



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Juliana Maria Cardoso

**Isolamento e identificação de moléculas alvos dos
venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus*
terrificus para diagnóstico de acidentes ofídicos
brasileiros.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia
Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu
2024

Juliana Maria Cardoso

Isolamento e identificação de moléculas alvos
dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus*
durissus terrificus para diagnóstico de acidentes
ofídicos brasileiros.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre
em Pesquisa e
Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica)

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu
2024

C268i Cardoso, Juliana Maria
Isolamento e identificação de moléculas alvos dos venenos de
Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus para diagnóstico de
acidentes ofídicos brasileiros. / Juliana Maria Cardoso. -- Botucatu,
2024
49 f.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Lucilene Delazari dos Santos

1. Proteômica. 2. Saúde Pública. 3. Soros Antiofídicos. 4. Teste
Rápido. 5. Cromatografia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade
Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIANA MARIA CARDOSO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 26 dias do mês de fevereiro do ano de 2024, às 09:00 horas, no(a) Via sistemas de videoconferência e outras ferramentas para comunicação a distância (Google Meet), realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JULIANA MARIA CARDOSO, intitulada **Isolamento e identificação de moléculas alvos dos venenos de Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus para diagnóstico de acidentes ofídicos brasileiros**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - Campus Botucatu - Unesp, Prof. Dr. BRUNO CESAR ROSSINI (Participação Virtual) do(a) Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - Campus Botucatu - Unesp, Profa. Dra. MARCIA HELENA BORGES (Participação Virtual) do(a) Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento / Fundação Ezequiel Dias. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: ___APROVADA___. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS



Documento assinado digitalmente

LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS

Data: 05/03/2024 22:44:15-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, seguido de meus pais, irmão e amigos por todo apoio e suporte para conquistar meus sonhos e nunca desistir.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung.

RESUMO

Envenenamentos por serpentes representam um dos principais problemas de saúde em países tropicais e subtropicais. Todos os anos, cerca de 5,8 bilhões de pessoas correm risco de se acidentarem com picadas de serpentes, acometendo quase 3 milhões de indivíduos e levando a morte cerca de 138 mil. Em reconhecimento a quantidade de acidentes e altas taxas de morbimortalidade, no ano de 2009, a Organização Mundial da Saúde elevou essa doença a categoria A de doenças tropicais negligenciadas. Desde então, estratégias vêm sendo desenvolvidas para seu combate. Nas Américas, as serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* são as principais responsáveis pelos envenenamentos humanos. Apesar de não existir exames laboratoriais que confirme o diagnóstico de envenenamento ofídico específico, testes são utilizados para diagnosticar e monitorar os acidentes ofídicos durante o tratamento com a soroterapia. Porém, a maior lacuna está na dificuldade da vítima em identificar a serpente ou na manifestação tardia dos sintomas nos pacientes, somados as manifestações clínicas dos acidentes serem muito similares entre serpentes de gêneros diferentes, influenciando na gravidade do acidente, podendo ocasionar diversas sequelas aos pacientes ou até mesmo levar o indivíduo a óbito. Assim, este projeto de pesquisa teve por objetivo isolar e identificar proteínas e/ou toxinas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* que apresentem ou não interação com os anticorpos presentes nos antivenenos comerciais, a fim de apontar perspectivas de aprimoramento dos antivenenos e evidenciar moléculas que possam auxiliar no desenvolvimento de testes diagnósticos. Para o desenvolvimento deste projeto foram realizados ensaios de cromatografia líquida de afinidade e ferramentas analíticas da abordagem proteômica do tipo shotgun. Posto isso, foi necessário a elaboração de duas colunas constituídas da matriz CNBR Sepharose 4B acopladas com antivenenos comerciais, sendo que os venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* foram utilizados em ensaios de cromatografia de afinidade. Assim, as frações de interesse foram quantificadas pelo método de Bradford e preparadas para análise em espectrometria de massas e bioinformática proteômica. Com os resultados, evidenciou-se que todas as proteínas do veneno botrópico apresentam interação com os anticorpos presentes no antiveneno botrópico, porém, moléculas de origem peptídica (peptídeos potencializadores de bradicinina) não são neutralizados por este antiveneno. Já os ensaios antivenômicos crotálicos, evidenciaram que fosfolipases A2 (Crotoxina) não são completamente neutralizadas pelo antiveneno específico e, que a proteína crotapotina (subunidade ácida da crotoxina) é uma molécula estruturalmente singular/exclusiva da peçonha crotálica que não é reconhecida pelos anticorpos presentes no antiveneno botrópico. Em conclusão, nossos estudos antivenômicos apontam perspectivas futuras para alavancar pesquisas que envolvam o aprimoramento do antiveneno crotálico brasileiro, o desenvolvimento de testes diagnósticos capazes de diferenciar os envenenamentos botrópicos dos crotálicos brasileiros e assim reduzir danos aos pacientes e custos dos recursos utilizados pelo SUS.

Palavras-chaves: Proteômica, saúde pública, soros antiofídicos, teste rápido, cromatografia.

LISTA DE SIGLAS

SINAN: Sistema de Informação de Agravos e Notificação

OMS: Organização Mundial da Saúde

LB: Ligantes de Botropicos

LC: Ligantes de Crotalicos

NLB: Não Ligantes de Botropicos

NLC: Não Ligantes de Crotalicos

1INL: 1 Invertido Não Ligantes

2IL: 2 Invertido Ligantes

3INL: 3 Invertido Não Ligantes

4IL: 4 Invertido Ligantes

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Quantificação de peptídeos ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) contidos nas amostras submetidas a hidrólise enzimática + dessalinização, evidenciando a massa total em μg e o rendimento em % do processamento de cada amostra. As frações são respectivamente identificadas por: **LC** - fração ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno crotálico comercial. **NLC** - fração não ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno crotálico comercial. **LB** - fração ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno botrópico comercial. **NLB** - fração não ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno botrópico. **1INL** – fração invertido não ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno crotálico comercial. **2IL** - fração invertido ligante do veneno botrópico contra antiveneno crotálico comercial. **3INL** - fração invertido não ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno botrópico comercial. **4IL** – fração invertido ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno botrópico comercial. **B** – veneno bruto de *Bothrops jararaca*. **C** – veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.....24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do processo de cromatografia líquida de afinidade realizada no experimento descrito acima. Na imagem observamos o suporte sólido com resina previamente sensibilizada com o F(ab)₂ dos antivenenos interagindo com as toxinas imunorreativas enquanto as toxinas não-imunorreativas são descartadas sem ligação. Ao lado, a representação do gráfico após leitura em espectrofotômetro, onde é possível analisar a absorbância das frações de interesse, sendo elas toxinas não-imunorreativas e as toxinas imunorreativas.....15

Figura 2: Perfil cromatográfico das frações proteicas imunorreativas do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* utilizando-se a resina CNBr, na qual as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial foram utilizadas como ligante específico. NLC: fração não ligante do veneno crotálico. LC: fração ligante do veneno crotálico.....19

Figura 3: Perfil cromatográfico das frações proteicas imunorreativas do veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* utilizando-se a resina CNBr, na qual as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial foram utilizadas como ligante específico. NLB: fração não ligante do veneno botrópico. LB: fração ligante do veneno botrópico.....19

Figura 4: Perfil cromatográfico das frações proteicas do veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* utilizando-se a resina CNBr, na qual as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial foram utilizadas como ligante específico. 1INL: fração invertido não ligante do veneno botrópico contra antiveneno crotálico comercial. 2IL: fração invertido ligante do veneno botrópico contra antiveneno crotálico comercial.....21

Figura 5: Perfil cromatográfico das frações proteicas do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* utilizando-se a resina CNBr, na qual as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial foram utilizadas como ligante específico. 3INL: invertido fração não ligante do veneno crotálico contra antiveneno botrópico comercial. 4IL: fração invertido ligante do veneno crotálico contra antiveneno botrópico comercial.....21

Figura 6: Perfil proteico eletroforéticos à 12,5% [m/v] em condições denaturas e redutoras das frações cromatográficas obtidas dos ensaios de imunoafinidade A) M- Padrão molecular; LB - fração ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno botrópico comercial, LC - fração ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno crotálico comercial; NLC - fração não ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno crotálico comercial NLB(1/2) - fração não ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno botrópico. B) M- Padrão molecular. 1INL – fração invertido não ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno crotálico comercial; 2IL – fração invertido ligante do veneno botrópico contra antiveneno crotálico comercial; 3INL – fração invertido não ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno botrópico comercial; 4IL – fração invertido ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno botrópico comercial. C) M- Padrão molecular B – veneno bruto de *Bothrops jararaca*, C – veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.....23

Figura 7: Composição das toxinas em % do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.25

Figura 8: Composição das toxinas em % do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.26

Figura 9: Perfil proteico em % da fração cromatográfica ligante (LB) do veneno de *Bothrops jararaca* que interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....27

Figura 10: Perfil proteico em % da fração cromatográfica não ligante (NLB) do veneno de *Bothrops jararaca* que interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....28

Figura 11: Diagrama de Venn evidenciando as proteínas comuns e exclusivas entre as frações ligantes (LB) e não ligantes (NLB) da cromatografia líquida de afinidade do veneno da serpente *Bothrops jararaca* frente as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....29

Figura 12: Perfil proteico em % da fração cromatográfica invertida não ligante (1INL) do veneno de *Bothrops jararaca* que não se interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....31

Figura 13: Perfil proteico em % da fração cromatográfica invertida ligante (2IL) do veneno de *Bothrops jararaca* que se interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....32

Figura 14: Diagrama de Venn evidenciando as proteínas comuns e exclusivas entre as frações invertida ligantes (2IL) e invertida não ligantes (1INL) da cromatografia líquida de afinidade do veneno da serpente *Bothrops jararaca* frente as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....33

Figura 15: Perfil proteico em % da fração cromatográfica ligante (LC) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que se interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....34

Figura 16: Perfil proteico em % da fração cromatográfica não ligante (NLC) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que se interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....35

Figura 17: Diagrama de Venn evidenciando as proteínas comuns e exclusivas entre as frações ligantes (LC) e não ligantes (NLC) da cromatografia líquida de afinidade do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* frente as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....35

Figura 18: Perfil proteico em % da fração cromatográfica invertida não ligante (3INL) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que não se interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....37

Figura 19: Perfil proteico em % da fração cromatográfica invertida ligante (4IL) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que se interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.38

Figura 20: Diagrama de Venn evidenciando as proteínas comuns e exclusivas entre as frações invertida ligantes (4IL) e invertida não ligantes (3INL) da cromatografia líquida de afinidade do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* frente as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.....39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Materiais biológicos.....	13
3.2 Preparo dos suportes sólidos e Cromatografia líquida de afinidade.....	14
3.3 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.....	15
3.4 Eletroforese Unidimensional.....	16
3.5 Digestão Enzimática das proteínas em solução.....	16
3.6 Quantificação de fragmentos peptídeos das amostras.....	17
3.7 Análises de Espectrometria de Massas.....	17
3.8 Análise dos dados por ferramentas de Bioinformática Proteômica.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O envenenamento por serpentes é um problema de saúde pública negligenciado em países tropicais e subtropicais, muitas vezes levando o acidentado a morte. (World Health Organization, 2019). Globalmente, 5,8 bilhões de pessoas correm risco de se acidentarem com picadas de serpentes, afetando aproximadamente 3 milhões e podendo levar a morte 138 mil todos os anos, gerando também prejuízo para a economia. (Portal Butantan, 2023). Nesse mesmo contexto, nas regiões Sul e Sudeste Asiático, África Subsaariana e Central e América do Sul carregam o maior fardo da incidência das picadas por serpentes (Kasturiratne et al, 2008). De acordo com as estimativas de pesquisadores em 2008 (Kasturiratne et al, 2008), o maior número de envenenamentos foi registrado no Sul da Ásia (121.000) seguido pelo Sudeste Asiático (111.000) e pela África Subsaariana Oriental (43.000), enquanto a Europa Central e a Ásia Central registraram o menor número de casos de picadas de serpentes. A incidência do envenenamento por serpentes na Europa, Oriente Médio, Canadá, e América do Norte é um evento raro (Chippaux et al, 1998).

Os venenos das serpentes são injetados por meio das presas, venenos estes responsáveis por desencadear muitas manifestações fisiopatológicas nas vítimas (Gutiérrez et al, 2017, Ferraz et al, 2019). Além disso, são responsáveis por ativar determinadas vias de sinalização do organismo envenenado, amplificando suas toxicidades (Bickler, 2020). Os venenos ofídicos são compostos por uma mistura de proteínas, peptídeos, aminoácidos e compostos de baixa massa molecular, que atuam em múltiplos processos bioquímicos e biológicos, sendo prejudiciais a outros organismos. Além disso, uma grande variação na composição dos venenos de serpentes é reconhecida, a qual tem sido atribuída a múltiplos fatores, tais como: pressão evolutiva, distância filogenética e similaridade taxonômica, dieta, desenvolvimento ontogenético, sexo, distribuição geográfica e habitat (Casewell et al, 2014; Jackson et al, 2016; Amazonas et al, 2018; Casewell et al, 2020).

