotalus durissus*, habitam diversas regiões do país e suas peçonhas são compostas por grande quantidade de proteínas (cerca de 95%), componentes não enzimáticos como carboidratos, cátions metálicos, aminas biogênicas, nucleosídeos, aminoácidos livres e uma pequena fração lipídica. No entanto, diversos componentes ainda não foram caracterizados, embora alguns já tenham sido identificados em análises ômicas (transcriptoma e proteoma), como é o caso do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) de *Crotalus durissus terrificus*. Os VEGFs são homodímeros não enzimáticos com massa molecular variando entre 20 e 30 kDa, com papel fundamental na angiogênese (crescimento de novos vasos), aumento de permeabilidade vascular, ação hipotensora, indução de migração celular e ação cardioprotetora em isquemias. No entanto, seu papel no envenenamento ainda não está totalmente elucidado. Diante disso, os objetivos do presente foram o isolamento e caracterização bioquímica, modificação química por bioconjugação com molécula de polietilenoglicol (PEGuilação) e avaliação funcional do VEGF da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (*CdtVEGF*). O isolamento do *CdtVEGF* foi realizado por meio de combinação de duas técnicas de cromatografia líquida como fase reversa e troca aniônica, respectivamente, sendo seu rendimento de 2%. A modificação química do *CdtVEGF* foi efetiva com a molécula de polietilenoglicol mPEG-maleimide de 5 kDa, sendo o PEG-*CdtVEGF* purificado por meio de cromatografia líquida de fase reversa em coluna C4 e esta PEGuilação foi confirmada por ELISA e espectrometria de massas (MALDI-TOF) com massa molecular de 31241.4 Da para o PEG-*CdtVEGF*. Por meio de análise em SDS-PAGE, o *CdtVEGF* migrou como homodímero sendo confirmado por espectrometria de massas por MALDI-TOF apresentando massas moleculares de 25524.0 Da para o dímero e 13315.7 Da para o monômero. Por LC/MS/MS foi possível determinar uma sequência para o *CdtVEGF* formado por 114 resíduos de aminoácidos. Por ELISA foi possível observar que o soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan reconhece o *CdtVEGF* e, por análise *in silico*, foram identificados 12 possíveis epítomos imunogênicos na molécula. Por meio de análise *in vitro*, *CdtVEGF* nativo e PEG-*CdtVEGF* tiveram influência na atividade metabólica de células endoteliais vasculares umbilicais (HUVECs) de linhagem humana, em todas as concentrações testadas (0,01; 0,1; 1; 5; 10 e 100 nM) sendo que essa influência está relacionada com a proliferação destas células. Além disso, as proteínas (5 nM) induziram migração celular da mesma linhagem, no ensaio de wound healing sendo que o *CdtVEGF* nativo teve uma atividade mais potente que o PEG-*CdtVEGF*. Nos ensaios *in vivo*, realizados com camundongos machos da linhagem C57Bl/6, o *CdtVEGF* nativo (0,01; 1 e 5 nM) foi capaz de influenciar no recrutamento de leucócitos para a cavidade intraperitoneal dos animais de maneira dose-dependente, aumentando preferencialmente o influxo de neutrófilos. Sua ação sobre a permeabilidade vascular foi confirmada com o aumento de proteínas nos exsudatos peritoneais. Interessantemente, o PEG-*CdtVEGF*, nas mesmas concentrações testadas, não teve influência nesses parâmetros, indicando que a PEGuilação foi capaz de blindar o *CdtVEGF* do sistema imune. Este trabalho apresenta grande relevância científica por ser pioneiro no que se refere à purificação, PEGuilação e estudo funcional de um VEGF da peçonha de *C. d. terrificus*. Adicionalmente, os resultados obtidos contribuem para a aplicação desta molécula em modelos de estudo de doenças isquêmicas, cicatrização de feridas, além de poder ser utilizada como uma ferramenta molecular no estudo de patologias que envolvem a angiogênese.

Palavras-chave: Fator de crescimento endotelial vascular. *Crotalus durissus terrificus*. Peçonha de serpente. PEGuilação. Migração celular.

ABSTRACT

FERREIRA, I. G. **Biochemical, functional evaluation, and chemical modification by PEGylation of a vascular endothelial growth factor from *Crotalus durissus terrificus* snake venom.** 2022. 112f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Snake venoms are considered rich sources of components with important pharmacological actions. Therefore, the study of the diverse components presents in these venoms allows to clarify the pathogenesis of the envenoming and identify molecules with biotechnological applications. In Brazil, snakes from *Crotalus* genus, represented by the *Crotalus durissus species*, inhabit several regions of the country and their venoms are mostly composed by proteins (95%), non-enzymatic components such as carbohydrates, metal ions, amines, nucleosides, free amino acids, and a small lipid fraction. However, several components have not yet been characterized, although have already been identified through omics analysis (transcriptome and proteome), as it is the case of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) from *Crotalus durissus terrificus*. VEGFs are non-enzymatic homodimers with molecular masses from 20 to 30 kDa, playing fundamental role on angiogenesis (growth of new vessels), inducing vascular permeability, hypotension, induction of cellular migration and cardioprotective role in ischemia. Nonetheless, its role in snake envenoming is not yet totally elucidated. Thus, the objectives of this study were the isolation and biochemical characterization, chemical modification using bioconjugation with a polyethyleneglycol molecule (PEGylation) and the functional evaluation of the VEGF from *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*VEGF). The isolation of *Cdt*VEGF was accomplished using two liquid chromatographic techniques with reversed phase and anionic exchange, respectively, with a yield of 2%. The chemical modification was effective with mPEG-maleimide molecule of 5 kDa, being PEG-*Cdt*VEGF purified through reversed phase using a C4 column and this PEGylation was confirmed with ELISA assay and mass spectrometry (MALDI-TOF) analysis with a molecular mass of 31241,4 Da for PEG-*Cdt*VEGF. Through SDS-PAGE, *Cdt*VEGF migrated as homodimer being confirmed with mass spectrometry by MALDI-TOF with a molecular mass of 25524,0 Da for the dimer and, 13315,7 Da for the monomer. Also, through LC/MS/MS it was possible to determine a sequence for *Cdt*VEGF with 114 amino acids residues. By ELISA it was possible to observe that the anticrotalid serum produced by Butantan Institute was able to recognize *Cdt*VEGF and, *in silico* analysis, demonstrated 12 immunogenic epitopes in the molecule. Through *in vitro* analysis, native *Cdt*VEGF and PEG-*Cdt*VEGF had influence on metabolic activity of human umbilical endothelial cells (HUVECs) in all tested concentrations (0,01; 0,1; 1; 5; 10 and 100 nM) knowing that this influence is related to proliferation of these cells. Besides that, the proteins (5nM) induced cellular migration, in wound healing assay, being that native *Cdt*VEGF had a more potent activity than PEG-*Cdt*VEGF. *In vivo* assays were performed using male C57Bl/6 mice, native *Cdt*VEGF (0,01; 1 and 5 nM) was able to influence at the leucocyte recruitment to the peritoneal cavity of the animals in a dose-dependent manner being the influx of neutrophils the preference cells. Its action on vascular permeability was confirmed with the protein increase in peritoneal exudates. Interestingly, PEG-*Cdt*VEGF, at the same concentrations, did not show influence on these parameters, indicating that PEGylation was able to shield *Cdt*VEGF from immune system. This work is of great scientific importance being pioneer regarding purification, PEGylation and functional study of a VEGF from *C. d. terrificus* snake venom. Additionally, the results obtained contributes for the application of this molecule in studies involving models of ischemic diseases, wound healing and in addition to being able to be used as a molecular tool in the study of pathologies involving angiogenesis.

Keywords: Vascular endothelial growth factor. *Crotalus durissus terrificus*. Snake venom. PEGylation. Cellular migration.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes do Brasil

A classificação das serpentes é essencial para o reconhecimento das espécies de importância médica, o que facilita os estudos toxicológicos. As serpentes pertencem à classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Serpentes (CALDWELL *et al.*, 2015). Esta subordem é composta de aproximadamente 3.709 espécies, 465 gêneros e 20 famílias (UETZ, 2022). No Brasil, até o momento, foram catalogadas 11 famílias, 75 gêneros, compreendendo 392 espécies (COSTA; BÉRNILS, 2018) e apenas três famílias são consideradas peçonhentas, a Elapidae, Colubridae e Viperidae. Dentre estas, estão incluídas um total de 62 espécies que causam acidentes de importância médica (BERNARDES, 2014).

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

A subfamília Crotalinae, incluída na família Viperidae, composta por diferentes gêneros (*Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*) apresenta um par de fosseta loreal, um órgão termorreceptor localizado entre a narina e o olho da serpente. Este órgão é capaz de detectar pequenas flutuações de radiações termais, identificando as presas endotérmicas e a direção delas (PATEL; KONG; HAMILTON, 2021).

No Brasil, existe somente uma espécie pertencente ao gênero *Crotalus* (popularmente conhecidas como cascavéis) denominada *Crotalus durissus* e está subdividida em 7 subespécies: *C. d. colillineatus*, *C. d. terrificus*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. cascavella*, *C. d. trigonicus* e *C. d. drynas* (UETZ, 2022).

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

Os dados epidemiológicos obtidos através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) entre os anos de 2018 e 2021 (os dados entre os anos de 2019 e 2021 ainda estão sujeitos a revisão) demonstra que é perceptível a oscilação entre os números de

acidentes ofídicos. Com relação aos acidentes crotálicos, os números de acidentes notificados oscilaram entre 2.500 a 2.900 casos, aproximadamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Acidentes ofídicos no Brasil entre os anos de 2018 e 2022.

Ano	<i>Crotalus</i>	<i>Bothrops</i>	<i>Lachesis</i>	<i>Micrurus</i>	Não-peçonhentas	Total
2018	2.560	20.132	530	266	2.162	25.650
2019*	2.733	22.215	597	344	2.523	28.472
2020*	2.827	21.668	466	275	2.228	27.475
2021*	2.459	20.511	331	286	1.894	25.465
2022*	45	351	4	7	27	434

Dados coletados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), do Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). *Dados sujeitos a revisão. *Acesso em 27 de outubro de 2022.

O envenenamento crotálico é caracterizado principalmente por sua ação neurotóxica que se deve à ação de neurotoxinas como a crotoxina, que atua tanto no sistema nervoso central quanto no periférico sendo capaz de induzir paralisia através da inibição da liberação de acetilcolina na fenda sináptica (NAJMAN; SESHADRI, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A peçonha de *C. durissus*, objeto de estudo desse trabalho, é composta majoritariamente por proteínas (90 - 95%), enzimas como, por exemplo, L-aminoácido oxidase, 5'- nucleotidase, proteases, fosfodiesterase, embora também apresente carboidratos, cátions metálicos, aminas biogênicas, nucleosídeos e uma pequena fração de lipídios e aminoácidos livres (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Dentre os componentes proteicos, a crotoxina corresponde a maior fração da peçonha, sendo responsável por cerca de 75% do total da peçonha (WIEZEL *et al.*, 2018), além de ser classificada como o principal componente tóxico. Esta proteína é composta de duas subunidades, uma básica (fosfolipase A₂), que apresenta ações miotóxica e neurotóxica, e outra ácida enzimaticamente inativa (crotapotina), capaz de inibir a atividade enzimática e aumentar a letalidade da fosfolipase A₂ quando complexada com esta (SAMPAIO *et al.*, 2010). Ainda, existem relatos de uma crotapotina potencialmente miotóxica, identificada na peçonha da serpente *Agkistrodon piscivorus piscivorus* que atua como uma proteína que se liga em receptores específicos, como os receptores para fatores de crescimento endotelial vascular (YAMAZAKI *et al.*, 2005).