Os venenos de serpentes são uma mistura complexa de substâncias biologicamente ativas, proteínas, constituídos por compostos orgânicos e inorgânicos, onde 90 a 95% são proteínas não tóxicas, enzimas, e toxinas não enzimáticas (Cunha, 2012). A elevada variabilidade na composição dos venenos das serpentes é responsável pelas diversas manifestações clínicas nos envenenamentos, variando desde dano tecidual local à efeitos sistêmicos potencialmente letais (Gutiérrez et al, 2017; Calvete et al, 2009). Assim, o tratamento dos acidentes ofídicos ocorre por meio da soroterapia específica (Ministério da

Saúde do Brasil, 2018; WHO, 2018). A variabilidade na composição dos venenos animais proporciona grandes oportunidades para a pesquisa e o desenvolvimento farmacológico, além de possibilitar o acesso de soluções biotecnológicas para diversas doenças já conhecidas. Como exemplo disso podemos citar o Captopril, sendo ele um fármaco derivado da peçonha de serpentes (Resende et al, 2021).

O Brasil é o terceiro país no mundo, juntamente com Vietnã, em números de incidência de acidentes com serpentes peçonhentas, de forma que no ano de 2001, o número de ocorrência por 100 mil habitantes era de 10,7 sendo que esse índice aumentou para 14,3, ficando apenas atrás da Índia e Sri Lanka (Matos et al, 2020). Segundo os dados epidemiológicos evidenciados no Sistema de Informação de Agravos e Notificação [SINAN] (SINAN, 2022) do Ministério da Saúde do Brasil, 2.101.006 acidentes por serpentes em seres humanos ocorreram no território brasileiro entre os anos de 2010 a 2020. Sabe-se que dentre estes acidentes notificados, mais de 900 brasileiros ficam com sequelas e 130 foram à óbito em média todos os anos (SINAN, 2022). Causa-se ainda mais espanto quando, se observa os números indicados como notificações ignoradas e/ou em branco (Ign/Branco), onde soma-se 1.822.205 notificações em que a equipe médica não registrou nos prontuários dos pacientes e/ou não soube identificar o tipo de serpente que provocou o acidente. Estes dados representam cerca de 86,73% das notificações totais frente aos acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil, onde os acidentes registrados por serpentes peçonhentas é de (gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*) 93,50% e não peçonhentas 6,50% registrados, no qual a serpente causadora do acidente foi identificada (SINAN, 2022).

As principais famílias de serpentes de interesse para a saúde pública no Brasil são da família Viperidae e Elapidae, sendo elas divididas em quatro grupos responsáveis pelos acidentes mencionados: I) os acidentes botrópicos (família: *Viperidae*, gênero: *Bothrops*, popularmente conhecidas como jararacas, jararacuços, urutus, caíças, comboias etc); II) acidentes crotálicos (família: *Viperidae*, espécie: *Crotalus durissus* – popularmente conhecidas por cascavéis); III) acidentes laquélicos (família: *Viperidae*, espécie: *Lachesis muta* – popularmente conhecidas por surucucu-pico-de-jaca); IV) acidente elapídico (família *Elapidae*, gênero: *Micrurus* e *Leptomicrurus* - popularmente conhecidas como cobras corais) (Ministério da Saúde, 2022).

Com o seu habitat cada vez mais invadido pelo homem, os acidentes por serpentes tornam-se mais frequentes, devido a sobreposição de espaço entre o homem e o animal, forçando essa grande diversidade de serpentes a conviverem com humanos, principalmente nas regiões agrícolas. Esses encontros fazem com que centenas de milhares de vítimas vão a óbito

ou fiquem com severas sequelas permanentes causadas por envenenamento decorrente da picada por serpentes (Gutiérrez, 2010; Araújo e Andrade, 2019, Knudsen et al 2021).

Sabe-se que entre os meses de dezembro a março no Brasil, são registrados cerca de 40% dos acidentes causados por animais peçonhentos. Uma das razões é pelo fato do aumento do fluxo de pessoas nas áreas de mata, além do aumento de chuva nos meses de verão e das férias escolares (Ministério da Saúde, 2022). Nesses meses quentes, os animais estão mais ativos, saindo de seus abrigos para a troca de calor e para reprodução, em especial as serpentes. Mas apesar desse aumento, quando comparados dados entre os anos de 2019 e 2020, observou-se uma queda de 20% no número de casos, sendo 5.060 no ano de 2019 e 4.028 em 2020. Essa queda no número de acidentes pode estar relacionada ao período da pandemia COVID-19 devido a diminuição da circulação das pessoas (Ministério da Saúde, 2022).

Tendo em vista o elevado número de notificações registradas no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN, 2022) ao longo dos anos, os acidentes por serpentes foram incluídos na Lista de Notificações Compulsórias (LNC) do Brasil (Portaria nº 2.472 de 31 de agosto de 2010, ratificada na Portaria nº 104, de 25 de janeiro de 2011) no ano de 2010. Esta atitude dos órgãos brasileiros foi impulsionada quando a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2009, incluiu os acidentes por animais peçonhentos na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas. Desta forma, os acidentes classificados como moderados ou graves pelos médicos se tornaram os casos de interesse em saúde pública mundialmente. Em 2019, a OMS foi mais além, declarando mundialmente um plano de ação para reduzir em 50% o número de acidentes por serpentes no mundo até o ano de 2030. Esta estratégia coloca os países no centro da resolução deste problema de saúde pública, define prioridades, enfoca sobre os resultados e impacto e direciona os países para se alinharem com as metas estabelecidas na 13ª Programa Geral de Trabalho e Desenvolvimento Sustentável. Este programa não apenas ajudará a reduzir o número de acidentes por serpentes, mas para melhorar e fortalecer os sistemas de saúde como um todo mundialmente (World Health Organization, 2019).

Sabe-se que as ocorrências por envenenamento por serpentes são tratadas apenas em unidades de saúde referências preparadas para tais urgências e emergências clínicas, pela necessidade da rapidez na neutralização das toxinas inoculadas no paciente, assim como no início das medidas cabíveis para a conservação das condições vitais dos acidentados. O diagnóstico pelos agentes de saúde é baseado na junção entre a história do paciente e pela abordagem sindrômica, sinais e sintomas ocasionados pela atividade tóxica desenvolvida pelo veneno inoculado, sendo algo presumível. Já para um diagnóstico específico, seria necessário o reconhecimento do animal causador do acidente (Gutiérrez et al, 2013, Knudsen, et al 2021).

Apesar de não existir exames laboratoriais que confirmem o diagnóstico de envenenamento ofídico específico, testes como tempo de coagulação (TC), hemograma e função renal são de grande importância para acompanhar o tratamento com a soroterapia e as complicações causadas nos acidentes botrópicos, crotálicos e laquéticos (Ministério da Saúde, 2022). No que se refere ao tratamento mais eficaz deste tipo de envenenamento, a aplicação intravenosa do soro antiveneno específico para cada gênero de serpente é recomendada (Knudsen et al, 2021, Ministério da Saúde, 2022). Porém, a maior lacuna está na dificuldade da vítima em identificar a serpente ou na manifestação tardia dos sintomas nos pacientes, somados as manifestações clínicas dos acidentes serem muito similares entre serpentes de gêneros diferentes (como por exemplo, *Bothrops* e *Lachesis*) (Melgarejo, 2009). Estes são motivos que justificam a demora na aplicação do soro correto ou o uso de soros não-específicos pelos agentes de saúde. Estes fatores influenciam diretamente na gravidade do acidente, podendo deixar sequelas ou até mesmo levar a óbito.

Neste contexto de diagnóstico do acidente ofídico brasileiro, sabe-se que não existe um produto comercialmente explorado e disponível no Brasil para a detecção *in vitro* do tipo de serpentes (gênero) brasileiras. Mundialmente, o único produto comercialmente explorado e disponível no mercado internacional é o kit *Snake Venom Detection kit* licenciado pela empresa *Seqirus*, indicado para a detecção *in vitro* somente de acidentes com serpentes australianas [http://www.seqirus.com.au/s1/cs/aucb/1196562673365/Web_Product_C/1196562753754/ProductDetail.htm]. Este produto se embasa na Patente inventiva internacional n.WO2017109660A1, com o título “*One step rapid snake envenomation detection and differentiation kit*”, por meio do seu inventor Medha Sonavane, [<https://patents.google.com/patent/WO2017109660A1/en?inventor=Medha+SONAVANE>], a qual relata o desenvolvimento de um kit para diferenciação de acidentes por serpentes com venenos neurotóxicos e hemotóxicos. Mais especificamente, este kit de detecção rápida determina a presença exclusivamente e somente das toxinas dos venenos das serpentes Cobra [*Naja naja*], Krait [*Bungarus caeruleus*], Russell's viper [*Vipera russelli*] e Saw Scaled Viper [*Echis carinatus*] na amostra de sangue em poucos minutos (Snake Venom Detection Kit, 2021).

Iniciativas lideradas pela Dra Lucilene Delazari dos Santos juntamente com colaboradores da UNESP e uma *start up* financiados pelos órgãos de fomento de auxílio pesquisa CNPq e PIPE FAPESP, iniciaram estudos em 2018 relacionados com a obtenção da prova de conceito para o desenvolvimento de um dispositivo de detecção *in vitro* e imunotipagem de venenos de serpentes brasileiras/nacionais, proposta esta que apresentava um

caráter de ineditismo. A proposta do dispositivo é a mesma empregada em testes de gravidez, por exemplo, tendo como benefícios: a não utilização de reagentes intermediários, a fácil interpretação dos resultados por qualquer pessoa independente do seu nível de instrução científica e a obtenção dos resultados em menos de 5 minutos. De lá para cá, ratificou-se a dificuldade que muitos pesquisadores encontram mundialmente de se realizar a distinção entre os venenos ofídicos devido à similaridade estrutural entre as toxinas majoritárias dos venenos das serpentes brasileiras, principalmente entre os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. Assim, por meio de ferramentas bioanalíticas distintas das utilizadas até o momento por esta equipe de pesquisadores, esta proposta evidencia novos esforços científicos para auxiliar no desenvolvimento de um dispositivo para diagnosticar e monitorar os envenenamentos ofídicos brasileiros.

2. OBJETIVO

Este projeto de pesquisa teve por objetivo isolar e identificar proteínas e/ou toxinas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* que apresentem ou não interação com os anticorpos presentes nos antivenenos comerciais, a fim de apontar perspectivas de aprimoramento dos antivenenos comerciais e evidenciar moléculas que possam auxiliar no desenvolvimento de testes diagnósticos capazes de diferenciar os envenenamentos botrópicos dos crotálicos brasileiros.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais biológicos

Os venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* foram concedidos pelo Serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP (coordenadas geográficas latitude: -22.8410659/longitude: -48.4275146) sob autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Registro Federal nº 1/35/92/0044-1, Proc. Nº. 02001.005670/90-77 [Criadouro Científico para Fauna Selvagem], Proc. Nº 3507.7263/2012-SP [Autorização de Manejo da Fauna Silvestre] e SisGen (Sistema Nacional do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, protocolo nº AFB4085).

3.2. Preparo dos suportes sólidos e Cromatografia líquida de afinidade

Estimulados pelas estratégias antivenômica descrita por Calvete e colaboradores (2009), optou-se pelo uso de cromatografias líquidas de afinidade antígeno-anticorpo para buscarmos por informações de reconhecimento ou não das toxinas pelos antivenenos brasileiros. Assim, a primeira etapa deste trabalho de mestrado foi realizar experimentos de cromatografia líquida em triplicata manualmente, utilizando dois suportes contendo a resina CNBr Sepharose 4B, ora uma com imunoglobulinas do antiveneno de botrópico comercial e outra, com imunoglobulinas do antiveneno de crotálico comercial.

Para o ensaio cromatográfico de afinidade, dois suportes sólidos (matrizes) foram preparados utilizando um grama cada da resina Sepharose CNBr 4B ressuspendidas em 15mL de HCl 1 mM por 15 minutos. Em seguida, 200 mL da solução HCl 1 mM foram utilizados para lavar as resinas individualmente, seguido por 20 mL de tampão de acoplamento (NaHCO_3 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH8,3). Foram utilizados 2 mL do antiveneno botrópico e 2 mL do antiveneno crotálico contendo 12 mg e 13 mg de proteínas totais, respectivamente, os quais foram incubados com as matrizes previamente preparadas por 12 horas a 4°C sob leve agitação. Grupos funcionais das matrizes que não reagiram com os anticorpos dos antivenenos foram bloqueados com glicina 0,1 M, pH 8, por 20 horas sob agitação constante. As matrizes de imunoafinidade foram lavadas de forma alternada por seis vezes, utilizando os tampões acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 4,0 e Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, respectivamente. Após as lavagens, as matrizes foram empacotadas em suportes plásticos individualmente.

Para os ensaios cromatográficos de afinidade, seis (6) miligramas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* foram diluídos em 0,5 mL de tampão Fosfato, os quais foram aplicados à coluna de imunoafinidade contendo seu respectivo antiveneno específico e numa segunda rodada de experimentos, os venenos foram submetidos à coluna de imunoafinidade contendo o antiveneno não específico. Estas colunas foram acopladas à um equipamento de cromatografia de baixa pressão AKTA Purifier (Cytiva) e equilibradas na presença do tampão Fosfato 20 mM, pH 7 (Tampão A). Em seguida, 15 mL do tampão Fosfato 20 mM, pH 7 foi utilizado para eluir as proteínas não imunorreativas (etapa de lavagem). O fluxo de trabalho foi de 0,250 mL/min, frações de 1 mL foram coletadas e a leitura de absorbância foi realizada em 280 nm. As proteínas imunoreativas foram eluídas em 9 mL do tampão Glicina 0,1M, pH 2,7 (Tampão B), as quais foram neutralizadas com 100 uL do tampão Tris 1M HCl, pH 9,0 (etapa de eluição). A leitura da absorbância das amostras coletadas foi feita por espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 em 280 nm. As frações de interesse foram reunidas e dialisadas frente a 2 litros do tampão Acetato de Amônio 50 mM, pH 6,8 com auxílio

de membranas de celulose (Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich) com trocas a cada 1 hora por 3 vezes. Ao final do processo, as amostras foram recuperadas e submetidas a quantificação de proteínas.