Ainda, na peçonha crotálica, podemos encontrar metaloproteases, peptídeos natriuréticos, convulxininas, proteínas semelhantes à lectinas tipo-C, L-aminoácido oxidases, desintegrinas e peptídeos potencializadores de bradicinina, além de outros componentes com ações farmacológicas já conhecidas e descritas, como a crotalfina e a hialuronidase (BORDON *et al.*, 2012; KONNO *et al.*, 2008; WIEZEL *et al.*, 2018). Os componentes não enzimáticos presentes nas peçonhas de serpentes como fatores de crescimento neural (NGF, do inglês *Nerve*

Growth Factor) e endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endotelial Growth Factor*), também apresentam interesse científico sendo considerados componentes minoritários da peçonha (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017; TASIMA *et al.*, 2020) e portanto pouco estudados. Porém, podem contribuir significativamente para o quadro de envenenamento, com a indução da permeabilidade vascular facilitando assim o espalhamento das toxinas presentes na peçonha crotálica (MATSUNAGA *et al.*, 2009).

1.2. Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento estão associados com o crescimento e proliferação celular e constituem a principal classe de proteínas envolvidas com a angiogênese, vasculogênese, proliferação e sobrevivência de células endoteliais vasculares. Ainda são poucos os relatos de literatura descrevendo a presença e o isolamento destes compostos em peçonhas de serpentes, por isso, são consideradas moléculas minoritárias (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017).

Diversos fatores de crescimento são descritos em humanos e mamíferos, os quais tiveram seu papel elucidado e suas sequências proteicas depositadas em banco de dados (*UniProt databank - Universal protein resource knowledge database*). Neste banco de dados, existem, até o momento, 1.221 fatores de crescimento humanos com suas sequências de proteínas depositadas e revisadas e, dentre estes podemos citar fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*), fator de crescimento epidermal (EGF – *Epidermal growth factor*), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF – *Platelet-derived growth factor*), fator de necrose tumoral (TNF – *Tumor necrosis factor*), fator de crescimento de insulina - like proteína 5 (IGF – *Insulin-like growth factor-binding protein 5*), fator de crescimento de fibroblasto (FGF – *Fibroblast growth factor*), fator de crescimento neural (NGF – *neural growth factor*) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF – *Vascular endotelial growth factor*).

Com relação ao estudo de fatores de crescimento em peçonhas de serpentes, existem até o momento, 26 sequências proteicas depositadas e revisadas no banco de dados UniProt, sendo que 11 destas sequências estão relacionadas aos VEGFs isolados das peçonhas.

1.3. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O primeiro VEGF foi identificado há mais de 30 anos e foi denominado inicialmente de VPF – *Vascular permeability factor* ou fator de permeabilidade vascular, devido ao seu potencial em induzir um aumento de permeabilidade vascular, sendo frequentemente, um fator

específico para células endoteliais vasculares (LEUNG *et al.*, 1989). O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica, com massa molecular de 45 kDa contendo oito resíduos de cisteínas conservadas (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). Sua expressão é regulada em diferentes tecidos por diversos fatores, como hipóxia, liberação de citocinas, hormônios, oncogenes e genes supressores, no caso de tumores (FERRARA, 2004). Sua produção ocorre em diversos tipos de células, como as células endoteliais, macrófagos, células T ativadas, entre outras. Estas células expressam, pelo menos, sete diferentes isoformas de VEGF-A com diferentes números de aminoácidos: VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A_{165B}, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ e VEGF-A₂₀₆. Isso ocorre devido a um *splicing* alternativo de um único gene (BATES, 2010).

O VEGF é essencial durante os processos de angiogênese, seja fisiologicamente ou patologicamente, devido sua interação com receptores do tipo tirosina quinase: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. O primeiro é expresso em células endoteliais vasculares e em células como macrófagos, monócitos e células do sistema hematopoiético (TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005), já o VEGFR-2 é também expresso em células do sistema hematopoiético, em células endoteliais linfáticas e vasculares sendo que, é o principal mediador de efeitos de mitogênese, atuando na fase inicial da angiogênese e vasculogênese. Com relação ao VEGFR-3, este é expresso em células endoteliais linfáticas e, quando ativado, promove linfangiogenese (YAMAZAKI *et al.*, 2003).

Funcionalmente, o VEGF-A é bem descrito na literatura. Estudos demonstraram que foi capaz de induzir, *in vitro*, o crescimento de células endoteliais derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos e a promoção de angiogênese por induzir células endoteliais microvasculares a invadir géis com colágeno e formar estruturas capilares. Ademais, além de promover a angiogênese, foi comprovado que o VEGF-A pode induzir quimiotaxia de monócitos através da modulação da migração transendotelial e que este mecanismo pode ocorrer por meio de duas maneiras: i) por meio da produção de quimiocinas pelas células ou ii) por meio de ligação do VEGF a receptores para VEGF que as células possam expressar (ANCELIN *et al.*, 2004).

Embora o VEGF-A seja o principal e o mais estudado da família dessa classe de proteína, são descritos outros tipos de VEGFs: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, PIGF e EG-VEGF (MELINCOVICI *et al.*, 2018) e estão sumarizados na Tabela 2 com suas respectivas distribuições nos tecidos/células e suas funções.

Tabela 2 - Outros tipos de VEGFs.

Tipo de VEGF	Distribuição	Função
VEGF-B	Tecidos, músculo esquelético e miocárdio	Ligação no VEGFR-1 com indução de proliferação celular e angiogênese
VEGF-C	Produzido como uma pré-proteína	Ligação no VEGFR-2 e 3 com indução de proliferação e migração de células endoteliais e linfangiogênese
VEGF-D	Produzido como uma pré-proteína	Ligação no VEGFR-2 e 3 com indução de proliferação e migração de células endoteliais e linfangiogênese
VEGF-E	Genoma do vírus parapoxi Orf	Ligação no VEGFR-2 com indução de proliferação celular e angiogênese
VEGF-F	Peçonhas de serpentes	Ligação nos VEGFR-1 e 2, com indução de proliferação e migração celular, permeabilidade vascular e angiogênese
PDGF	Fator de crescimento de placenta	Crescimento do endotélio da placenta
EG-VEGF	Glândula endócrina	Crescimento do endotélio de glândula endócrina

1.3.1. Receptores para VEGFs (VEGFR) são primordiais para sua funcionalidade

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

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

A partir da ligação dos VEGFs em seus respectivos receptores, diversos eventos intracelulares ocorrem para que a função final aconteça. A seguir, as principais funções dessa classe de proteínas serão descritas.

1.3.1.1. Angiogênese e vasculogênese

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

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

A angiogênese patológica foi inicialmente proposta com base na resposta neovascular potente induzida por tumores. Posteriormente, foi demonstrado que tecidos normais também são fontes de atividade angiogênica e que diversas moléculas estão envolvidas neste processo. Dentre elas destacam-se as reguladoras positivas de angiogênese, como por exemplo, fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento transformador α e β , fator de crescimento do hepatócito, fator de necrose tumoral, angiogenina, interleucina-8 (IL-8) e angiopoietinas (FOLKMAN; SHING, 1992; KOH *et al.*, 2002).

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

1.3.1.2. Migração celular – *Wound healing*

Feridas crônicas, como úlceras nos pés causadas pela diabetes apresentam isquemia local e moléculas como VEGFs são candidatos terapêuticos devido à sua capacidade de induzir

migração celular e conseqüentemente, novos vasos sanguíneos serão formados. Em estudos com animais, é demonstrado que a administração de VEGF-A reestabelece angiogênese em membros isquêmicos causados pela diabetes (TAKESHITA *et al.*, 1994). Além disso, essa proteína tem a capacidade de melhorar a reepitalização de feridas diabéticas associado com aumento expressivo de formação de vasos (GALIANO *et al.*, 2004).

Esses dados sugerem um potencial terapêutico dos VEGFs para o tratamento de feridas diabéticas e estes estudos têm tido maior ênfase. Em 2018, autores puderam preparar plasmídeos expressando VEGF-A e PDGF os quais foram incorporados em nanoesferas no intuito de super regular a expressão gênica e testá-los em modelos de ratos de ferida diabética. Com os resultados, puderam indicar que a transferência genica combinada dos fatores de crescimento foi capaz de melhorar o processo de reparação nas úlceras diabéticas de membro inferior (SHI *et al.*, 2018).

Mais recentemente, um medicamento a base de RNA mensageiro designado a produzir o VEGF-A foi desenvolvido (AZD8601) para ser administrado de maneira intradérmica (SUN *et al.*, 2018). Este, demonstrou acelerar a cicatrização em modelo murino de ferida diabética (PEHRSSON *et al.*, 2019). Ainda, Almquist e colaboradores em 2020, puderam expandir esses conhecimentos afirmando que a dose de 92 µg é a necessária para produzir 50% de efeito máximo e que simulações por meio desse modelo murino demonstraram que uma única dose de 200 µg do AZD8601 pode reduzir o tempo para a cicatrização de 50% em até 5 dias (ALMQUIST *et al.*, 2020). Estes dados reforçam a importância dessa classe de proteínas para o tratamento de doenças e feridas isquêmicas.

1.3.1.3. Fatores de crescimento e sua correlação com recrutamento de leucócitos e permeabilidade vascular

Está bem estabelecido que o recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação está associado à angiogênese, e há evidências consideráveis sugerindo que a angiogênese e a inflamação ocorrem de forma interativa e sobreposta (AUERBACH; SIDKY, 1979; SIDKY; AUERBACH, 1975).

Os VEGFs promovem angiogênese pela estimulação da proliferação e sobrevivência de células endoteliais e por aumentar a permeabilidade de vasos e recrutar células precursoras vasculares da medula espinhal (SIA *et al.*, 2014). Além disso, VEGFs podem ser imunossupressores, autores relatam que VEGF é capaz de impedir o desenvolvimento de células T efectoras a partir de células progenitoras hematopoiéticas, mas são necessários estudos

adicionais para investigar os efeitos diretos dos VEGFs nas funções de células T (OHM *et al.*, 2003).