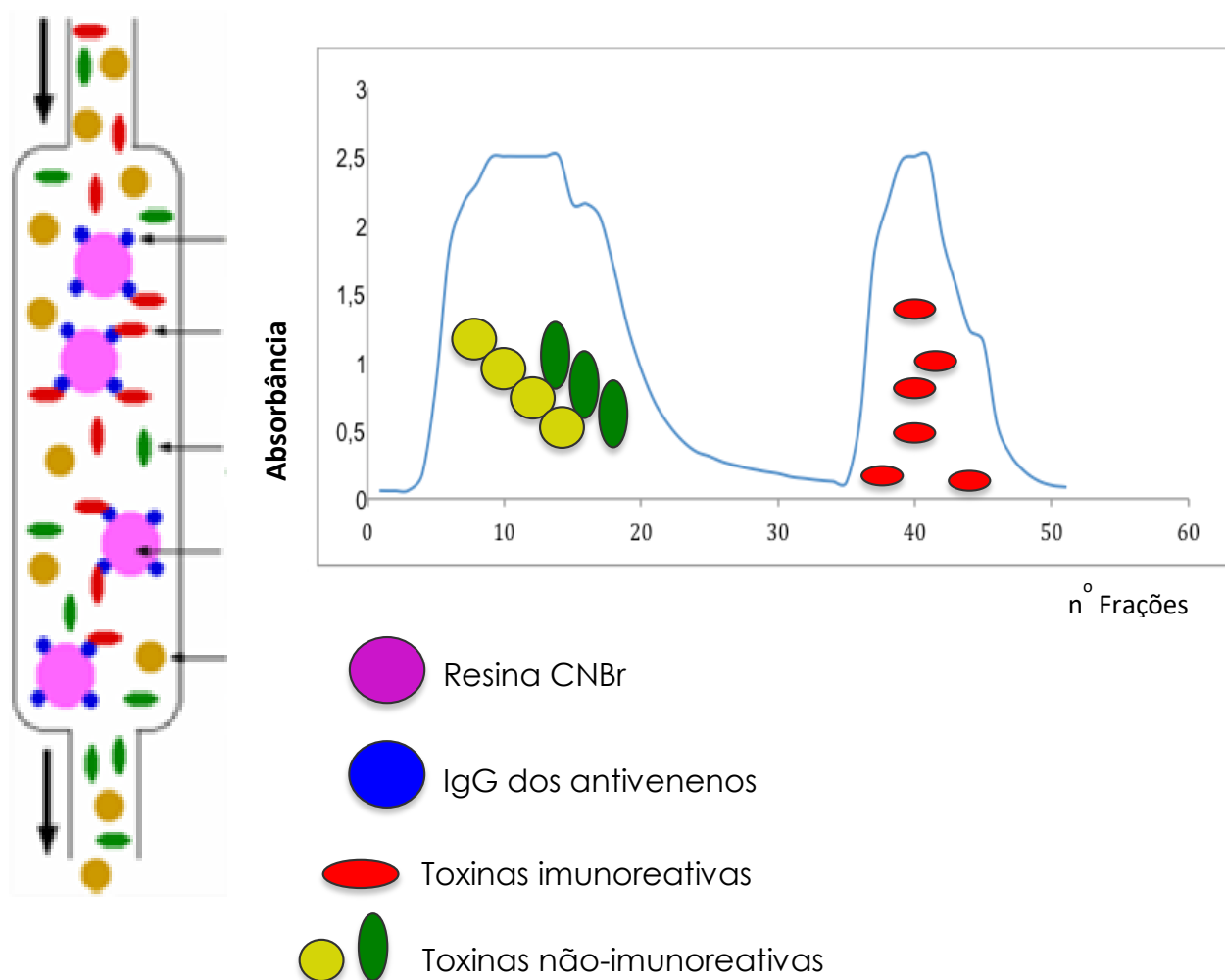


Figura 1: Ilustração do processo de cromatografia líquida de afinidade realizada no experimento descrito acima. Na imagem observamos o suporte sólido com resina previamente sensibilizada com o F(ab) dos antivenenos interagindo com as toxinas imunoreativas enquanto as toxinas não-imunoreativas são eluídas sem ligação. Ao lado, a representação do gráfico após leitura em espectrofotômetro, onde é possível analisar a absorbância das frações de interesse, sendo elas toxinas não-imunoreativas e as toxinas imunoreativas.

3.3. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o kit BioRad® Protein Assay (cod. 500-0001), tendo albumina bovina (BSA), como proteína padrão.

3.4. Eletroforese Unidimensional

A eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizada com a finalidade de analisar a qualidade proteica das amostras, por meio de um sistema convencional descrito por Laemmli (1970). Vinte microgramas de cada amostra foram solubilizados com tampão de amostra em um ambiente redutor e denaturadas em termo bloco (ThermoMixer® C, Eppendorf) por 5 minutos a 80 °C. Foram preparados géis de resolução com concentração de 12% (m/v) e géis de empilhamento com concentração de 6% (m/v). Para sua produção, foram utilizadas placas de vidro (10x10 cm) com espaçamento de 1 mm, onde inicialmente foi colocado o gel de resolução até a marcação inferior do *Casting Frame*, cobrindo posteriormente com 0,4 mL de água Mili-q, com a finalidade de isolar o gel auxiliando no seu processo de polimerização. Em seguida, foi inserido o gel de empilhamento, adicionando o pente para a formação dos poços onde as amostras foram inseridas para a polimerização final. Com a polimerização dos géis, as amostras foram aplicadas e os parâmetros utilizados foram 100 V por 10 minutos para a passagem das amostras e do padrão molecular pelo gel de empilhamento e, em seguida, 150 V em 60 minutos para a separação das proteínas pelo gel de resolução. Os géis de poliacrilamida foram corados com Coomassie R-250 e digitalizados por meio de um fotodocumentador.

3.5. Digestão Enzimática das proteínas em solução

A fim de identificar quem são os componentes de cada amostra do presente trabalho, hidrólises na presença da enzima tripsina foram realizadas em cada amostra. Primeiramente, 50µg de proteínas totais liofilizadas foram diluídas em 60µL de bicarbonato de amônio 50 mM e em seguida, 25µL do surfactant Padrao RapiGest SF (código 186001861, Waters) foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas à 37°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas às etapas de redução e alquilação, utilizando DTT 10 mM e iodoacetamida 45 mM, respectivamente. A digestão enzimática em solução foi realizada por meio da enzima tripsina na concentração 1:100 (enzima: amostra) solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu durante 18 horas e foi interrompida com a adição de 10µL de ácido fórmico 5% (v/v). As amostras foram incubadas por 90 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, centrifugadas à 14.000xg à 6°C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido para um tubo novo. Os digestos trópticos contido em cada amostra foram submetidos às colunas de dessalinização Peptide Cleanup C18 Spin (código 5188-2750 Agilent Technologies) segundo as recomendações do fabricante.

3.6. Quantificação de fragmentos peptídeos das amostras

Após a dessalinização das frações seguida da hidrólise enzimática, foi realizada a quantificação dos fragmentos peptídeos contidos em cada fração/amostra. A quantificação dos fragmentos peptídicos foi executada seguindo o protocolo da Qubit® Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) por meio de técnicas fluorimétricas. Para o preparo das amostras foi utilizado 199 μL do tampão trabalho (Invitrogen, Qubit™ protein Buffer) juntamente com 1 μL do fluófloro laranja (Invitrogen, Qubit™ protein Reagent). A partir dessa solução em um microtubo plástico 0,5 mL do tipo Ultra Clear, foram adicionados 198 μL desta primeira mistura do tampão de trabalho mais 2 μL da amostra, os quais permaneceram incubados por 15 minutos na ausência da luz. Após o tempo de incubação, a leitura e consequentemente os cálculos de concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), foi realizada no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer.

3.7. Análises de Espectrometria de Massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B, ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30 μm x 5mm (Código 164649, ThermoFisher Scientific), e desalinizados num gradiente de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3 μm , 120 Å, 105mm, Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP) utilizando um gradiente de 4-55%B por 30 min, 55% a 90%B por 1 min, mantido à 90%B por 5 minutos e reequilibrado à 4%B por 20 minutos à um fluxo de 300 nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP). O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 à m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

3.8. Análise dos dados por ferramentas de Bioinformática Proteômica

Os dados brutos de espectrometria de massas no formato raw foram submetidos ao software PatternLab [versão 4.0.0.84] (Carvalho et al, 2016) para a obtenção da identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados UNIPROT (Taxonomy Serpentes), enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (False Discovery Rate) máxima foi considerada de $\leq 1\%$. Diagramas de Venn foram elaborados utilizando o software Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode-se notar nas Figuras 2 e 3, dois picos foram visualizados. As frações foram reunidas segundo os picos cromatográficos de interesse, sendo eles denominados como frações Ligantes (L) e Não Ligantes (NL).

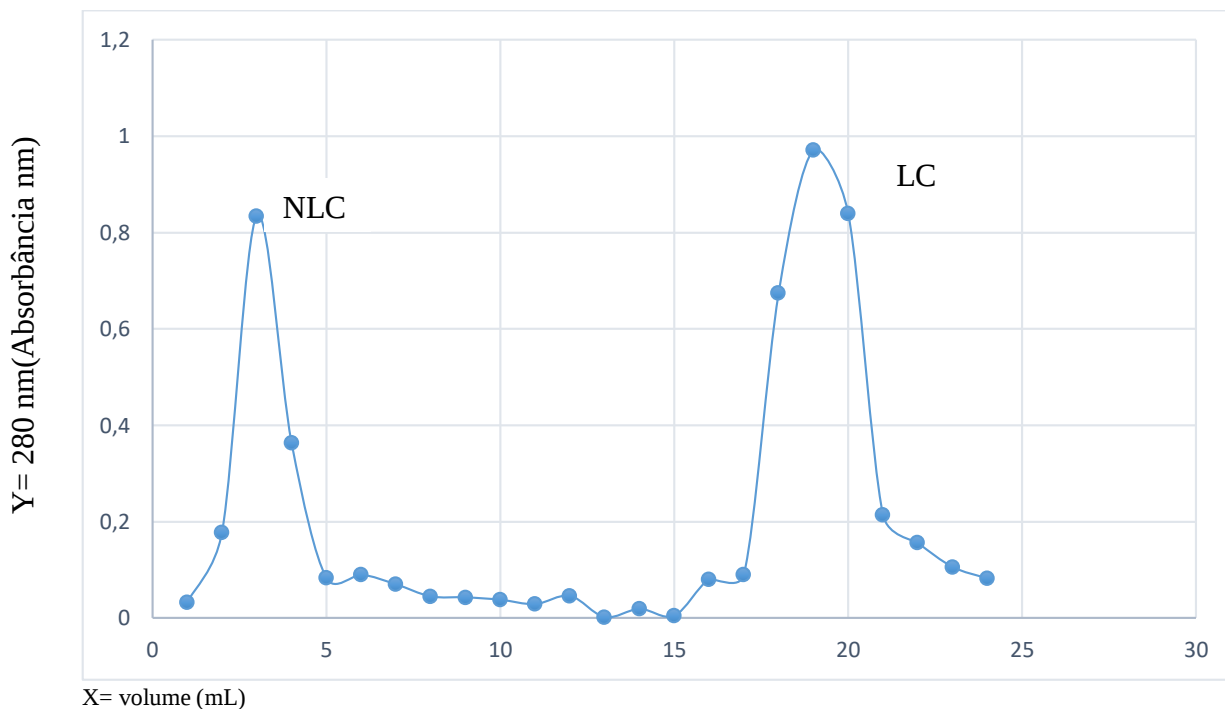


Figura 2: Perfil cromatográfico das frações proteicas imunorreativas do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* utilizando-se a resina CNBr, na qual as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial foram utilizadas como ligante específico. NLC: fração não ligante do veneno crotálico. LC: fração ligante do veneno crotálico.

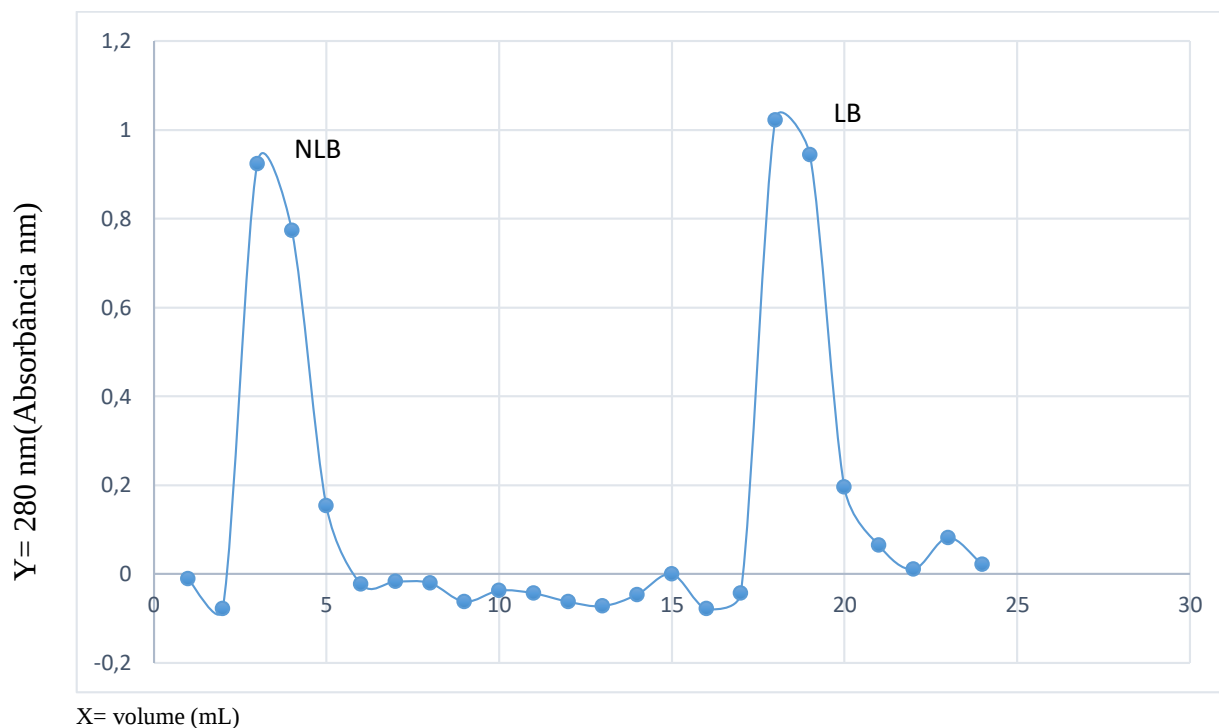


Figura 3: Perfil cromatográfico das frações proteicas imunorreativas do veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* utilizando-se a resina CNBr, na qual as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial foram utilizadas como ligante específico. NLB: fração não ligante do veneno botrópico. LB: fração ligante do veneno botrópico.

As frações ligantes (L) contêm as proteínas/toxinas que apresentam interações específicas com as imunoglobulinas de seus antivenenos e a fração Não Ligantes (NL), provavelmente proteínas/toxinas dos venenos das serpentes sem interação com as imunoglobulinas presentes nos antivenenos, ausência de sítios ativos suficientes capazes de reter/segurar todas as proteínas/toxinas dos venenos que apresentariam interações com as imunoglobulinas dos antivenenos ou por possuírem massas diferentes.

Quando os venenos das serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* foram submetidos às resinas CNBr contendo como ligante as imunoglobulinas dos antivenenos não específicos, ou seja, na resina contendo antiveneno crotálico como ligante específico foi submetido o veneno de botrópico e na coluna contendo o antiveneno botrópico, foi submetido o veneno crotálico, os perfis cromatográficos de imunoafinidade apontaram também duas frações distintas (Figuras 4 e 5). Pode-se notar a presença de proteínas/toxinas que não apresentaram interação com as imunoglobulinas dos antivenenos não específicos, o que já era esperado e, proteínas/toxinas que tiveram interação com as moléculas da resina sensibilizada contendo o antiveneno não específico. Estas frações ligantes provavelmente contêm

proteínas/toxinas que apresentam muitas semelhanças estruturalmente entre si capazes de serem reconhecidas pelas imunoglobulinas presentes nos antivenenos não específicos.

Este aspecto tem sua repercussão na prática clínica dos acidentes por serpentes em hospitais, uma vez que, se asseguram na Nota Técnica Animais Peçonhentos – N° 01/2021 – CIATox-ES/NEPAINT/GEVS/SESA (Ministério da Saúde do Brasil, 2021), no qual traz orientações sobre o uso de antivenenos animais. Como é sabido, entre os acidentes toxicológicos ofídicos de maior importância estão os botrópicos, sendo considerado de maior importância e distribuição dentre os acidentes ofídicos no Brasil. Neste caso, é recomendado o uso do soro antibotrópico, soro antibotrópico/laquétrico, soro antibotrópico/crotálico, dando prioridade para o uso do soro específico não conjugado, quando possível. Para os acidentes Crotálicos, podem ser utilizados os soros anticrotálico ou soro antibotrópico/crotálico. Em situações onde não é possível a utilização de soros específicos para serpentes do gênero *Bothrops* ou *Crotalus*, é possível utilizar o Soro antibotrópico (pentavalente) (Ministério da Saúde do Brasil, 2021). Assim, nota-se claramente que os soros não específicos, na ausência dos específicos, ainda podem ajudar a combater o quadro toxicológico (salvar vidas) por conterem imunoglobulinas que podem parcialmente neutralizar as toxinas circulantes. As semelhanças estruturais das toxinas dos gêneros de serpentes produzem imunoglobulinas com receptores/epítomos com elevada similaridade.

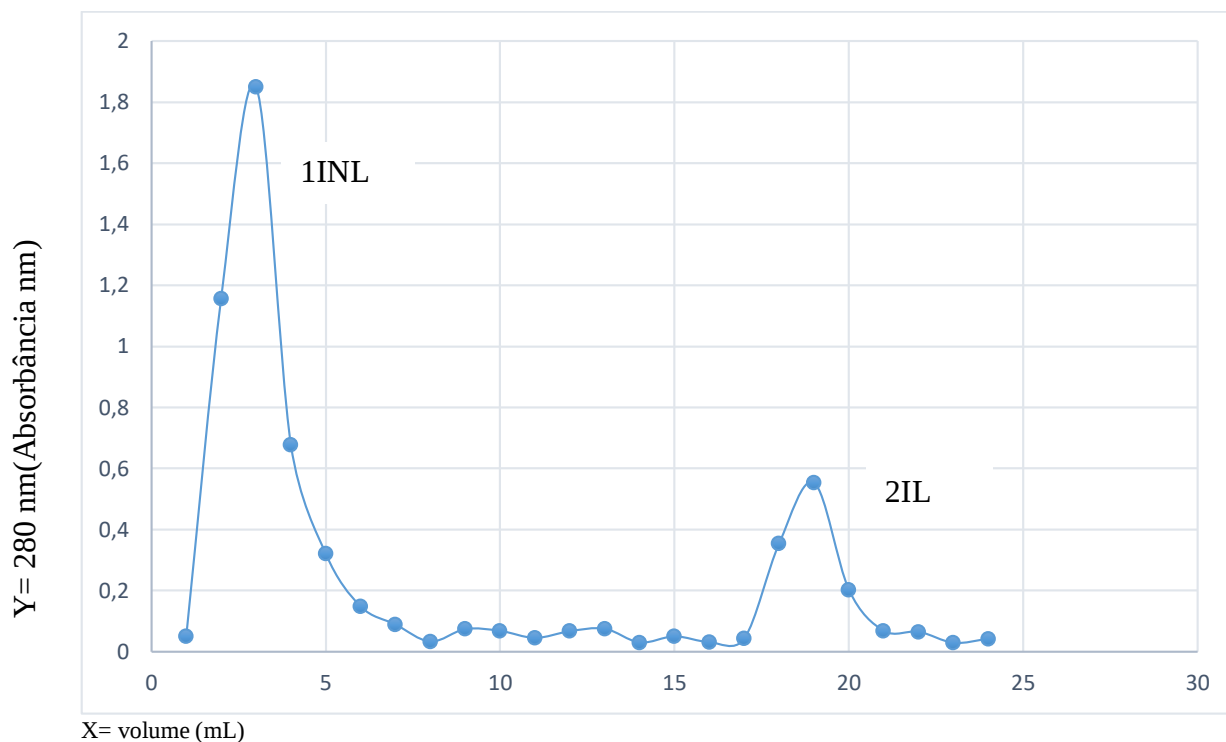


Figura 4: Perfil cromatográfico das frações proteicas do veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* utilizando-se a resina CNBr, na qual as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial foram utilizadas como ligante específico. 1INL: fração invertida não ligante do veneno botrópico contra antiveneno crotálico comercial. 2IL: fração invertida ligante do veneno botrópico contra antiveneno crotálico comercial.

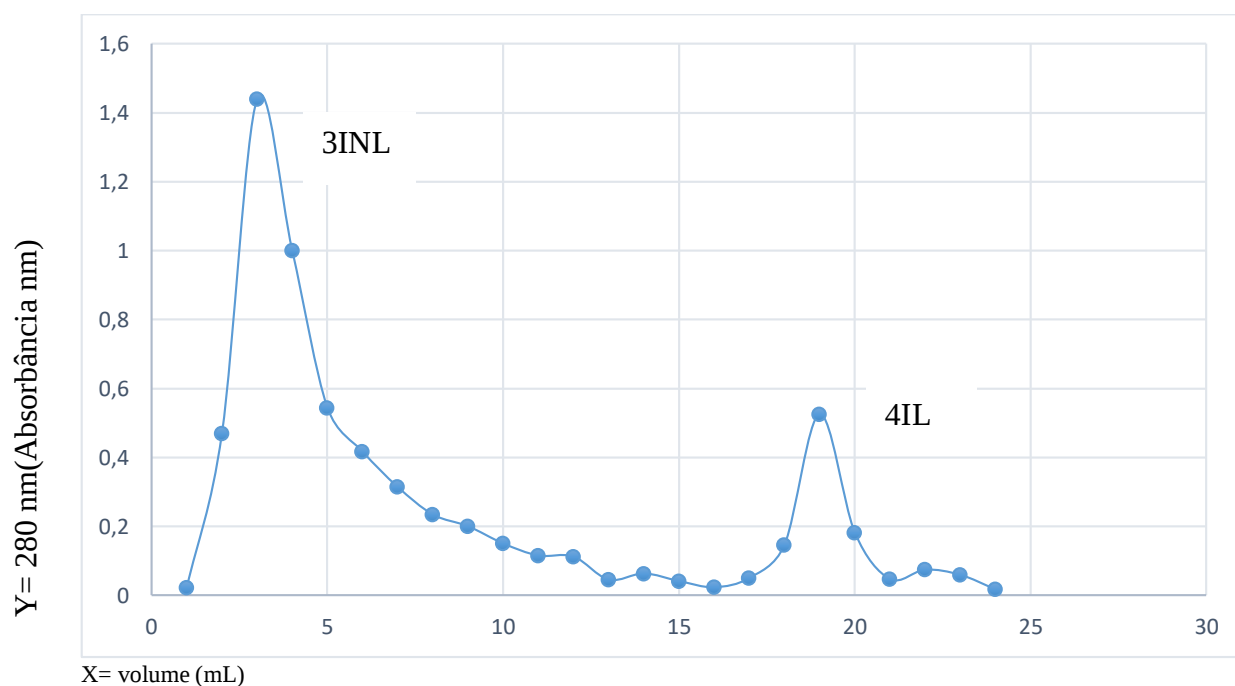
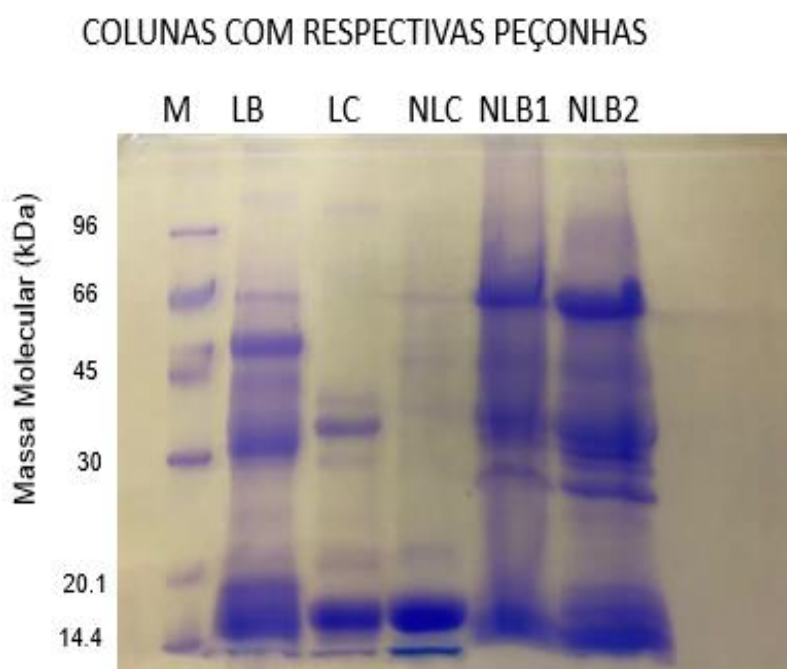


Figura 5: Perfil cromatográfico das frações proteicas do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* utilizando-se a resina CNBr, na qual as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial foram utilizadas como ligante específico. 3INL: invertida fração não ligante do veneno crotálico contra

antiveneno botrópico comercial. 4IL: fração invertido ligante do veneno crotálico contra antiveneno botrópico comercial.