Diversos estudos indicam que o VEGF afeta a interação dos leucócitos com a parede do vaso (DETMAR *et al.*, 1998; TROMP *et al.*, 2000) e em modelos de inflamação crônica, o VEGF é abundante no tecido, indicando um papel pró-inflamatório para essa classe de proteína. Atua como uma citocina pró-inflamatória por aumentar permeabilidade de células endoteliais, induzir a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais. Dessa forma, o VEGF é um intermediário chave entre a inflamação imune mediada por células e a angiogênese associada a esse evento (REINDERS *et al.*, 2003).

Os envenenamentos ofídicos são caracterizados por diversos sinais clínicos com severidade dependendo das toxinas presentes nas diferentes peçonhas, da quantidade de peçonha no momento da ferida, e características fisiológicas do indivíduo afetado (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; WARRELL, 2010).

Peçonhas ofídicas das espécies da família Viperidae induzem danos teciduais no local da injeção da peçonha e também a outras partes do organismo (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017) e esses efeitos estão associados com eventos inflamatórios locais e sistêmicos que contribuem para as manifestações clínicas.

A inflamação de tecidos afetados pelas peçonhas de serpentes caracteriza-se pela síntese e secreção de uma ampla variedade de mediadores os quais induzem extravasamento de plasma, edema, dor e recrutamento de leucócitos, em adição à geração de uma reação aguda sendo que, esse evento ocorre simultaneamente ao aumento de leucócitos circulantes, principalmente neutrófilos. Estes, são células chave da resposta imune inata e são as primeiras células inflamatórias a atingir os tecidos afetados (LIEW; KUBES, 2019).

1.4. Fatores de crescimento endotelial vascular de serpentes – VEGF-F

As peçonhas de serpentes são ricas fontes de proteínas sendo que muitas delas ainda não foram isoladas e/ou estudadas, como é o caso dos VEGFs. Essas proteínas partilham de funções específicas dessa classe como a indução da migração e proliferação de células endoteliais e por conseguinte, têm a habilidade de ativar a angiogênese (WOOLARD *et al.*, 2009). Com isso, podem atuar no aumento da permeabilidade vascular que pode facilitar o acesso de outras proteínas e toxinas presentes na peçonha a seus alvos finais. Assim, essas proteínas podem ser úteis como ferramentas para o estudo da angiogênese e tratamento de doenças isquêmicas (YAMAZAKI *et al.*, 2003). Desde então, diversos VEGFs isolados e/ou identificados em peçonhas de serpentes de diferentes espécies por meio de técnicas distintas já foram descritos, e eles se encontram resumidos na tabela 3.

Tabela 3 - VEGFs isolados/identificados em peçonhas de serpentes.

VEGF	Espécie de serpente	Técnica	Referência
HF	<i>Vipera aspis aspis</i>	Isolado da peçonha	(KOMORI <i>et al.</i> , 1999)
VEGF	<i>Bothrops insularis</i>	Clonagem e expressão	(JUNQUEIRA DE AZEVEDO <i>et al.</i> , 2001)
ICPP	<i>Vipera lebetina</i>	Isolado da peçonha	(GASMI <i>et al.</i> , 2002)
Vammin	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	Isolado da peçonha	(YAMAZAKI <i>et al.</i> , 2003)
VR-1	<i>Daboia russelli russelli</i>	Isolado da peçonha	(YAMAZAKI <i>et al.</i> , 2003)
TfsvVEGF	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	Isolado da peçonha	(TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2004)
VEGF	<i>Bothrops erythromelas</i>	Clonagem e expressão	(JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO <i>et al.</i> , 2004)
Pm-VEGF	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	Isolado da peçonha/expresão heteróloga	(CHEN <i>et al.</i> , 2005)
IC 1 e 2	<i>Macrovipera lebetina</i>	Isolado da peçonha	(ALOUI <i>et al.</i> , 2009)
VEGF	<i>Crotalus atrox</i>	Transcriptoma	(CALVETE <i>et al.</i> , 2009)
VEGF	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	Transcriptoma/Proteoma	(BOLDRINI-FRANÇA <i>et al.</i> , 2009, 2010; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019)
VEGF	<i>Crotalus tigris</i>	Proteoma	(CALVETE <i>et al.</i> , 2012)
GtVF	<i>Gloydus tsushimaensis</i>	Isolado da peçonha	(NAKAMURA <i>et al.</i> , 2014)
VEGF	<i>Crotalus oreganus helleri</i>	Transcriptoma	(SUNAGAR <i>et al.</i> , 2014)
TjsvVEGF	<i>Protobothrops jerdonii</i>	Isolado da peçonha	(ZHONG <i>et al.</i> , 2015)
VEGF	<i>Crotalus horridus</i>	Transcriptoma	(ROKYTA; WRAY; MARGRES, 2013)
VEGF	<i>Porthidium lansbergii lansbergii</i>	Proteoma	(JIMÉNEZ-CHARRIS <i>et al.</i> , 2015)
VEGF	<i>Dispholidus typus</i>	Transcriptoma	(PLA <i>et al.</i> , 2017)
VEGF	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Transcriptoma/Proteoma	(MELANI <i>et al.</i> , 2015; WIEZEL <i>et al.</i> , 2018)
VEGF	<i>Daboia russelii</i>	Proteoma	(FAISAL <i>et al.</i> , 2018)
VEGF	<i>Boiga irregularis</i>	Transcriptoma	(PLA <i>et al.</i> , 2018)
VEGF	<i>Porthidium porrasi</i>	Proteoma	(MÉNDEZ <i>et al.</i> , 2019)
VEGF	<i>Vipera berus berus</i>	Proteoma	(AL-SHEKHADAT <i>et al.</i> , 2019)
VEGF	<i>Trimeresurus insularis</i>	Proteoma	(JONES <i>et al.</i> , 2019)
VEGF	<i>Daboia siamensis</i>	Proteoma	(LINGAM; TAN; TAN, 2020)
VEGF	<i>Echis ocellatus e Bitis arietans</i>	Proteoma	(DINGWOKE <i>et al.</i> , 2021)
CdeVEGF	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	Isolado da peçonha	(FERREIRA <i>et al.</i> , 2022)

Após a descoberta do primeiro VEGF de serpente isolado da peçonha de *Vipera aspis aspis*, um fator com alta atividade hipotensora, denominado de HF (*Hypotensive Factor*) (KOMORI *et al.*, 1999), os VEGF-Fs se tornaram proteínas de grande importância e alvos de estudos.

O termo SvVEGFs (*snake venom VEGFs*) foi primeiramente proposto em 2001 pelo grupo de Junqueira de Azevedo, o qual descreveu a primeira biblioteca de DNA complementar (cDNA) da glândula de peçonha da serpente *Bothrops insularis* no qual foi descrito o cDNA que codifica o VEGF (JUNQUEIRA DE AZEVEDO *et al.*, 2001). Desde então, têm sido crescente o interesse em identificar e/ou isolar esse composto nas peçonhas de serpentes.

Além desse estudo, mais recentemente, esse mesmo grupo de pesquisa descreveu o genoma da serpente *Bothrops jararaca* e verificaram que o gene do svVEGF se encontra em posição diferente do gene do VEGF-A, tendo como hipótese que o svVEGF surgiu como evolução para ser um componente especializado da peçonha (ALMEIDA *et al.*, 2021).

De maneira geral, os svVEGFs são proteínas homodiméricas com massa molecular entre 20 e 30 kDa em condições nativas e entre 13 e 16 kDa em condições reduzidas. Até o momento, são descritos svVEGFs que reconhecem seletivamente receptores para VEGFs dos tipos 1 e 2 (VEGFR-1 e 2) e o sítio rico em cisteína (*cysteine knot motif*) característico dessa família de proteínas é altamente conservado entre os SvVEGFs e sua estrutura primária possui cerca de 50% de homologia quando comparada com VEGF-A₁₆₅ de humanos (FERREIRA *et al.*, 2021).

Além dessas características, existem relatos que a região C-terminal de de um svVEGF, Vammin, isolado da peçonha de *Vipera ammodytes ammodytes*, funciona como um sítio de ligação à heparina e, especificamente, tem a capacidade de inibir a atividade biológica do VEGF-A₁₆₅ *in vitro* e *in vivo* (TOKUNAGA; YAMAZAKI; MORITA, 2005).

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

Esse evento do aumento da permeabilidade foi relatado por um grupo de pesquisadores em 2009 e puderam confirmar que o svVEGF Vammin foi capaz de induzir seletivamente rupturas do tipo fenestras no endotélio vascular e que o VEGF-A₁₆₅ potencializou a permeabilidade e extravasamento de líquidos (MATSUNAGA *et al.*, 2009).

Alguns SvVEGFs isolados das peçonhas tiveram sua atividade testada em relação à proliferação de células endoteliais. Em sua maioria, quando comparada ao VEGF-A₁₆₅ consegue ser mais potente (CHEN *et al.*, 2005; KOMORI *et al.*, 1999; YAMAZAKI *et al.*, 2003). Porém, existem casos em que o svVEGF, quando comparado ao VEGF-A₁₆₅, demonstrou ter uma atividade de proliferação muito menor, evidenciando ter outra função primordial no envenenamento, ao invés de atuar como um fator para a angiogênese e/ou aumento de permeabilidade vascular (TAKAHASHI *et al.*, 2004).

Além disso, para o svVEGF ICPP, foi relatado sua ação de proteção do miocárdio e prevenção de disfunção mitocondrial após isquemia cardíaca em camundongos, demonstrando o grande potencial dessa classe de proteínas para tratar isquemias (AVERIN; UTKIN, 2021; MESSADI *et al.*, 2014).

SvVEGFs também já foram produzidos por meio de clonagem e expressão heteróloga, como o VEGF da serpente *B. insularis*, *B. erythromelas* e o Pm-VEGF de *P. mucrosquamatus*. Estes VEGFs apresentaram atividades significantes, mais intensas quando comparadas com o VEGF-A₁₆₅, como aumento de permeabilidade vascular, proliferação de células endoteliais e neovascularização (CHEN *et al.*, 2005; JUNQUEIRA DE AZEVEDO *et al.*, 2001; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2004).

Embora os SvVEGFs estão presentes nas peçonhas em baixa abundância (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017), um recente estudo do proteoma de serpentes da Nigéria (*Bitis arietans* e *Echis ocellatus*) revelaram que essa classe de proteína corresponde a 8,14% e 2,67% da peçonha, respectivamente (DINGWOKE *et al.*, 2021). Com isso, deve se levar em conta a importância de estudar os VEGFs e elucidar seu papel e por conseguinte, contribuir para o entendimento de seu papel no envenenamento, sendo que relatos demonstram que os svVEGFs possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, o que pode facilitar o acesso de outras proteínas e toxinas presentes na peçonha aos seus alvos finais, sendo que essa permeabilidade pode estar associada com recrutamento de leucócitos e por conseguinte, reposta imune (ALLOUI *et al.*, 2009).

Apesar de diversos SvVEGFs terem sido identificados, isolados e funcionalmente caracterizados, este componente ainda não foi estudado na peçonha de *C.d.terrificus*, embora sua presença já tenha sido demonstrada em estudos de proteoma e transcriptoma (MELANI *et al.*, 2015; WIEZEL *et al.*, 2018).

1.5. Estratégia biotecnológica por meio de bioconjugação com polietilenoglicóis (PEGs)

Biofármacos representam uma das melhores conquistas da ciência moderna. Esses fármacos estão sendo cada vez mais introduzidos nas clínicas e têm se tornado um dos tratamentos clínicos mais efetivos para uma ampla gama de enfermidades que trazem risco à vida ou que são de grau crônico, como tumores, doenças mediadas pelo sistema imune, como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal e psoríase (KESIK-BRODACKA, 2018; WALSH, 2018).

Em 2021, 50 novos produtos para terapias foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration* – EUA) para uso humano, sendo que dentre estes, 14 são biofármacos (MULLARD, 2022). Entre os recentes aprovados, encontram-se dois em suas formas PEGuiladas: o Lonapegsomatropin (Skytrofa®), o hormônio de crescimento humano e o Ropeginterferon alfa-2b (Besremi®), o interferon α -2b (HUANG *et al.*, 2021, 2021).

Além dos biofármacos comercialmente disponíveis, muitos estão em períodos de testes clínicos ou pré-clínicos. No ano de 2015, cinco de 15 medicamentos mais vendidos mundialmente eram derivados de proteínas ou peptídeos correspondendo a cerca de 25% do total de vendas (AGYEI *et al.*, 2017), que demonstra o grande potencial de proteínas e peptídeos como futuros medicamentos.

O uso das proteínas e peptídeos na terapêutica vem expandindo devido à descoberta de novas biomoléculas, melhor entendimento de seus mecanismos de ação, principalmente *in vivo*, avanços na expressão heteróloga e/ou síntese de proteínas e peptídeos e, aperfeiçoamento nas formulações ou tecnologias de alterações moleculares com a capacidade de melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002).

Porém, grande parte das proteínas de uso terapêutico apresenta algum grau de resposta humoral, devido à uma imunogenicidade que essas moléculas exógenas podem ocasionar (GARCÊS; DEMENGEOT, 2018) e esta resposta pode levar à perda de eficácia terapêutica, neutralização ou ainda, a efeitos adversos, como complicações semelhantes às aquelas apresentadas pela doença do soro ou anafilaxia (WOLBINK; AARDEN; DIJKMANS, 2009). Com isso, um dos desafios da nova era de medicina, é desenvolver metodologias que reduzam imunogenicidade dos biofármacos para que sua eficácia terapêutica possa aumentar (LALOR *et al.*, 2019; VANDERLAAN *et al.*, 2020).

A bioconjugação têm tido grande evidência na indústria farmacêutica e na pesquisa, com destaque para as modificações de proteínas. Essas modificações ocorrem nas cadeias

laterais dos aminoácidos e são realizadas há mais de um século (KALIA; RAINES, 2010; STEPHANOPOULOS; FRANCIS, 2011), o que explica a grande evolução na área.

O processo de bioconjugação de proteínas/peptídeos depende de suas estruturas terciárias e das cadeias laterais de seus aminoácidos sendo que existem 9 aminoácidos que podem sofrer reações de derivatização em suas cadeias laterais, uma vez que apresentam grupos funcionais, são eles: ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, lisina, arginina, tirosina, cisteína, metionina, triptofano além das porções C-terminal e N-terminal dos aminoácidos (DE GRAAF *et al.*, 2009).

A bioconjugação utilizando a molécula de polietilenoglicol (PEG) descreve a modificação química por meio de conjugação covalente com o PEG, um polímero não tóxico e não imunogênico, usado como estratégia para diminuir as desvantagens associadas aos biofármacos (VERONESE; MERO, 2008). A ligação covalente de PEG às proteínas é uma tecnologia bem estabelecida e amplamente utilizada, cumprindo requisitos que visam a segurança e eficácia de medicamentos (FREITAS; ABRAHÃO-NETO, 2010; SHI *et al.*, 2022).

A PEGuilação pode modificar as propriedades físicas e químicas da biomolécula, como sua conformação, interações eletrostáticas e hidrofobicidade. Essas mudanças podem fazer com que a proteína PEGuilada apresente atividades biológicas mais reduzidas quando comparadas com a proteína em sua forma nativa e isso pode ser explicado pelo efeito estérico da superfície altamente hidrofílica das cadeias de PEGs em ligações a receptores ou interações proteína-proteína (LEE *et al.*, 2003). Por outro lado, essa modificação pode resultar na melhora do comportamento farmacocinético do medicamento, além de aumento de permeabilidade e retenção no local de ação, alta estabilidade *in vivo*, ligação aprimorada aos ligantes e redução de fagocitose por células mononucleares (MAIER; RUSCONI; LEVY, 2019).

Em sua forma mais comum, o PEG é uma cadeia linear ou ramificada, terminada com grupos hidroxílicos, apresentando a estrutura geral $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2002). A bioconjugação pode ocorrer em diferentes locais da proteína, dependendo do tipo de PEG utilizado e da aplicação desejada sendo que as mais comumente utilizadas são a conjugação na porção N-terminal e grupos ϵ -aminos de lisinas (PASUT; VERONESE, 2012; SANTOS *et al.*, 2018).

De maneira geral, a PEGuilação beneficia a solubilização destas moléculas, além de reduzir sua imunogenicidade, melhora na estabilidade da estrutura e redução do *clearance* total do fitofármaco, diminuindo assim, a frequência da administração do medicamento, uma

das limitações para a aplicação terapêutica de alguns fármacos (FEREBEE *et al.*, 2016; GEFEN *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2016).

Embora essa ferramenta de modificação química tenha sido muito utilizada para a produção de biofármacos (Tabela 4), seu uso na área da toxilogia permanece restrito. Até o momento, apenas duas toxinas foram modificadas por meio de conjugação com PEG, ambas são enzimas trombina símile (DA-SILVA-FREITAS; BOLDRINI-FRANÇA; ARANTES, 2015; PINHEIRO-JUNIOR *et al.*, 2021), que resultou em melhora significativa para as enzimas com o aumento de eficácia catalítica para o aumento do controle hemostático.

Tabela 4 – Medicamentos PEGuilados aprovados pelo FDA para uso em humanos, nos últimos 20 anos.

Nome comercial	Companhia farmacêutica	Sítio de PEGuilação	Tamanho do PEG (kDa)	Indicação terapêutica	Ano de aprovação
Neulasta	Amgen	N-terminal	20	Neutropenia	2002
Somavert	Pfizer	Lisinas, N-terminal	5	Acromegalia	2003
Macugen	Pfizer	Lisina	40	Degeneração macular á idade	2004
Mircera	Hoffman-La Roche	Lisina	30	Anemia associada à falência renal crônica	2007
Cimzia	UCB	C-terminal	40	Doença de Crohn	2008
Krystexxa	Savient	Lisina	10	Gota crônica	2010
Sylatron	Merck	Histidina, cisteína, lisina, serina, tirosina	12	Melanoma	2011
Omontys	Affymax/Takeda	Lisina	40	Anemia associada com doença renal crônica	2012
Plegridy	Biogen	N-terminal	20	Esclerose Múltipla	2014
Adynovate	Baxalta	Lisina	20	Hemofilia A	2015
Esperoct	Novo Nordisk	Glicosilação	40	Hemofilia A	2019
Skytrofa	Ascendis Pharma	Lisina	5	Deficiência do hormônio de crescimento	2021
Besremi	PharmaEssentia	Lisina	5	Câncer de sangue	2021

Deste modo, é notável o potencial desta técnica de modificação molecular, otimizando a aplicação terapêutica e biotecnológica de toxinas animais, pois com esta técnica consegue-se melhorar a segurança, eficácia, toxicidade, afinidade e seletividade por um ligante, além de aumentar a estabilidade contra degradação por proteases endógenas e, adicionalmente, diminuir a imunogenicidade da molécula. Ademais, com o isolamento, purificação, caracterização estrutural e principalmente, funcional, do fator de crescimento endotelial vascular da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (*CdtVEGF*), o presente trabalho também pode contribuir para a perspectiva de possíveis estudos relacionando inibidores desta molécula, que poderiam ser usados para o controle de uma patogênese, como por exemplo, os tumores.

Desta forma, nesta tese é descrita a avaliação bioquímica e funcional do *CdtVEGF* da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, bem como sua modificação química por PEGuilação, com a comparação funcional das moléculas em suas formas nativas e PEGuiladas.

5. CONCLUSÕES

A partir do estudo proposto e os resultados obtidos foi possível determinar uma nova metodologia para a purificação de um novo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) da peçonha *C. d. terrificus*, isto é, *Cdt*VEGF, mostrando que as estratégias cromatográficas foram eficazes, garantindo um bom rendimento da amostra. Além disso, foi realizada sua caracterização estrutural, bioquímica e funcional, com ensaios inovadores para svVEGFs.

Apesar de muitos SvVEGFs terem sido identificados nas peçonhas ofídicas, ainda são poucos estudos que abordam o isolamento destes a partir das peçonhas ofídicas. Desta forma, o presente estudo contribui relevantemente para o conhecimento desta classe de proteína, sendo fonte de dados sobre sua estrutura proteica.

Este estudo foi pioneiro em relatar com efetividade a modificação química de um svVEGF por PEGuilação e, ainda demonstrou que o *Cdt*VEGF permaneceu ativo mesmo após a bioconjugação, como evidenciado pelos ensaios funcionais de atividade metabólica e migração celular.

Além disso, até o momento para SvVEGFs, não foi demonstrado a indução da migração celular de células endoteliais vasculares, por meio do ensaio de *wound healing* e no recrutamento dos leucócitos, evidenciando a resposta inflamatória que esta proteína induz. Enquanto que, a molécula PEGuilada não demonstrou recrutamento de leucócitos e nem permeabilidade vascular, evidenciando a efetividade da PEGuilação em mascarar a molécula reduzindo seu reconhecimento pelo sistema imune. Além disso, a capacidade do *Cdt*VEGF em induzir permeabilidade vascular, corrobora para o entendimento de sua possível função no envenenamento, facilitando o influxo das toxinas e outras enzimas/proteínas presentes na peçonha ofídica.

Por fim, este estudo destaca a importância da classe de proteínas dos SvVEGFs como importantes ferramentas moleculares para a pesquisa, bem como, para a terapêutica, visto que apresentam funções biológicas capazes de interferir com processos fisiológicos e patológicos, como o processo de migração celular em ferimentos. Adicionalmente demonstrou-se a efetividade da bioconjugação com a molécula de polietilenoglicol, que foi capaz de blindar a molécula, diminuindo sua apresentação ao sistema imune, como evidenciado pelo ensaio de ELISA com anticorpo anti-VEGF-F e pelo ensaio em camundongos.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, D. H.; SHAW, S. Leucocyte-Endothelial Interactions and Regulation of Leucocyte Migration. **Lancet (London, England)**, v. 343, n. 8901, p. 831–836, 2 abr. 1994.