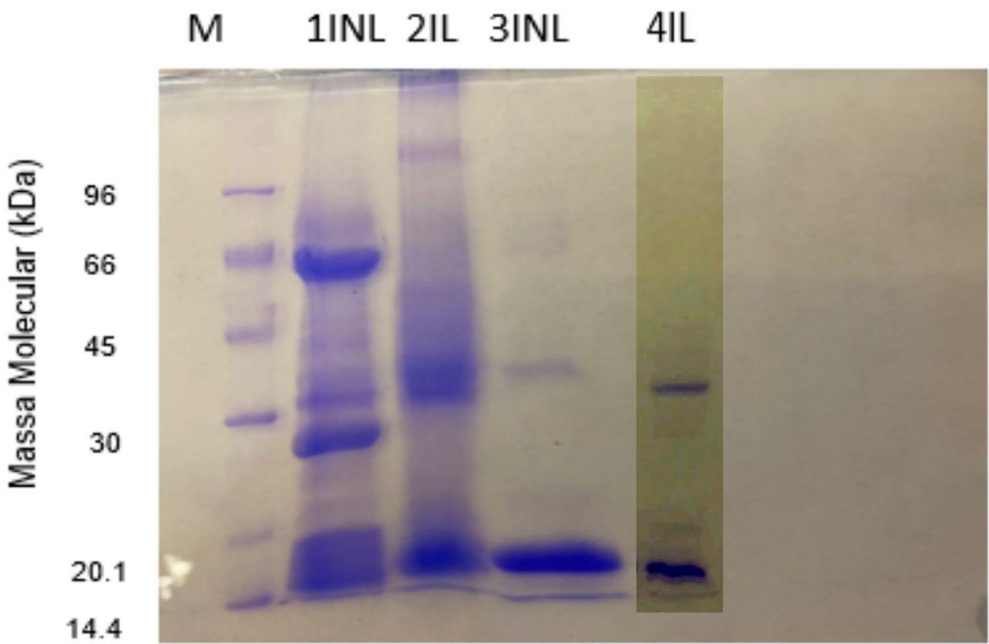
A Figura 6 evidencia as bandas proteicas majoritárias de cada fração cromatográfica, as quais se mostram bem definidas indicando uma adequada qualidade das amostras analíticas, ou seja, a ausência de degradação proteica nas amostras torna-as aptas para as próximas etapas experimentais. Como já dito anteriormente, os venenos das serpentes são compostos muito complexos, não apenas ao que se refere nos quadros envolvendo envenenamentos, como também no estudo analítico deste fluido biológico. Inicialmente, os estudos bioquímicos relacionados a este tipo de amostra eram relacionados ao isolamento de toxinas e sua atividade biológica; porém, mais adiante, os estudos passaram a incluir as análises por eletroforese, tanto unidimensional como bidimensional, como um meio de avaliar o proteoma total (Silva, 2015).

(A)



(B)

COLUNAS E PEÇONHAS INVERTIDAS



(C)

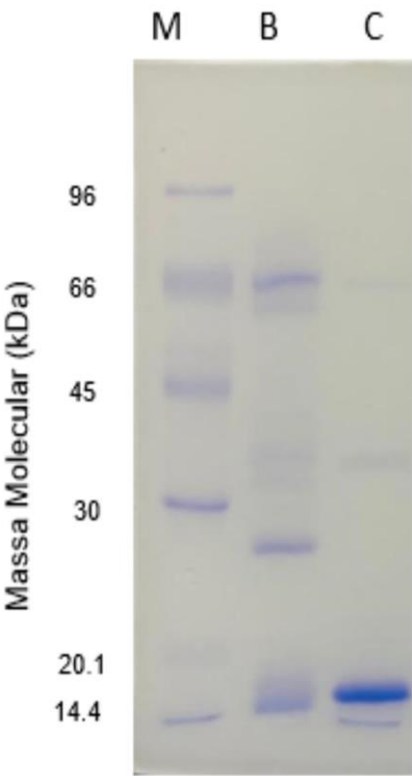


Figura 6: Perfil proteico eletroforéticos à 12,5% [m/v] em condições denaturas e redutoras das frações cromatográficas obtidas dos ensaios de imunoafinidade A) M- Padrão molecular; LB - fração ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno botrópico comercial, LC - fração ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno crotálico comercial; NLC - fração não ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno crotálico comercial NLB(1/2) - fração não ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno botrópico. B) M- Padrão molecular. 1INL – fração invertido não ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno crotálico comercial; 2IL – fração invertido ligante do veneno botrópico contra antiveneno crotálico comercial; 3INL – fração invertido não ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno botrópico comercial; 4IL – fração invertido ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno botrópico comercial. C) M- Padrão molecular B – veneno bruto de *Bothrops jararaca*, C – veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.

A Tabela 1 mostra a concentração peptídica de cada amostra e evidencia o rendimento peptídico de cada amostra após hidrólise enzimática e dessalinização.

Tabela 1: Quantificação de peptídeos ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) contidos nas amostras submetidas a hidrólise enzimática + dessalinização, evidenciando a massa total em μg e o rendimento em % do processamento de cada amostra. As frações são respectivamente identificadas por: **LC** - fração ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno crotálico comercial. **NLC** - fração não ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno crotálico comercial. **LB** - fração ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno botrópico comercial. **NLB** - fração não ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno botrópico. **1INL** – fração invertido não ligante do veneno botrópico frente ao antiveneno crotálico comercial. **2IL** - fração invertido ligante do veneno botrópico contra antiveneno crotálico comercial. **3INL** - fração invertido não ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno botrópico comercial. **4IL** – fração invertido ligante do veneno crotálico frente ao antiveneno botrópico comercial. **B** – veneno bruto de *Bothrops jararaca*. **C** – veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.

Fração	Concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Massa em μg	Rendimento em % frente aos 50 μg iniciais submetidos à hidrólise enzimática
LC	0,156	6,24	12,48
NLC	0,1	4	8
LB	0,146	5,84	11,68
NLB	0,28	11,2	22,4
1 INL	0,208	8,32	16,64
2IL	0,187	7,48	14,96
3 INL	0,148	5,92	11,84
4IL	0,1	4	8
B	0,207	8,26	16,53
C	0,209	8,33	16,65

Diante dos dados apresentados na Tabela 1, nota-se um baixo rendimento (%) no processamento das amostras, onde todas as amostras apresentaram valores menores de 20% frente aos 50 μg iniciais de proteínas submetidas na hidrólise enzimática de cada amostra. Para as análises de Espectrometria de Massas, era necessário apenas 2 μg de peptídeos totais para injeção em duplicata. Porém, fica aqui registrado a necessidade de se aprimorar esta etapa

experimental quanto a avaliar a atividade ótima da enzima tripsina durante a digestão e a possíveis perdas de peptídeos durante a etapa de dessalinização.

As Tabelas contidas no Material Suplementar - <https://drive.google.com/drive/folders/1HVboggWrDp5evCjEQsZmt4Y4EeaN9wPz?role=writer> - apresentam a identificação de proteínas presentes em cada amostra/fração analisada por espectrometria de massas e seus respectivos parâmetros proteômicos. Para melhor compreender a composição de cada amostra, os dados foram compilados em formato de gráficos de pizza e Diagramas de Venn para avaliar as proteínas/toxinas comuns entre as frações comparadas (Figuras 7 a 20).

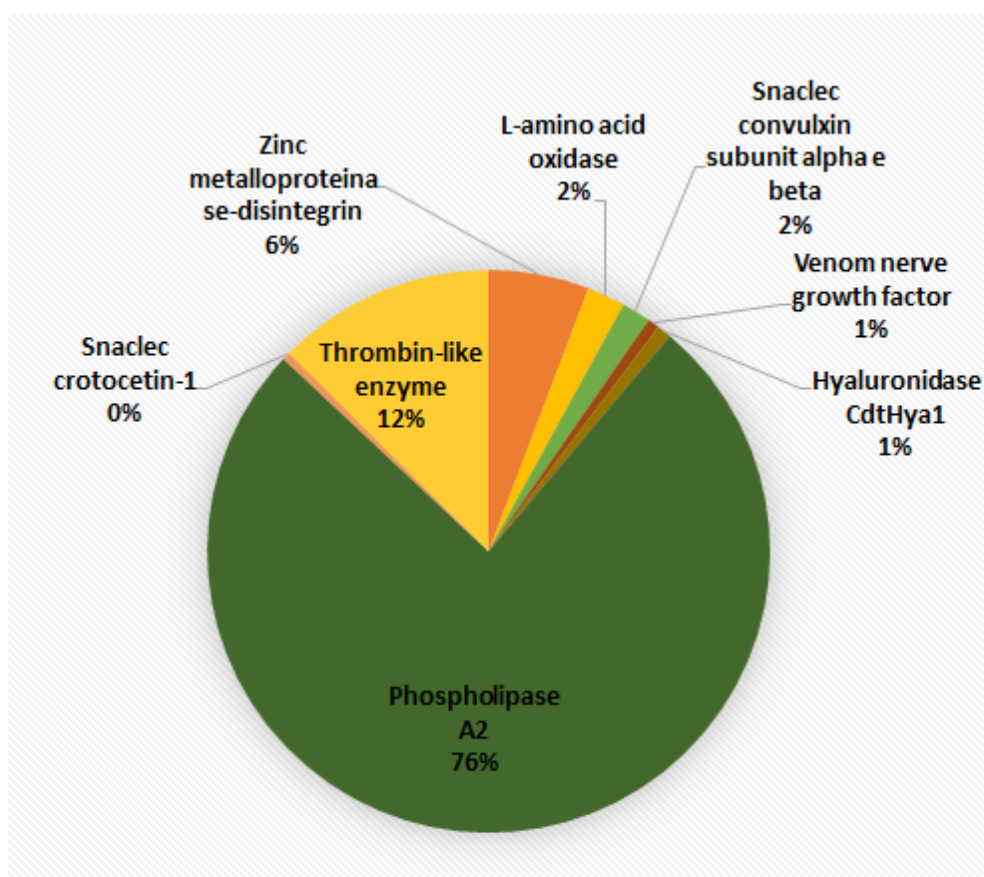


Figura 7: Composição das toxinas em % do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

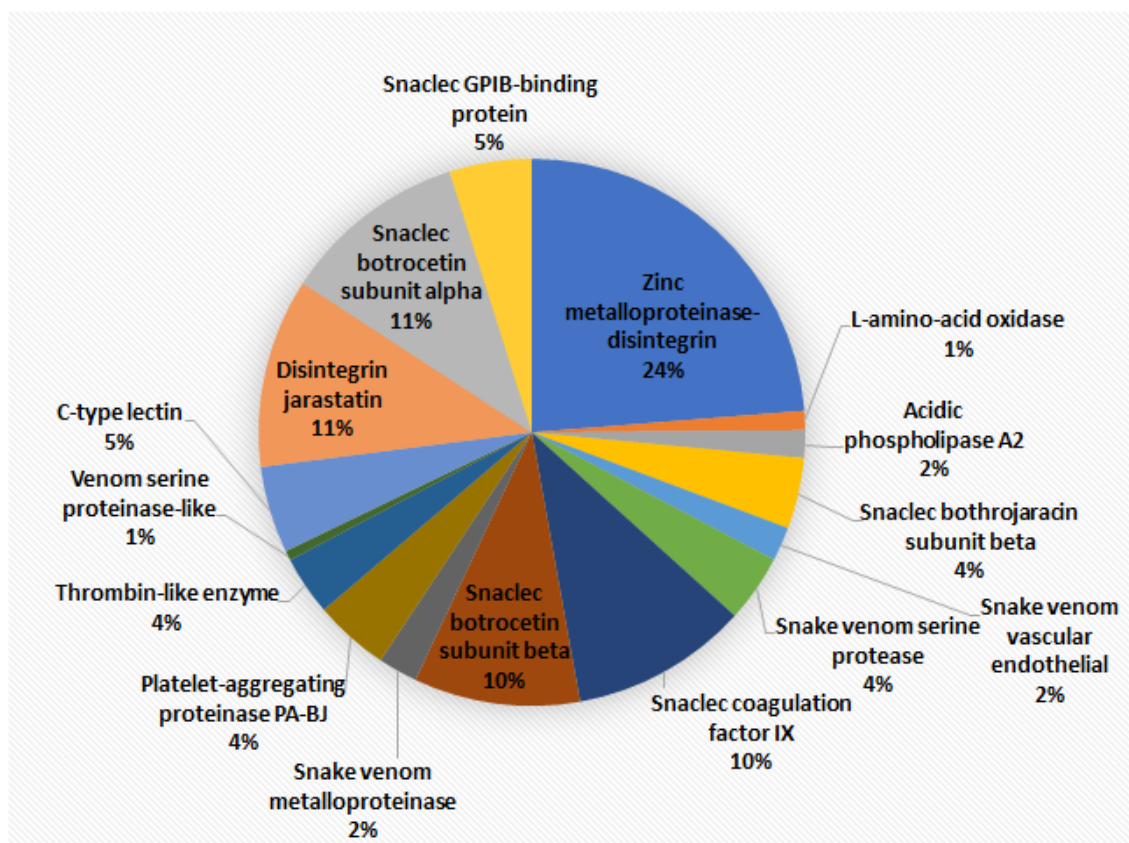


Figura 8: Composição das toxinas em % do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

As análises proteômicas dos venenos de *Crotalus durissus terrificus* (Figura 7) e *Bothrops jararaca* (Figura 8) evidenciadas neste trabalho serviram para ratificarmos as informações sobre a composição destes venenos animais frente a literatura (da Silva-Júnior et al, 2020, Calvete et al, 2010; Fusco et al, 2020; Zelanis et al, 2011; Dias et al, 2013; Farias et al, 2018) e avaliar as moléculas isoladas dos mesmos frentes aos anticorpos presentes nos antivenenos crotálico e botrópico comercial atualmente utilizados nos tratamentos ofídicos no Brasil (Figuras 9 a 20).