AGYEI, D.; AHMED, I.; AKRAM, Z.; IQBAL, H. M. N.; DANQUAH, M. K. Protein and Peptide Biopharmaceuticals: An Overview. **Protein and Peptide Letters**, v. 24, n. 2, p. 94–101, 2017.

ALMEIDA, D. D.; VIALA, V. L.; NACHTIGALL, P. G.; BROE, M.; GIBBS, H. L.; SERRANO, S. M. de T.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; HO, P. L.; NISHIYAMA-JR, M. Y.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Tracking the Recruitment and Evolution of Snake Toxins Using the Evolutionary Context Provided by the *Bothrops Jararaca* Genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 20, p. e2015159118, 18 maio 2021.

ALMEIDA, V. M.; BEZERRA, M. A.; NASCIMENTO, J. C.; AMORIM, L. M. F. Anticancer Drug Screening: Standardization of *in Vitro* Wound Healing Assay. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, p. 606–619, 2 mar. 2020.

ALMQUIST, J.; RIKARD, S. M.; WÅGBERG, M.; BRUCE, A. C.; GENNEMARK, P.; FRITSCHÉ-DANIELSON, R.; CHIEN, K. R.; PEIRCE, S. M.; HANSSON, K.; LUNDAHL, A. Model-Based Analysis Reveals a Sustained and Dose-Dependent Acceleration of Wound Healing by VEGF-A MRNA (AZD8601). **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, v. 9, n. 7, p. 384–394, jul. 2020.

ALOUI, Z.; HOOS, S.; GERETTI, E.; KHARMACHI, H.; HAUMONT, P. Y.; MEJDOUB, H.; KLAGSBRUN, M.; ENGLAND, P.; GASMI, A. Novel SvVEGF Isoforms from Macrovipera Lebetina Venom Interact with Neuropilins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 389, n. 1, p. 10–15, 6 nov. 2009.

AL-SHEKHADAT, R. I.; LOPUSHANSKAYA, K. S.; SEGURA, Á.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Vipera Berus Berus Venom from Russia: Venomics, Bioactivities and Preclinical Assessment of Microgen Antivenom. **Toxins**, v. 11, n. 2, p. 90, fev. 2019.

ANCELIN, M.; CHOLLET-MARTIN, S.; HERVÉ, M. A.; LEGRAND, C.; EL BENNA, J.; PERROT-APPLANAT, M. Vascular Endothelial Growth Factor VEGF189 Induces Human Neutrophil Chemotaxis in Extravascular Tissue via an Autocrine Amplification Mechanism. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 84, n. 4, p. 502–512, abr. 2004.

ARAÚJO, L. da S.; CONCEIÇÃO, A. S. M. M.; CUNHA, D. M. de S.; MORAIS, G. B. de; SILVEIRA, J. A. de M.; XAVIER JÚNIOR, F. A. F.; MACAMBIRA, K. D. da S.; ARAÚJO, S. L.; PESSOA, N. O.; EVANGELISTA, J. S. A. M. *Crotalus Durissus* Venom: Biological Effects and Relevant Applications. A Review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1981-2965.20160002>>. Acesso em: 17 out. 2022.

AUERBACH, R.; SIDKY, Y. A. Nature of the Stimulus Leading to Lymphocyte-Induced Angiogenesis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 123, n. 2, p. 751–754, ago. 1979.

AVERIN, A. S.; UTKIN, Y. N. Cardiovascular Effects of Snake Toxins: Cardiotoxicity and Cardioprotection. **Acta Naturae**, v. 13, n. 3, p. 4–14, set. 2021.

BARRIENTOS, S.; BREM, H.; STOJADINOVIC, O.; TOMIC-CANIC, M. Clinical Application of Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. **Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 22, n. 5, p. 569–578, out. 2014.

BATES, D. O. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 2, p. 262–271, 15 jul. 2010.

BERNARDES, P. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. [s.l.] Anolis Books, 2014.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127–152, 2005.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; COLOGNA, C. T.; PUCCA, M. B.; BORDON, K. de C. F.; AMORIM, F. G.; ANJOLETTE, F. A. P.; CORDEIRO, F. A.; WIEZEL, G. A.; CERNI, F. A.; PINHEIRO-JUNIOR, E. L.; SHIBAO, P. Y. T.; FERREIRA, I. G.; DE OLIVEIRA, I. S.; CARDOSO, I. A.; ARANTES, E. C. Minor Snake Venom Proteins: Structure, Function and Potential Applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1861, n. 4, p. 824–838, abr. 2017.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M. M. S.; RODRIGUES, R. S.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake Venomics and Antivenomics of *Crotalus durissus* Subspecies from Brazil: Assessment of Geographic Variation and Its Implication on Snakebite Management. **JOURNAL OF PROTEOMICS**, p. 19, 2010.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V. M.; OTAVIANO, A. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *Crotalus durissus collilineatus* Venom Gland Transcriptome: Analysis of Gene Expression Profile. **Biochimie**, v. 91, n. 5, p. 586–595, maio 2009.

BORDON, K. C. F.; PERINO, M. G.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Isolation, Enzymatic Characterization and Antiedematogenic Activity of the First Reported Rattlesnake Hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* Venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2740–2748, dez. 2012.

BREMEL, R. D.; HOMAN, E. J. An Integrated Approach to Epitope Analysis II: A System for Proteomic-Scale Prediction of Immunological Characteristics. **Immunome Research**, v. 6, p. 8, 2 nov. 2010.

CALDWELL, M. W.; NYDAM, R. L.; PALCI, A.; APESTEGUÍA, S. The Oldest Known Snakes from the Middle Jurassic-Lower Cretaceous Provide Insights on Snake Evolution. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 5996, maio 2015.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake Venomics. Strategy and Applications. **Journal of mass spectrometry: JMS**, v. 42, n. 11, p. 1405–1414, nov. 2007.

- CALVETE, J. J.; PÉREZ, A.; LOMONTE, B.; SÁNCHEZ, E. E.; SANZ, L. Snake Venomics of *Crotalus tigris*: The Minimalist Toxin Arsenal of the Deadliest Nearctic Rattlesnake Venom. Evolutionary Clues for Generating a Pan-Specific Antivenom against Crotalid Type II Venoms [Corrected]. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 2, p. 1382–1390, 3 fev. 2012.
- CAPP, C.; MAIA, A. L.; ALEGRE, P. Expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e de seus Receptores (VEGFR 1 e 2) em Amostras de Tecido Tireoidiano de Pacientes com Carcinoma Medular de Tireóide. p. 68, 2009.
- CHAPMAN, A. P. PEGylated Antibodies and Antibody Fragments for Improved Therapy: A Review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 4, p. 531–545, jun. 2002.
- CHEN, Y.-L.; TSAI, I.-H.; HONG, T.-M.; TSAI, S.-H. Crotalid Venom Vascular Endothelial Growth Factors Has Preferential Affinity for VEGFR-1. Characterization of *Protobothrops mucrosquamatus* venom VEGF. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 93, n. 2, p. 331–338, fev. 2005.
- COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. v. 7, p. 47, 2018.
- CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; VALÉRIO, D. A.; GUERRERO, A. T.; NOGUEIRA, L. G.; VIEIRA, S. M.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of Cytokines in Mediating Mechanical Hypernociception in a Model of Delayed-Type Hypersensitivity in Mice. **European Journal of Pain**, v. 12, n. 8, p. 1059–1068, nov. 2008.
- CUPO, P. Bites and Stings from Venomous Animals: A Neglected Brazilian Tropical Disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 639–641, dez. 2015.
- DA SILVA FREITAS, D.; MERO, A.; PASUT, G. Chemical and Enzymatic Site Specific PEGylation of HGH. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 456–463, 20 mar. 2013.
- DA-SILVA-FREITAS, D.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; ARANTES, E. C. PEGylation: A Successful Approach to Improve the Biopharmaceutical Potential of Snake Venom Thrombin-like Serine Protease. **Protein and Peptide Letters**, v. 22, n. 12, p. 1133–1139, 2015.
- DE GRAAF, A. J.; KOOLJMAN, M.; HENNINK, W. E.; MASTROBATTISTA, E. Nonnatural Amino Acids for Site-Specific Protein Conjugation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 1281–1295, jul. 2009.
- DE OLIVEIRA, I. S.; PUCCA, M. B.; WIEZEL, G. A.; CARDOSO, I. A. Unraveling the Structure and Function of CdcPDE: A Novel Phosphodiesterase from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 13, 2021.
- DETMAR, M.; BROWN, L. F.; SCHÖN, M. P.; ELICKER, B. M.; VELASCO, P.; RICHARD, L.; FUKUMURA, D.; MONSKY, W.; CLAFFEY, K. P.; JAIN, R. K. Increased Microvascular Density and Enhanced Leukocyte Rolling and Adhesion in the Skin of VEGF Transgenic Mice. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 1, p. 1–6, jul. 1998.
- DINGWOKE, E. J.; ADAMUDE, F. A.; MOHAMED, G.; KLEIN, A.; SALIHU, A.; ABUBAKAR, M. S.; SALLAU, A. B. Venom proteomic analysis of medically important

Nigerian viper *Echis ocellatus* and *Bitis arietans* snake species. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 28, p. 101164, 2 nov. 2021.

DIRKX, A. E. M.; OUDE EGBRINK, M. G. A.; KUIJPERS, M. J. E.; VAN DER NIET, S. T.; HEIJNEN, V. V. T.; BOUMA-TER STEEGE, J. C. A.; WAGSTAFF, J.; GRIFFIOEN, A. W. Tumor Angiogenesis Modulates Leukocyte-Vessel Wall Interactions *in vivo* by Reducing Endothelial Adhesion Molecule Expression. **Cancer Research**, v. 63, n. 9, p. 2322–2329, 1 maio 2003.

DVORAK, H. F. Angiogenesis: Update 2005. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, v. 3, n. 8, p. 1835–1842, ago. 2005.

EDMAN, P.; BEGG, G. A Protein Sequenator. **European Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 80–91, mar. 1967.

ELIASON, J. F. Pegylated Cytokines: Potential Application in Immunotherapy of Cancer. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy**, v. 15, n. 11, p. 705–711, 2001.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514–525, mar. 2007.

FANG, X.; WANG, X.; LI, G.; ZENG, J.; LI, J.; LIU, J. SS-MPEG Chemical Modification of Recombinant Phospholipase C for Enhanced Thermal Stability and Catalytic Efficiency. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 1032–1039, maio 2018.

FAURE, G.; GUILLAUME, J. L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B.; BON, C. Multiplicity of Acidic Subunit Isoforms of Crotoxin, the Phospholipase A2 Neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* Venom, Results from Posttranslational Modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074–8083, 13 ago. 1991.

FEREBEE, R.; HAKEM, I. F.; KOCH, A.; CHEN, M.; WU, Y.; LOH, D.; WILSON, D. C.; POOLE, J. L.; WALKER, J. P.; FYTAS, G.; BOCKSTALLER, M. R. Light Scattering Analysis of Mono- and Multi-PEGylated Bovine Serum Albumin in Solution: Role of Composition on Structure and Interactions. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 120, n. 20, p. 4591–4599, 26 maio 2016.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581–611, ago. 2004.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4–25, 1 fev. 1997.

FERREIRA, I. G.; PUCCA, M. B.; CARDOSO, I. A.; DE CASTRO FIGUEIREDO BORDON, K.; WIEZEL, G. A.; AMORIM, F. G.; RODRIGUES, R. S.; DE MELO RODRIGUES, V.; LUCIA DE CAMPOS BRITES, V.; ROSA, J. C.; LOPES, D. S.; ARANTES, E. C. Insights into Structure and Function of *Cdc*VEGFs, the Vascular Endothelial Growth Factor from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom. **Biochimie**, 22 maio 2022.

FERREIRA, I. G.; PUCCA, M. B.; OLIVEIRA, I. S. de; CERNI, F. A.; JACOB, B. de C. da S.; ARANTES, E. C. Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (SvVEGFs):

Unravelling Their Molecular Structure, Functions, and Research Potential. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 28 maio 2021.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10931–10934, 5 jun. 1992.

FREITAS, D. da S.; ABRAHÃO-NETO, J. Biochemical and Biophysical Characterization of Lysozyme Modified by PEGylation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1–2, p. 111–117, 15 jun. 2010.

FRONZA, M.; HEINZMANN, B.; HAMBURGER, M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Determination of the Wound Healing Effect of Calendula Extracts Using the Scratch Assay with 3T3 Fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 463–467, 10 dez. 2009.

FRY, B. G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S. F. R.; VIDAL, N.; POELMANN, R. E.; NORMAN, J. A. Evolution of an Arsenal: Structural and Functional Diversification of the Venom System in the Advanced Snakes (*Caenophidia*). **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 7, n. 2, p. 215–246, fev. 2008.

FURIE, M. B.; RANDOLPH, G. J. Chemokines and Tissue Injury. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 6, p. 1287–1301, jun. 1995.

GALIANO, R. D.; TEPPER, O. M.; PELO, C. R.; BHATT, K. A.; CALLAGHAN, M.; BASTIDAS, N.; BUNTING, S.; STEINMETZ, H. G.; GURTNER, G. C. Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 6, p. 1935–1947, jun. 2004.

GARCÊS, S.; DEMENGEOT, J. The Immunogenicity of Biologic Therapies. **Current Problems in Dermatology**, v. 53, p. 37–48, 2018.

GASMI, A.; BOURCIER, C.; ALOUI, Z.; SRAIRI, N.; MARCHETTI, S.; GIMOND, C.; WEDGE, S. R.; HENNEQUIN, L.; POUYSSÉGUR, J. Complete Structure of an Increasing Capillary Permeability Protein (ICPP) Purified from *Vipera lebetina* Venom. ICPP Is Angiogenic via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Signalling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29992–29998, 16 ago. 2002.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. **The Proteomics Protocols Handbook**. Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GEFEN, T.; VAYA, J.; KHATIB, S.; HARKEVICH, N.; ARTOUL, F.; HELLER, E. D.; PITCOVSKI, J.; AIZENSHTAIN, E. The Impact of PEGylation on Protein Immunogenicity. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 254–259, fev. 2013.

GRANT, D. S.; TASHIRO, K.-I.; SEGUI-REAL, B.; YAMADA, Y.; MARTIN, G. R.; KLEINMAN, H. K. Two Different Laminin Domains Mediate the Differentiation of Human Endothelial Cells into Capillary-like Structures in Vitro. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 933–943, 8 set. 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite Envenoming. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 3, p. 17063, 14 set. 2017.

HELDIN, C. H. Structural and Functional Studies on Platelet-Derived Growth Factor. **The EMBO journal**, v. 11, n. 12, p. 4251–4259, dez. 1992.

HORINOUCI, C. D. S.; OOSTENDORP, C.; SCHADE, D.; VAN KUPPEVELT, T. H.; DAAMEN, W. F. Growth Factor Mimetics for Skin Regeneration: In Vitro Profiling of Primary Human Fibroblasts and Keratinocytes. **Archiv Der Pharmazie**, v. 354, n. 8, p. e2100082, ago. 2021.

HU, J.; DUPPATLA, V.; HARTH, S.; SCHMITZ, W.; SEBALD, W. Site-Specific PEGylation of Bone Morphogenetic Protein-2 Cysteine Analogues. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 1762–1772, 20 out. 2010.

HUANG, C.-E.; WU, Y.-Y.; HSU, C.-C.; CHEN, Y.-J.; TSOU, H.-Y.; LI, C.-P.; LAI, Y.-H.; LU, C.-H.; CHEN, P.-T.; CHEN, C.-C. Real-World Experience with Ropeginterferon-Alpha 2b (Besremi) in Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi**, v. 120, n. 2, p. 863–873, fev. 2021.

JIMÉNEZ-CHARRIS, E.; MONTEALEGRE-SANCHEZ, L.; SOLANO-REDONDO, L.; MORA-OBANDO, D.; CAMACHO, E.; CASTRO-HERRERA, F.; FIERRO-PÉREZ, L.; LOMONTE, B. Proteomic and Functional Analyses of the Venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's Hognose Viper) from the Atlantic Department of Colombia. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 287–299, 30 jan. 2015.

JONSSON, K. B.; FROST, A.; LARSSON, R.; LJUNGHALL, S.; LJUNGGREN, O. A New Fluorometric Assay for Determination of Osteoblastic Proliferation: Effects of Glucocorticoids and Insulin-like Growth Factor-I. **Calcified Tissue International**, v. 60, n. 1, p. 30–36, jan. 1997.

JUN, D.; MUSILOVÁ, L.; LINK, M.; LOIODICE, M.; NACHON, F.; ROCHU, D.; RENAULT, F.; MASSON, P. Preparation and Characterization of Methoxy Polyethylene Glycol-Conjugated Phosphotriesterase as a Potential Catalytic Bioscavenger against Organophosphate Poisoning. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 380–383, set. 2010.

JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L.; FARSKY, S. H.; OLIVEIRA, M. L.; HO, P. L. Molecular Cloning and Expression of a Functional Snake Venom Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* Pit Viper. A New Member of the VEGF Family of Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39836–39842, 26 out. 2001.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. de L. M.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; HO, P. L. Identification and Cloning of Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor (SvVEGF) from *Bothrops erythromelas* Pitviper. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 5, p. 571–575, out. 2004.

KALIA, J.; RAINES, R. T. Advances in Bioconjugation. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 138–147, jan. 2010.

- KANAZAWA, S.; TSUNODA, T.; ONUMA, E.; MAJIMA, T.; KAGIYAMA, M.; KIKUCHI, K. VEGF, Basic-FGF, and TGF-Beta in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: A Novel Mechanism of Chronic Intestinal Inflammation. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 822–828, mar. 2001.
- KAVEH-BAGHBADERANI, Y.; BLANK-SHIM, S. A.; KOCH, T.; BERENSMEIER, S. Selective Release of Overexpressed Recombinant Proteins from *E. coli* Cells Facilitates One-Step Chromatographic Purification of Peptide-Tagged Green Fluorescent Protein Variants. **Protein Expression and Purification**, v. 152, p. 155–160, dez. 2018.
- KESIK-BRODACKA, M. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 306–322, 2018.
- KIKUCHI, K.; HOASHI, T.; KANAZAWA, S.; TAMAKI, K. Angiogenic Cytokines in Serum and Cutaneous Lesions of Patients with Polyarteritis Nodosa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. 57–61, jul. 2005.
- KINSTLER, O. B.; BREMS, D. N.; LAUREN, S. L.; PAIGE, A. G.; HAMBURGER, J. B.; TREUHEIT, M. J. Characterization and Stability of N-Terminally PEGylated RhG-CSF. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 7, p. 996–1002, jul. 1996.
- KOH, G. Y.; KIM, I.; KWAK, H. J.; YUN, M.-J.; LEEM, J. C. Biomedical Significance of Endothelial Cell Specific Growth Factor, Angiopoietin. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 34, n. 1, p. 1–11, 31 mar. 2002.
- KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; MASUDA, K.; SUGIHARA, H. Vascular Endothelial Growth Factor VEGF-like Heparin-Binding Protein from the Venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic Viper). **Biochemistry**, v. 38, n. 36, p. 11796–11803, 7 set. 1999.
- KONNO, K.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V. O.; CAMARGO, A. C. M.; CURY, Y. Crotalphine, a Novel Potent Analgesic Peptide from the Venom of the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1293–1304, ago. 2008.
- KOOIJMANS, S. A. A.; FLIERVOET, L. A. L.; VAN DER MEEL, R.; FENS, M. H. A. M.; HEIJNEN, H. F. G.; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M. P.; VADER, P.; SCHIFFELERS, R. M. PEGylated and Targeted Extracellular Vesicles Display Enhanced Cell Specificity and Circulation Time. **Journal of Controlled Release**, v. 224, p. 77–85, fev. 2016.
- KURFÜRST, M. M. Detection and Molecular Weight Determination of Polyethylene Glycol-Modified Hirudin by Staining after Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 200, n. 2, p. 244–248, 1 fev. 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
- LALOR, F.; FITZPATRICK, J.; SAGE, C.; BYRNE, E. Sustainability in the Biopharmaceutical Industry: Seeking a Holistic Perspective. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 698–707, out. 2019.
- LARSON, E. M.; DOUGHMAN, D. J.; GREGERSON, D. S.; OBRITSCH, W. F. A New, Simple, Nonradioactive, Nontoxic in Vitro Assay to Monitor Corneal Endothelial Cell

Viability. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 10, p. 1929–1933, set. 1997.

LAUSTSEN, A. H.; KARATT-VELLATT, A.; MASTERS, E. W.; ARIAS, A. S.; PUS, U.; KNUDSEN, C.; OSCOZ, S.; SLAVNY, P.; GRIFFITHS, D. T.; LUTHER, A. M.; LEAH, R. A.; LINDHOLM, M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MCCAFFERTY, J. In Vivo Neutralization of Dendrotoxin-Mediated Neurotoxicity of Black Mamba Venom by Oligoclonal Human IgG Antibodies. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3928, 2 out. 2018.

LEE, H.; JANG, I. H.; RYU, S. H.; PARK, T. G. N-Terminal Site-Specific Mono-PEGylation of Epidermal Growth Factor. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 5, p. 818–825, maio 2003.

LEE, T.-H.; AVRAHAM, H.; LEE, S.-H.; AVRAHAM, S. Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Neutrophil Transendothelial Migration via Up-Regulation of Interleukin-8 in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 10445–10451, 22 mar. 2002.

LEUNG, D.; CACHIANES, G.; KUANG, W.; GOEDDEL, D.; FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306–1309, 8 dez. 1989.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIEW, P. X.; KUBES, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1223–1248, 1 abr. 2019.

LINGAM, T. M. C.; TAN, K. Y.; TAN, C. H. Proteomics and Antivenom Immunoprofiling of Russell's Viper (*Daboia siamensis*) Venoms from Thailand and Indonesia. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, p. e20190048, 2020.