Pela literatura, existem outras toxinas de grande importância proveniente do veneno das serpentes crotálicas, como a Crotamina, que curiosamente não foi identificada no *pool* do veneno crotálico. Tal substância possui peso molecular de 4,8 kDa, sendo formada por 42 aminoácidos. É uma molécula relativamente pequena e carregada, possuindo seus resíduos hidrofóbicos expostos aos solventes. Biologicamente esse componente da toxina das cascavéis despolariza e contrai o músculo esquelético, em estudos utilizando camundongos, identificou que a sua ação causa espasmos e a paralisia das patas traseiras, além da dificuldade de respirar (El-Corab, 2015).

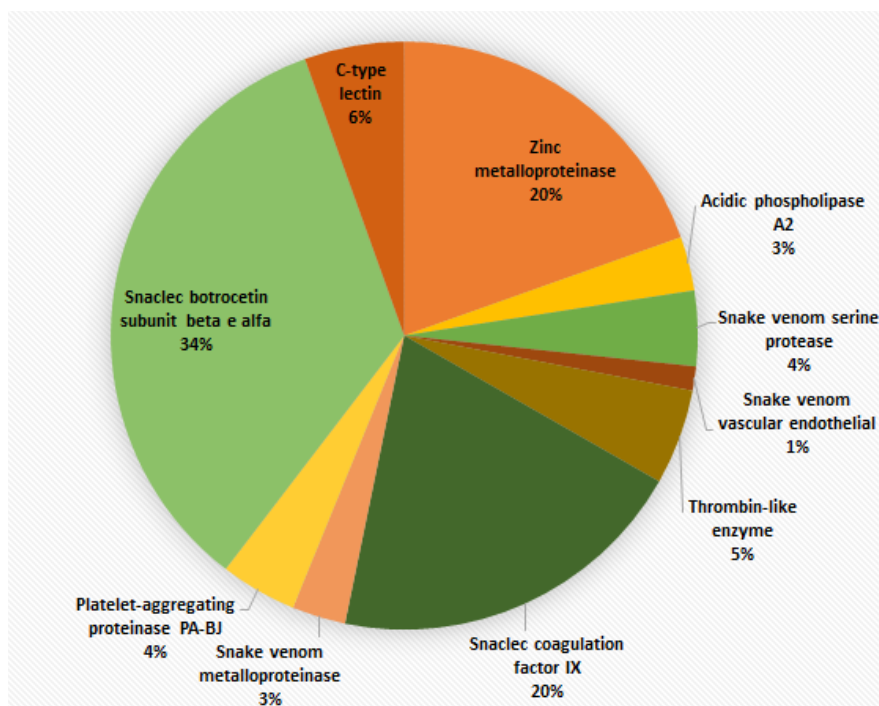


Figura 9: Perfil proteico em % da fração cromatográfica ligante (LB) do veneno de *Bothrops jararaca* que interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

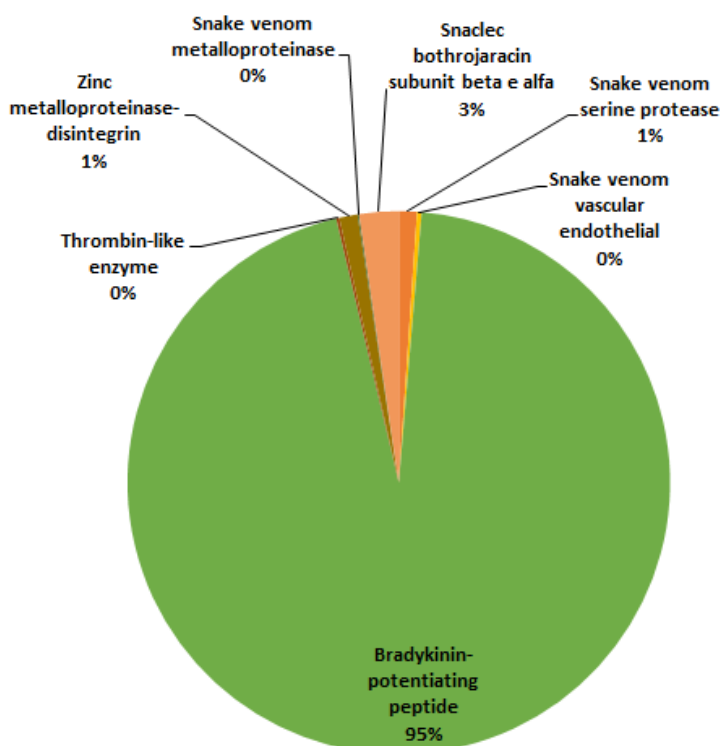


Figura 10: Perfil proteico em % da fração cromatográfica não ligante (NLB) do veneno de *Bothrops jararaca* que interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

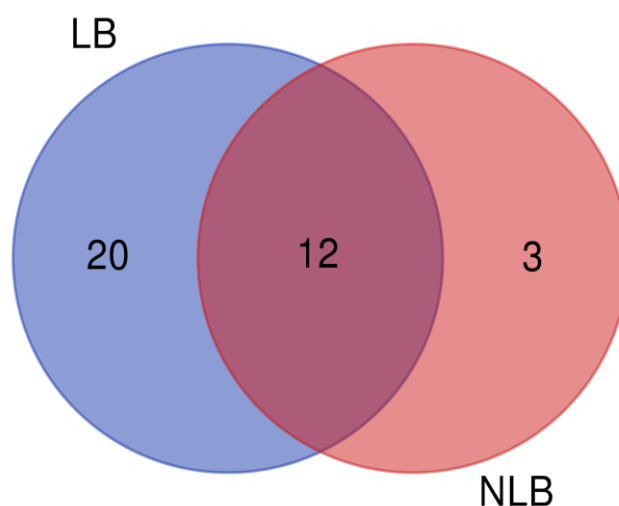


Figura 11: Diagrama de Venn evidenciando as proteínas comuns e exclusivas entre as frações ligantes (LB) e não ligantes (NLB) da cromatografia líquida de afinidade do veneno da serpente *Bothrops jararaca* frente as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

Ao analisar o Diagrama de Venn (Figura 11) comparando os resultados das Figuras 9 e 10, foram identificadas 35 moléculas totais do veneno botrópico, sendo que 12 destas

(proteínas) são comuns na fração ligante (LB) e não ligante (NLB). Porém, quantitativamente, nota-se uma porcentagem muito pequena de moléculas semelhantes que não apresentaram interação (NLB) com as imunoglobulinas da resina. Este fato ratifica que o antiveneno botrópico apresentava anticorpos suficientemente capazes de neutralizar/proporcionar interação com a maior parte dos antígenos presentes no veneno de *Bothrops jararaca*. Neste ensaio de cromatografia líquida de afinidade, 12 mg de anticorpos do antiveneno foram acoplados na resina e apenas 6 mg de veneno botrópico foram submetidos ao fracionamento.

Curiosamente, 3 tipos de moléculas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* não tiveram interação com as imunoglobulinas presentes nos antivenenos, uma vez que tratam-se de moléculas muito pequenas, não gerando anticorpos. Essas três moléculas são os Peptídeos Potencializadores de Bradicinina. Esses peptídeos foram encontrados em muitos venenos de serpentes, incluindo os botrópicos e os crotálicos, os quais possuem atividade hipotensora (queda da pressão arterial), além de estar relacionada com o aumento da permeabilidade tecidual, dilatação vascular/redução da pressão arterial e contração da musculatura lisa (Costa, 2019; Neto, 2013). Além disso, são conhecidos por atuarem na inibição da enzima inativação da conversão da angiotensina I (ECA), para o vasoconstritor angiotensina II, assim como para a degradação da bradicinina. Logo, impedem o efeito hipertensivo da angiotensina II e potenciam o efeito hipotensor da bradicinina na circulação (Neto, 2013). Estes peptídeos hipotensores podem ser encontrados especificidade na subfamília (Viperinae/Crotalinae) no peptidoma do veneno de serpentes da família Viperidae (Neto, 2013). Tendo em vista que, estas toxinas podem ser neutralizadas e/ou os quadros clínicos decorrentes da ação destes peptídeos hipotensores são manejados por meio de medicamentos coadjuvantes durante o tratamento das vítimas de acidentes botrópicos, a ausência de imunoglobulinas no antiveneno botrópico neutralizantes destes peptídeos, não é caracterizado uma problemática na rotina clínica.

Quando propusemos a submissão do veneno botrópico na resina contendo as imunoglobulinas do antiveneno crotálico, evidenciamos que a fração das toxinas não-imunoreativas (1INL) (Figura 12), apresenta uma grande variedade de toxinas do veneno botrópico, sendo que este fato já era esperado devido a inespecificidade do antiveneno crotálico. Em contrapartida, 4 moléculas com atividades biologicamente semelhantes apresentaram interações com o antiveneno crotálico (fração 2IL) (Figura 12). A Figura 13 evidencia estas semelhanças e diferenças quando comparadas as frações 1INL e 2IL.

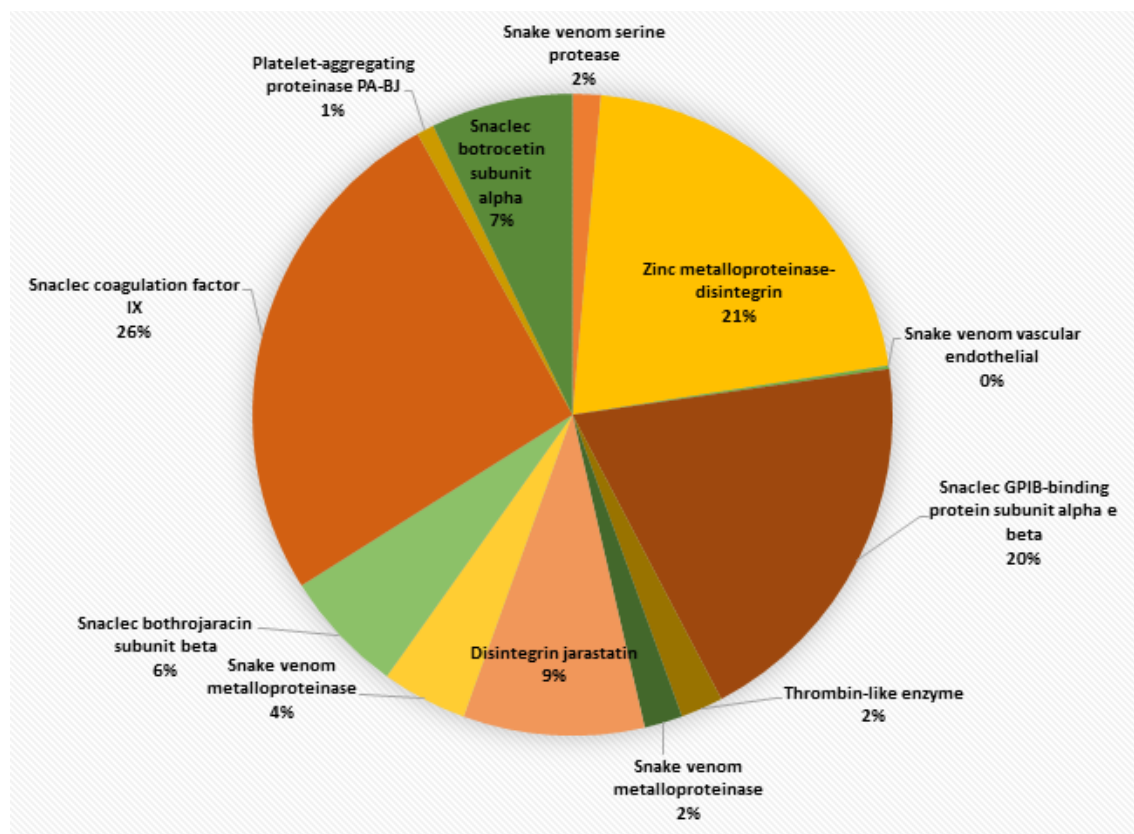


Figura 12: Perfil proteico em % da fração cromatográfica invertida não ligante (1INL) do veneno de *Bothrops jararaca* que não se interagem com as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

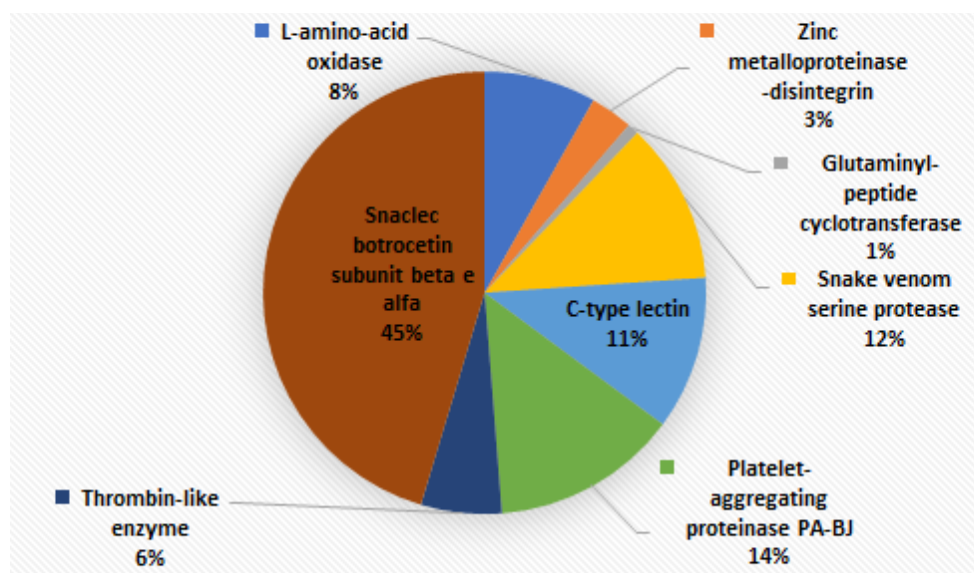


Figura 13: Perfil proteico em % da fração cromatográfica invertida ligante (2IL) do veneno de *Bothrops jararaca* que se interagem com as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

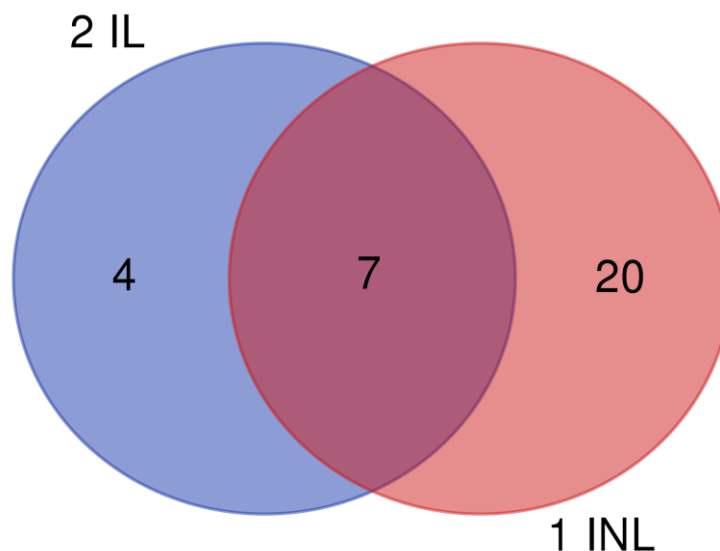


Figura 14: Diagrama de Venn evidenciando as proteínas comuns e exclusivas entre as frações invertida ligantes (2IL) e invertida não ligantes (1INL) da cromatografia líquida de afinidade do veneno da serpente *Bothrops jararaca* frente as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

Dentre as sete toxinas e seus derivados comuns entre as frações ligantes e não ligantes do veneno da serpente *Bothrops jararaca* frente as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B (Figura 14), estão a subunidade alfa de Snaclec Botrocetina, uma enzima tipo trombina, semelhante a trombina que atua na coagulação do fibrinogênio, além de atuar na agregação plaquetária (Rosa, 2018). Outras toxinas comuns são as metaloproteinases/desintegrina, representando 33,6% das proteínas existentes nos venenos botrópicos. Elas fazem parte de um grupo de enzimas cuja função é colagenolítica, fibrinogenolítica, hemorrágica e pró-inflamatória, além disso também atuam no processo pró-coagulante do veneno (Rosa, 2018).

É sabido que nos acidentes botrópicos há diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) e quadros hemorrágicos, sendo estes sintomas típicos após o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. A redução de plaquetas causa distúrbios hemostáticos, uma vez que as células são agentes fundamentais no processo de estabilização da hemostasia (Rosa, 2018). Adicionalmente, a quebra da manutenção da integridade vascular (hemorragias) também são sintomas severos neste tipo de acidente (Franco, 2001). Diante destas observações, reforçamos o incentivo do Ministério de Saúde do Brasil ao uso do antiveneno crotálico na ausência de antiveneno específico não conjugado, quando possível (Ministério da Saúde, 2021).

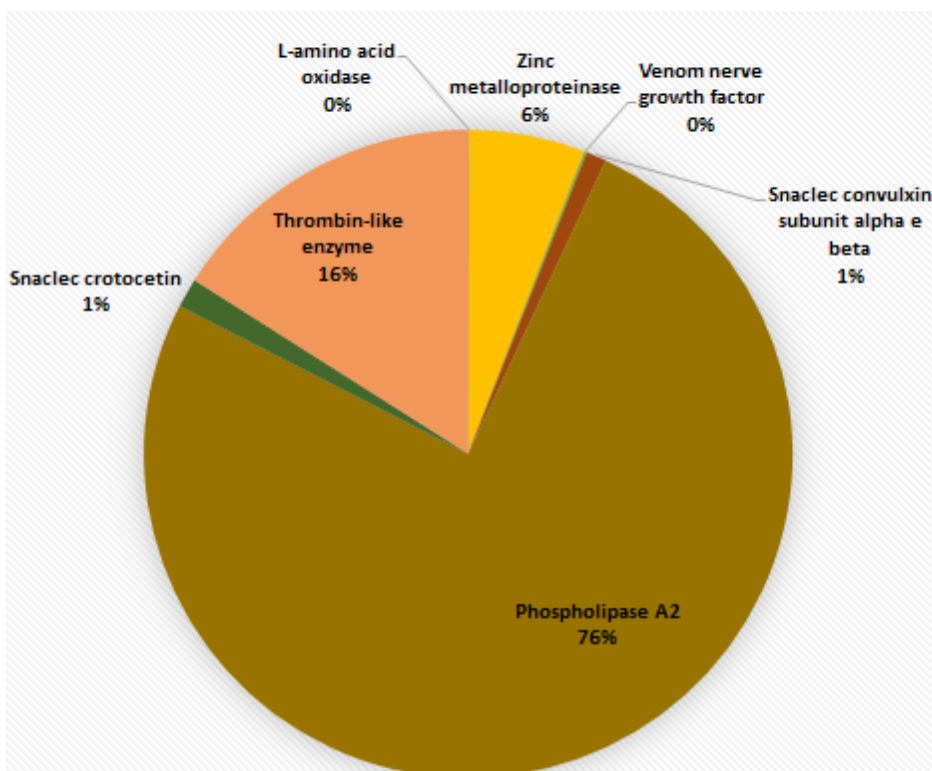


Figura 15: Perfil proteico em % da fração cromatográfica ligante (LC) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

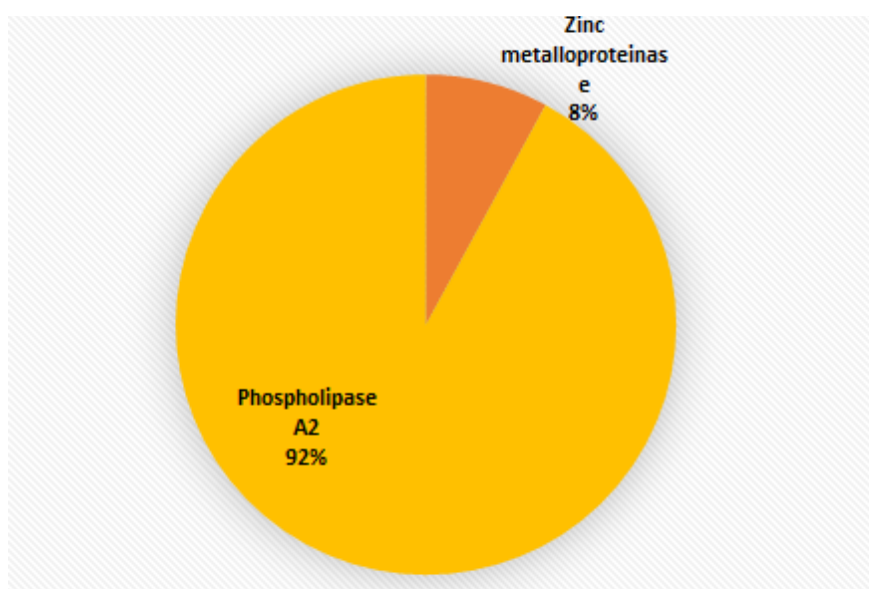


Figura 16: Perfil proteico em % da fração cromatográfica não ligante (NLC) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

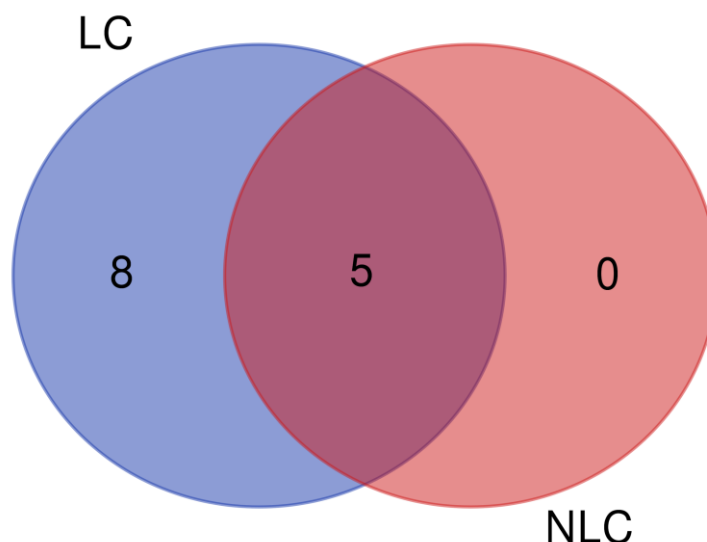


Figura 17: Diagrama de Venn evidenciando as proteínas comuns e exclusivas entre as frações ligantes (LC) e não ligantes (NLC) da cromatografia líquida de afinidade do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* frente as imunoglobulinas do antiveneno crotálico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

Já as análises de espectrometria de massas sobre a composição da fração das toxinas imunoreativas/ligantes (LC) (Figura 15) e das toxinas contidas na fração não-imunreativas/não ligantes (NLC) (Figura 16) e comparação das mesmas (Figura 17), foi possível observar que, o antiveneno crotálico possui um poder de interação antígeno-anticorpo de melhor resposta. Das 13 moléculas identificadas nestas amostras e todas ficaram retidas na resina, apontando assim, sua imunoreatividade específica. Mas, 5 moléculas estruturalmente semelhantes às moléculas que apresentaram imunoreatividade com a resina, também foram identificadas na fração não ligante. Dentre elas, 92% foram identificadas como fosfolipases A_2 .

Apesar da grande variedade de compostos moléculas complexas e proteínas bioativas existentes nos venenos das serpentes, a fosfolipase A_2 é um dos compostos tóxicos em maioria entre os venenos. Tratam-se de enzimas catalizadoras da hidrólise dependente de Ca^{2+} da ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídeos, que libera ácidos graxos e lisofosfalipídeos, além disso atuam no metabolismo de lipídios e em uma variedade de funções biológicas, como a regulação do sono, resposta imune, inflamação e percepção da dor. Essas fosfolipases possuem 5 tipos de enzimas diferentes, sendo elas: i) as PLA_2 s secretadas; ii) as citosólicas (c PLA_2); iii) as independentes de Ca^{2+} (i PLA_2); iv) as acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH); v) as lisossomais. Ao analisar os venenos das serpentes, observou-se que as fosfolipases presentes pertenciam aos grupos I e II, onde é possível identificar a família das

serpentes *Elapidae* (*Elapinae* e *Hydrophinae*) no grupo I, enquanto em venenos de serpentes pertencentes a família *Viperidae* (*Viperinae* e *Crotalinae*) no grupo II, tendo assim estruturas semelhantes entre si (Teixeira, 2009).

Quanto a capacidade de neutralização dos antivenenos de cada um dos venenos das respectivas serpentes, pode-se dizer as perspectivas de melhora do quadro clínico do paciente são diretamente influenciados não somente pelo momento em que é aplicado no paciente (tempo entre o acidente e a aplicação do antiveneno), mas também na dosagem em que o mesmo é aplicado. Estudos com camundongos após a aplicação intramuscular de venenos de serpentes, mostraram que após 30 minutos do envenenamento ofídico, a dosagem do antiveneno deveria ser três vezes maior que o recomendado clinicamente para que a etapa de neutralização fosse completa. Uma dose de anticorpos (antiveneno) aplicada de forma imediata teve o poder de neutralizar totalmente as toxinas circulantes, mas após trinta minutos sua eficácia diminuiu drasticamente não tendo mais a mesma capacidade (Jorge e Ribeiro, 1997). Neste contexto, nossos estudos sugerem que uma possível suplementação de anticorpos específicos anti-fosfolipases no antiveneno crotálico poderia talvez desencadear num processo de neutralização mais rápida, uma vez que, nossos ensaios analíticos mostraram a abundância de toxinas do tipo fosfolipase A₂ no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* não retidas na resina CNBr cujo anticorpos anti-fosfolipases do antiveneno crotálico não tinham ligantes suficientes livres para reterem/interagirem com esta toxina majoritária do veneno crotálico.

Levando em consideração que 12 mg de imunoglobulinas do antiveneno crotálico foram acopladas na resina CNBr e 6 miligramas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foram submetidos nesta cromatografia de afinidade, sugere-se que estas moléculas presentes na fração não ligante não tivessem sítios ativos suficientes na resina para se acoplar, já que se mostraram imunoreativas e também estão presentes na fração ligante. Mais estudos podem e devem ser realizados no intuito de avaliar se futuros protótipos de aprimoramento/desenvolvimentos de antivenenos crotálicos deverão conter um acréscimo da toxina fosfolipase A₂ no pool de imunização dos animais soroprodutores do antiveneno crotálico brasileiro.