MAIER, K. E.; RUSCONI, C. P.; LEVY, M. To PEGylate or Not To PEGylate Therapeutics? **Cell Chemical Biology**, v. 26, n. 5, p. 615–616, 16 maio 2019.

MANABE, N.; ODA, H.; NAKAMURA, K.; KUGA, Y.; UCHIDA, S.; KAWAGUCHI, H. Involvement of Fibroblast Growth Factor-2 in Joint Destruction of Rheumatoid Arthritis Patients. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 38, n. 8, p. 714–720, ago. 1999.

MATSUNAGA, Y.; YAMAZAKI, Y.; SUZUKI, H.; MORITA, T. VEGF-A and VEGF-F Evoke Distinct Changes in Vascular Ultrastructure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, n. 4, p. 872–875, 20 fev. 2009.

MEJÍA-MANZANO, L. A.; LIENQUEO, M. E.; ESCALANTE-VÁZQUEZ, E. J.; RITO-PALOMARES, M.; ASENJO, J. A. Optimized Purification of Mono-PEGylated Lysozyme by Heparin Affinity Chromatography Using Response Surface Methodology: Optimized Heparin Chromatography of Lysozyme PEGylation Reaction. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 10, p. 2554–2562, out. 2017.

MEJÍA-MANZANO, L. A.; VÁZQUEZ-VILLEGAS, P.; GONZÁLEZ-VALDEZ, J. Perspectives, Tendencies, and Guidelines in Affinity-Based Strategies for the Recovery and

- Purification of PEGylated Proteins. **Advances in Polymer Technology**, v. 2020, p. 1–12, 25 jan. 2020.
- MELANI, R.; GABRIEL, D.; CARVALHO, P.; GOTO-SILVA, L.; NOGUEIRA, F.; JUNQUEIRA, M.; DOMONT, G. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venom of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **EuPA Open Proteomics**, v. 583, 6 jun. 2015.
- MELGAREJO, A.R, C., J. Serpentes peçonhentas do Brasil. *In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. [s.l: s.n.]p. 33–61.
- MELINCOVICI, C. S.; BOȘCA, A. B.; ȘUȘMAN, S.; MĂRGINEAN, M.; MIHU, C.; ISTRATE, M.; MOLDOVAN, I. M.; ROMAN, A. L.; MIHU, C. M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Key Factor in Normal and Pathological Angiogenesis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie**, v. 59, n. 2, p. 455–467, 2018.
- MÉNDEZ, R.; BONILLA, F.; SASA, M.; DWYER, Q.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B. Proteomic Profiling, Functional Characterization, and Immunoneutralization of the Venom of *Porthidium porrasii*, a Pitviper Endemic to Costa Rica. **Acta Tropica**, v. 193, p. 113–123, 1 maio 2019.
- MESSADI, E.; ALOUI, Z.; BELAIDI, E.; VINCENT, M.-P.; COUTURE-LEPETIT, E.; WAECKEL, L.; DECORPS, J.; BOUBY, N.; GASMI, A.; KAROUI, H.; OVIZE, M.; ALHENC-GELAS, F.; RICHER, C. Cardioprotective Effect of VEGF and Venom VEGF-like Protein in Acute Myocardial Ischemia in Mice: Effect on Mitochondrial Function. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 274–281, mar. 2014.
- MOOSMANN, A.; BLATH, J.; LINDNER, R.; MÜLLER, E.; BÖTTINGER, H. Aldehyde PEGylation Kinetics: A Standard Protein versus a Pharmaceutically Relevant Single Chain Variable Fragment. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1545–1558, 17 ago. 2011.
- MORTAZ, E.; ALIPOOR, S. D.; ADCOCK, I. M.; MUMBY, S.; KOENDERMAN, L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2171, 2018.
- MULLARD, A. 2021 FDA Approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 2, p. 83–88, 4 jan. 2022.
- NAJMAN, L.; SESHADRI, R. Rattlesnake Envenomation. **Compendium (Yardley, PA)**, v. 29, n. 3, p. 166–176; quiz 176–177, mar. 2007.
- NAKAMURA, H.; MURAKAMI, T.; IMAMURA, T.; TORIBA, M.; CHIJIWA, T.; OHNO, M.; ODA-UEDA, N. Discovery of a Novel Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) with No Affinity to Heparin in *Gloydius tsushimaensis* venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 86, p. 107–115, ago. 2014.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, set. 2000.

- OHM, J. E.; GABRILOVICH, D. I.; SEMPOWSKI, G. D.; KISSELEVA, E.; PARMAN, K. S.; NADAF, S.; CARBONE, D. P. VEGF Inhibits T-Cell Development and May Contribute to Tumor-Induced Immune Suppression. **Blood**, v. 101, n. 12, p. 4878–4886, 15 jun. 2003.
- OLIVEIRA, I. S. de; CARDOSO, I. A.; BORDON, K. de C. F.; CARONE, S. E. I.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; PUCCA, M. B.; ZOCCAL, K. F.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V.; ROSA, J. C.; ARANTES, E. C. Global Proteomic and Functional Analysis of *Crotalus durissus collilineatus* Individual Venom Variation and Its Impact on Envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 191, p. 153–165, 16 jan. 2019.
- PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A New Fluorometric Assay for Cytotoxicity Measurements In-Vitro. **International Journal of Oncology**, v. 3, n. 3, p. 473–476, set. 1993.
- PANDYA, A.; BERNEBURG, M.; ORTONNE, J.-P.; PICARDO, M. Guidelines for Clinical Trials in Melasma. Pigmentation Disorders Academy. **The British Journal of Dermatology**, v. 156 Suppl 1, p. 21–28, dez. 2006.
- PAPPIN, D. J.; HOJRUP, P.; BLEASBY, A. J. Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting. **Current biology: CB**, v. 3, n. 6, p. 327–332, 1 jun. 1993.
- PASUT, G.; VERONESE, F. M. State of the Art in PEGylation: The Great Versatility Achieved after Forty Years of Research. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 161, n. 2, p. 461–472, 20 jul. 2012.
- PATEL, V.; KONG, E. L.; HAMILTON, R. J. Rattle Snake Toxicity. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- PEHRSSON, S.; HÖLTTÄ, M.; LINHARDT, G.; DANIELSON, R. F.; CARLSSON, L. Rapid Production of Human VEGF-A following Intradermal Injection of Modified VEGF-A mRNA Demonstrated by Cutaneous Microdialysis in the Rabbit and Pig In Vivo. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 3915851, 15 jan. 2019.
- PINHEIRO-JUNIOR, E. L.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; TAKEDA, A. A. S.; COSTA, T. R.; PEIGNEUR, S.; CARDOSO, I. A.; OLIVEIRA, I. S. de; SAMPAIO, S. V.; DE MATTOS FONTES, M. R.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Towards Toxin PEGylation: The Example of rCollinein-1, a Snake Venom Thrombin-like Enzyme, as a PEGylated Biopharmaceutical Prototype. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 564–573, 7 set. 2021.
- PLA, D.; PETRAS, D.; SAVIOLA, A. J.; MODAHL, C. M.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; JUÁREZ, E.; FRIETZE, S.; DORRESTEIN, P. C.; MACKESSY, S. P.; CALVETE, J. J. Transcriptomics-Guided Bottom-up and Top-down Venomics of Neonate and Adult Specimens of the Arboreal Rear-Fanged Brown Treesnake, *Boiga irregularis*, from Guam. **Journal of Proteomics**, v. 174, p. 71–84, 1 mar. 2018.
- PRÄBST, K.; ENGELHARDT, H.; RINGGELER, S.; HÜBNER, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *In: GILBERT, D. F.; FRIEDRICH, O. Cell Viability Assays: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2017. p. 1–17.

- QUINTON, L.; LE CAËR, J.-P.; VINH, J.; GILLES, N.; CHAMOT-ROOKE, J. Fourier Transform Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Toxin Analysis. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, n. 6, p. 715–726, maio 2006.
- REINDERS, M. E. J.; SHO, M.; IZAWA, A.; WANG, P.; MUKHOPADHYAY, D.; KOSS, K. E.; GEEHAN, C. S.; LUSTER, A. D.; SAYEGH, M. H.; BRISCOE, D. M. Proinflammatory Functions of Vascular Endothelial Growth Factor in Alloimmunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 11, p. 1655–1665, dez. 2003.
- RISS, T. L.; MORAVEC, R. A. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 2, n. 1, p. 51–62, fev. 2004.
- ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W320–W324, 1 jul. 2014.
- ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for Peptide and Protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 4, p. 459–476, 17 jun. 2002.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. AlgPred: Prediction of Allergenic Proteins and Mapping of IgE Epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server issue, p. W202-209, 1 jul. 2006.
- SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: Novel Activities for a Classic Beta-Neurotoxin. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 6, p. 1045–1060, 1 jun. 2010.
- SANTOS, E. W.; OLIVEIRA, D. C. de; HASTREITER, A.; SILVA, G. B. da; BELTRAN, J. S. de O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A. R.; NEVES, S. M. P.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Hematological and Biochemical Reference Values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c Mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 138–145, 17 jun. 2016.
- SANTOS, J. H. P. M.; TORRES-OBREQUE, K. M.; MENEGUETTI, G. P.; AMARO, B. P.; RANGEL-YAGUI, C. O. Protein PEGylation for the Design of Biobetters: From Reaction to Purification Processes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, 8 nov. 2018.
- SCOPES, R. K. Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 Nm. **Analytical Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 277–282, maio 1974.
- SEDLÁŘ, A.; TRÁVNÍČKOVÁ, M.; MATĚJKA, R.; PRAŽÁK, Š.; MÉSZÁROS, Z.; BOJAROVÁ, P.; BAČÁKOVÁ, L.; KŘEN, V.; SLÁMOVÁ, K. Growth Factors VEGF-A165 and FGF-2 as Multifunctional Biomolecules Governing Cell Adhesion and Proliferation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1843, jan. 2021.
- SELVANAYAGAM, Z. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Tests for Detection of Snake Venoms, Toxins and Venom Antibodies: Review on Recent Trends (1987-1997). **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 4, p. 565–586, abr. 1999.
- SHI, D.; BEASOCK, D.; FESSLER, A.; SZEBENI, J.; LJUBIMOVA, J. Y.; AFONIN, K. A.; DOBROVOLSKAIA, M. A. To PEGylate or Not to PEGylate: Immunological Properties of

Nanomedicine's Most Popular Component, Polyethylene Glycol and Its Alternatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 180, p. 114079, jan. 2022.

SHI, R.; LIAN, W.; HAN, S.; CAO, C.; JIN, Y.; YUAN, Y.; ZHAO, H.; LI, M. Nanosphere-Mediated Co-Delivery of VEGF-A and PDGF-B Genes for Accelerating Diabetic Foot Ulcers Healing in Rats. **Gene Therapy**, v. 25, n. 6, p. 425–438, set. 2018.

SHIN, D.; MUKHERJEE, R.; GREWE, D.; BOJKOVA, D.; BAEK, K.; BHATTACHARYA, A.; SCHULZ, L.; WIDERA, M.; MEHDIPOUR, A. R.; TASCHER, G.; GEURINK, P. P.; WILHELM, A.; VAN DER HEDEN VAN NOORT, G. J.; OVAA, H.; MÜLLER, S.; KNOBELOCH, K.-P.; RAJALINGAM, K.; SCHULMAN, B. A.; CINATL, J.; HUMMER, G.; CIESEK, S.; DIKIC, I. Papain-like Protease Regulates SARS-CoV-2 Viral Spread and Innate Immunity. **Nature**, v. 587, n. 7835, p. 657–662, nov. 2020.

SIA, D.; ALSINET, C.; NEWELL, P.; VILLANUEVA, A. VEGF Signaling in Cancer Treatment. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 17, p. 2834–2842, 2014.

SIDKY, Y. A.; AUERBACH, R. Lymphocyte-Induced Angiogenesis: A Quantitative and Sensitive Assay of the Graft-vs.-Host Reaction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 141, n. 5, p. 1084–1100, 1 maio 1975.

SIIGUR, J.; AASPÖLLU, A.; SIIGUR, E. Biochemistry and Pharmacology of Proteins and Peptides Purified from the Venoms of the Snakes *Macrovipera lebetina* Subspecies. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 158, p. 16–32, fev. 2019.

SIVALINGAM, G. N.; SHEPHERD, A. J. An Analysis of B-Cell Epitope Discontinuity. **Molecular Immunology**, v. 51, n. 3–4, p. 304–309, jul. 2012.

SKOOG, B. Determination of Polyethylene Glycols 4000 and 6000 in Plasma Protein Preparations. **Vox Sanguinis**, v. 37, n. 6, p. 345–349, 1979.

SPRINGER, T. A. Traffic Signals on Endothelium for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 827–872, 1995.

STAMM, A.; REIMERS, K.; STRAUSS, S.; VOGT, P.; SCHEPER, T.; PEPELANOVA, I. In vitro wound healing assays – state of the art. **BioNanoMaterials**, v. 17, n. 1–2, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bnm-2016-0002/html>>. Acesso em: 9 set. 2022.

STEPHANOPOULOS, N.; FRANCIS, M. B. Choosing an Effective Protein Bioconjugation Strategy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 12, p. 876–884, dez. 2011.

STÖCKLIN, R.; MEBS, D.; BOULAIN, J.-C.; PANCHAUD, P.-A.; VIRELIZIER, H.; GILLARD-FACTOR, C. Identification of Snake Species by Toxin Mass Fingerprinting of Their Venoms. In: CHAPMAN, J. R. **Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Mass Spectrometry of Proteins and Peptides**. Methods in Molecular BiologyTM. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 317–335.

SUN, N.; NING, B.; HANSSON, K. M.; BRUCE, A. C.; SEAMAN, S. A.; ZHANG, C.; RIKARD, M.; DEROSA, C. A.; FRASER, C. L.; WÅGBERG, M.; FRITSCHÉ-DANIELSON, R.; WIKSTRÖM, J.; CHIEN, K. R.; LUNDAHL, A.; HÖLTTÄ, M.; CARLSSON, L. G.; PEIRCE, S. M.; HU, S. Modified VEGF-A mRNA Induces Sustained Multifaceted

Microvascular Response and Accelerates Diabetic Wound Healing. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17509, 30 nov. 2018.

SUTO, K.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Crystal Structures of Novel Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) from Snake Venoms: Insight into Selective VEGF Binding to Kinase Insert Domain-Containing Receptor but Not to Fms-like Tyrosine Kinase-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 3, p. 2126–2131, 21 jan. 2005.

TAIBI-DJENNAH, Z.; LARABA-DJEBARI, F. Effect of Cytokine Antibodies in the Immunomodulation of Inflammatory Response and Metabolic Disorders Induced by Scorpion Venom. **International Immunopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 122–129, jul. 2015.

TAKAHASHI, H.; HATTORI, S.; IWAMATSU, A.; TAKIZAWA, H.; SHIBUYA, M. A Novel Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Predominantly Induces Vascular Permeability through Preferential Signaling via VEGF Receptor-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 46304–46314, 29 out. 2004.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/VEGF Receptor System and Its Role under Physiological and Pathological Conditions. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 109, n. 3, p. 227–241, set. 2005.

TAKESHITA, S.; ZHENG, L. P.; BROGI, E.; KEARNEY, M.; PU, L. Q.; BUNTING, S.; FERRARA, N.; SYMES, J. F.; ISNER, J. M. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 2, p. 662–670, fev. 1994.

TASIMA, L. J.; HATAKEYAMA, D. M.; SERINO-SILVA, C.; RODRIGUES, C. F. B.; DE LIMA, E. O. V.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; DE MORAIS-ZANI, K.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Comparative Proteomic Profiling and Functional Characterization of Venom Pooled from Captive *Crotalus durissus terrificus* Specimens and the Brazilian Crotalic Reference Venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 185, p. 26–35, 15 out. 2020.

TAVARES, N. U. L.; BERTOLDI, A. D.; MENGUE, S. S.; ARRAIS, P. S. D.; LUIZA, V. L.; OLIVEIRA, M. A.; RAMOS, L. R.; FARIAS, M. R.; PIZZOL, T. da S. D. Factors Associated with Low Adherence to Medicine Treatment for Chronic Diseases in Brazil. **Revista De Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 10s, dez. 2016.

THEAKSTON, R. D.; LLOYD-JONES, M. J.; REID, H. A. Micro-ELISA for Detecting and Assaying Snake Venom and Venom-Antibody. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8039, p. 639–641, 24 set. 1977.

TOKUNAGA, Y.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Specific Distribution of VEGF-F in Viperinae Snake Venoms: Isolation and Characterization of a VEGF-F from the Venom of *Daboia russelli siamensis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 439, n. 2, p. 241–247, 15 jul. 2005.

TOMANEK, R. J.; SCHATTEMAN, G. C. Angiogenesis: New Insights and Therapeutic Potential. p. 10, 2000.

TROMP, S. C.; OUDE EGBRINK, M. G.; DINGS, R. P.; VAN VELZEN, S.; SLAAF, D. W.; HILLEN, H. F.; TANGELDER, G. J.; RENEMAN, R. S.; GRIFFIOEN, A. W. Tumor

Angiogenesis Factors Reduce Leukocyte Adhesion in Vivo. **International Immunology**, v. 12, n. 5, p. 671–676, maio 2000.

UETZ, P. **THE REPTILE DATABASE**. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/>>. Acesso em: 24 fev. 2022.

VANDERLAAN, M.; MANIATIS, A.; OLNEY, R.; RAHMAOUI, A.; YAU, L.; QUARMBY, V.; AZZOLINO, C.; WOODS, C.; MOAWAD, D. Changes in Manufacturing Processes of Biologic Therapies Can Alter the Immunogenicity Profile of the Product. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 107, n. 4, p. 988–993, abr. 2020.

VERONESE, F. M. Peptide and Protein PEGylation: A Review of Problems and Solutions. **Biomaterials**, v. 22, n. 5, p. 405–417, mar. 2001.

VERONESE, F. M.; MERO, A. The Impact of PEGylation on Biological Therapies. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy**, v. 22, n. 5, p. 315–329, 2008.

WALSH, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1136–1145, dez. 2018.

WAN, X.; ZHANG, J.; YU, W.; SHEN, L.; JI, S.; HU, T. Effect of Protein Immunogenicity and PEG Size and Branching on the Anti-PEG Immune Response to PEGylated Proteins. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 183–191, jan. 2017.

WANG, J.; HU, T.; LIU, Y.; ZHANG, G.; MA, G.; SU, Z. Kinetic and Stoichiometric Analysis of the Modification Process for N-Terminal PEGylation of Staphylokinase. **Analytical Biochemistry**, v. 412, n. 1, p. 114–116, 1 maio 2011.

WARRELL, D. A. Snake Bite. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9708, p. 77–88, 2 jan. 2010.

WIEZEL, G. A.; SHIBAO, P. Y. T.; COLOGNA, C. T.; MORANDI FILHO, R.; UEIRA-VIEIRA, C.; DE PAUW, E.; QUINTON, L.; ARANTES, E. C. In-Depth Venome of the Brazilian Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: An Integrative Approach Combining Its Venom Gland Transcriptome and Venom Proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 17, n. 11, p. 3941–3958, 2 nov. 2018.

WOLBINK, G. J.; AARDEN, L. A.; DIJKMANS, B. a. C. Dealing with Immunogenicity of Biologicals: Assessment and Clinical Relevance. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 21, n. 3, p. 211–215, maio 2009.

WOOLARD, J.; BEVAN, H. S.; HARPER, S. J.; BATES, D. O. Molecular Diversity of VEGF-A as a Regulator of Its Biological Activity. **Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)**, v. 16, n. 7, p. 572–592, out. 2009.

YAMAZAKI, Y.; MATSUNAGA, Y.; NAKANO, Y.; MORITA, T. Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-Binding Protein in the Venom of Eastern Cottonmouth. A New Role of Snake Venom Myotoxic Lys49-Phospholipase A2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 29989–29992, 26 ago. 2005.

YAMAZAKI, Y.; TAKANI, K.; ATODA, H.; MORITA, T. Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) Exhibit Potent Activity through Their Specific Recognition of KDR (VEGF Receptor 2)*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 51985–51988, 26 dez. 2003.

YATES, J. R. Mass Spectrometry. From Genomics to Proteomics. **Trends in genetics: TIG**, v. 16, n. 1, p. 5–8, jan. 2000.

YEH, C. H.; PENG, H. C.; YANG, R. S.; HUANG, T. F. Rhodostomin, a Snake Venom Disintegrin, Inhibits Angiogenesis Elicited by Basic Fibroblast Growth Factor and Suppresses Tumor Growth by a Selective Alpha(v)Beta(3) Blockade of Endothelial Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 1333–1342, maio 2001.

ZHONG, S.; WU, J.; CUI, Y.; LI, R.; ZHU, S.; RONG, M.; LU, Q.; LAI, R. Vascular Endothelial Growth Factor from *Trimeresurus Jerdonii* Venom Specifically Binds to VEGFR-2. **Biochimie**, v. 116, p. 1–7, set. 2015.

ZITTERMANN, S. I.; ISSEKUTZ, A. C. Endothelial Growth Factors VEGF and BFGF Differentially Enhance Monocyte and Neutrophil Recruitment to Inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 2, p. 247–257, ago. 2006.

ZOCCAL, K. F.; SORGI, C. A.; HORI, J. I.; PAULA-SILVA, F. W. G.; ARANTES, E. C.; SEREZANI, C. H.; ZAMBONI, D. S.; FACCIOLI, L. H. Opposing Roles of LTB4 and PGE2 in Regulating the Inflammasome-Dependent Scorpion Venom-Induced Mortality. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10760, abr. 2016.