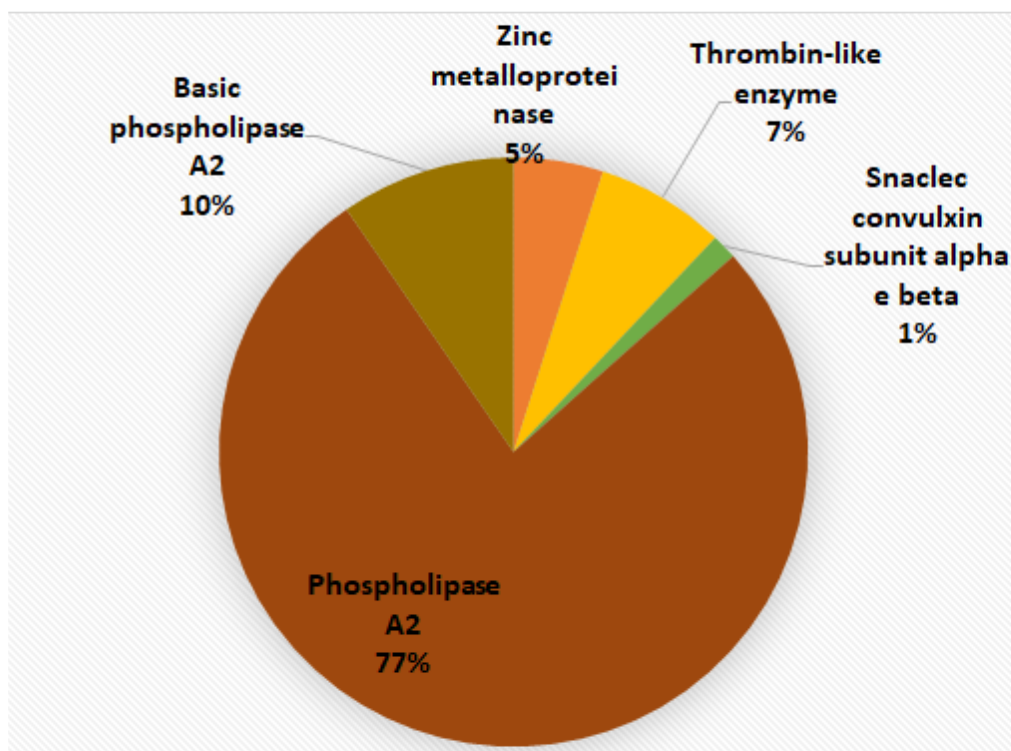


Figura 18: Perfil proteico em % da fração cromatográfica invertida não ligante (3INL) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que não se interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

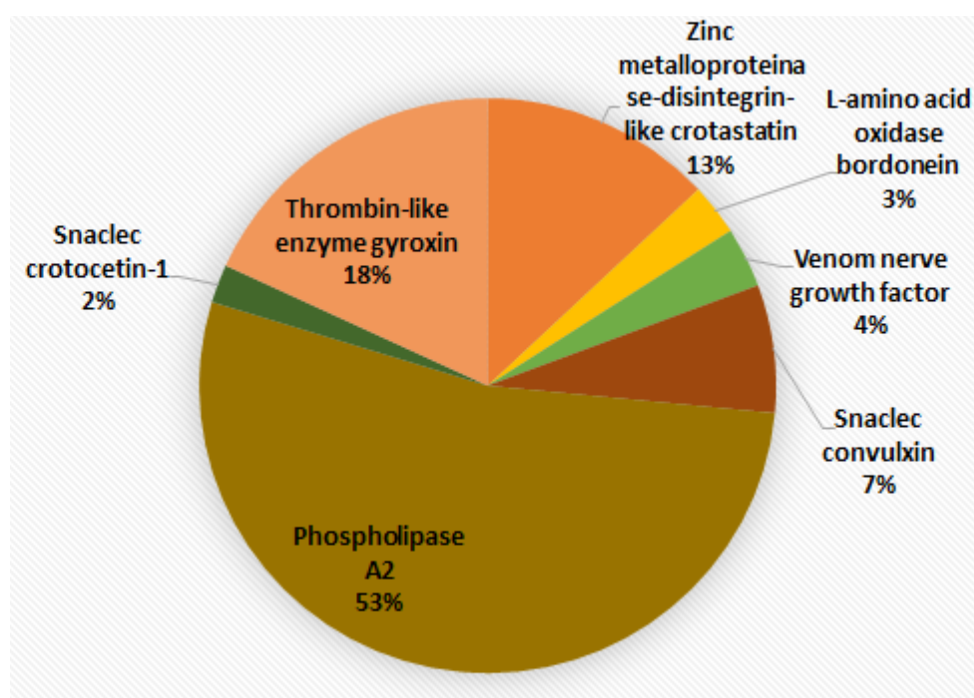


Figura 19: Perfil proteico em % da fração cromatográfica invertida ligante (4IL) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que se interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

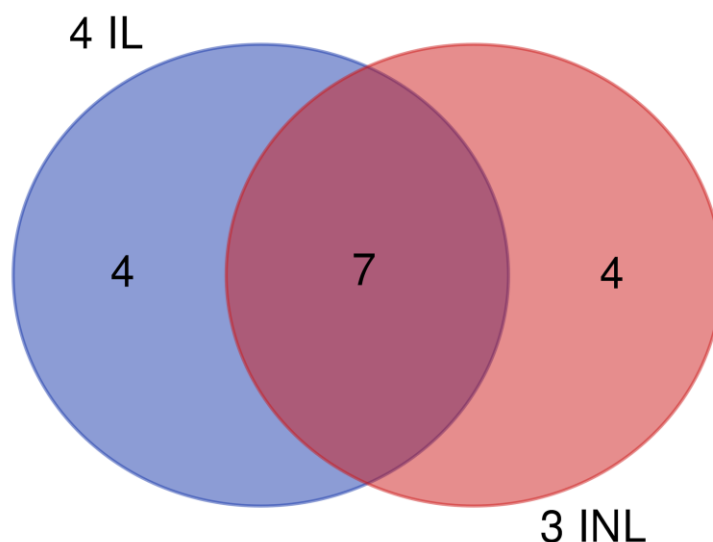


Figura 20: Diagrama de Venn evidenciando as proteínas comuns e exclusivas entre as frações invertida ligantes (4IL) e invertida não ligantes (3INL) da cromatografia líquida de afinidade do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* frente as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B.

Quando propusemos a submissão do veneno crotálico na resina contendo as imunoglobulinas do antiveneno botrópico, evidenciamos que a fração das toxinas não-imunoreativas (3INL) (Figura 18), apresenta uma grande variedade de toxinas do veneno crotálico, sendo que este fato já era esperado devido a inespecificidade frente ao antiveneno botrópico. Em contrapartida, 7 moléculas com atividades biologicamente semelhantes apresentaram interações com o antiveneno botrópico (fração 4IL) (Figura 19). A Figura 20 evidencia estas semelhanças e diferenças quando comparadas as frações 3INL e 4IL.

A maioria dessas proteínas presentes nos venenos crotálicos interferem na manutenção da hemostasia e na cascata de coagulação, além de exercerem atividades neurotóxicas (Rosa, 2018; Fernandes, 2013) como por exemplo: a subunidade beta de senaclec convulxina, encontrado em algumas espécies de cascavéis, sendo um potente ativador plaquetário (Carvalho, 2010); a metaloproteinase de zinco/desintegrina-like CdtV1, tratando-se de metaloproteinase prejudicial à hemostasia (Rosa, 2018); a serinoprotease giroxina B1.4, é um componente encontrado nos venenos de cascavéis responsável por causar efeitos corporais como hipoatividade seguida de arreflexia, opistotonia e imobilidade, além de ser uma serinoprotease tipo trombina sendo responsável pela ação coagulante do veneno (Carvalho, 2010); e, a subunidade básica da crotoxina (CBa2), a qual é uma fosfolipase A2, tendo como principais atividades biológicas: miotóxicas, citotóxicas e neurotóxicas (Carvalho, 2010). Já a

crotoxina é uma neurotoxina heterodimérica não covalente constituída de duas subunidades: uma fosfolipase A2 ativa (Subunidade básica) e uma proteína chaperona, denominada crotapotina. (subunidade ácida). Esta subunidade ácida é composta por três cadeias peptídicas conectadas por sete pontes dissulfeto, alfa, beta e gama (de Oliveira et al, 2017).

Neste contexto, por meio de um olhar minucioso nas toxinas presentes na fração cromatográfica não-ligante (3INL) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* que não interagiram com as imunoglobulinas do antiveneno botrópico comercial acoplados na resina CNBr Sepharose 4B, evidenciamos que, cerca de 77% das toxinas não imunorreativas, pertencem a um único grupo: subunidade ácida da crotoxina, a toxina crotapotina. Essa molécula é formada por três cadeias de peptídeos ligados por pontes de dissulfeto (Oliveira, 2017). Portanto, no momento em que ela é reduzida, essas subunidades são separadas e analisadas pelos métodos proteômicos, com isso, apesar de ser um achado é inédito e de elevado valor científico, mais estudos são necessários para afirmar essa relação de forma direta entre o peptídeo e as moléculas presentes nas colunas, visto a importância de se trabalhar com anticorpos específicos em testes diagnósticos que possam falar por um determinado tipo de envenenamento ofídico, ou seja, moléculas candidatas a distinguirem um envenenamento crotálico de um botrópico.

Para que a identificação do tipo do acidente ofídico seja exata, seria necessário saber sobre qual é a espécie da serpente que acometeu o acidente ofídico, além de informações sobre a quantidade de veneno injetado no corpo da vítima, idade, condições de saúde, resposta imune da vítima e a rápida administração de anticorpos específicos (antiveneno) para um tratamento bem sucedido (Puzari et al, 2020). Mas, como dito anteriormente, atualmente, não existe um teste diagnóstico rápido e específico capaz de identificar qual foi o tipo de serpente brasileira que causou o acidente no Brasil. Os métodos diagnósticos aplicados atualmente ocorrem através das informações fornecidas pela vítima e/ou testemunha, além dos sintomas sistêmicos e/ou locais do envenenamento, exames bioquímicos de acompanhamento como análise de urina e testes de coagulação (Puzari et al, 2020).

Neste contexto, torna-se uma necessidade primordial, principalmente nos países tropicais onde o maior número de acidentes ofídicos ocorre, o desenvolvimento de testes diagnósticos que apresentem resultados rápido e específico em até 30 minutos, considerado o tempo de estabilização do paciente antes do início do tratamento com um antiveneno. Assim, a probabilidade de salvar a vida do paciente aumentam, além de evitar o tratamento com antivenenos errôneos, não específicos, tornando o tratamento ineficiente (Puzari et al, 2020).

Durante décadas, muitos métodos analíticos foram desenvolvidos e aperfeiçoados para o diagnóstico de envenenamentos animais como os ensaios de ELISA, ensaios de aglutinação, radioimunoensaios, PCR, ensaios bioquímicos como quantificação de PLA₂, ensaios de imunoreatividade *Dot blot* e *western blotting* pcr, imunossensores entre outros (Puzari et al, 2020). Porém, a maior parte destes métodos/ensaios já utilizados, ainda não conseguiram ser inseridos numa rotina clínica por serem demorados, por serem custosos ou ainda por apresentarem dificuldades no acesso a equipamentos ou pela ausência de mão de obra qualificada. Assim, nosso estudo traz uma importante contribuição do ponto de vista de apontar moléculas candidatas a serem utilizadas na produção de anticorpos policlonais/monoclonais a partir destas moléculas para o desenvolvimento de futuros testes rápidos para distinguir o tipo de acidente ofídico brasileiro.

5 CONCLUSÃO

Por se tratar de um experimento inovador, ainda há muito o que se estudar e aprimorar para chegar a produtos e processos mais eficazes/específicos, desde metodologias combinatórias e até mesmo moléculas/toxinas importantes para o desenvolvimento de futuros testes diagnósticos e até mesmo o melhoramento de antivenenos comerciais.

Apesar da grande variabilidade e dos fatores que influenciam a composição dos venenos das serpentes, os venenos são misturas ricas em moléculas capazes de fornecer protótipos e/ou informações relevantes para o desenvolvimento de novos fármacos, novos tratamentos e testes que sejam benéficos a saúde humana.

Com os resultados obtidos em nosso estudo será possível, em perspectivas futuras, trabalhar as sequências primárias de toxina em potencial de distinguir os envenenamentos botrópicos dos crotálicos, a fim de avaliar uma propícia produção dos anticorpos policlonais para o desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido e específico, haja visto que uma possível molécula candidata para o teste foi identificada, sendo ela estruturalmente singular/exclusiva da peçonha crotálica, a Crotapotina. Além disso, observou-se uma interação das proteínas do veneno botrópico com anticorpos presentes no seu respectivo antiveneno, o que era esperado, por ser um soro específico, mas há também moléculas de origem peptídica do veneno de jararaca que não foram neutralizadas pelo antiveneno botrópico. Do mesmo modo que, quando analisamos os resultados dos ensaios antivenômicos crotálicos, identificamos que a fosfolipase A₂, (molécula relacionada ao metabolismo lipídico, regularização do sono, resposta imune,

inflamação, percepção da dor), não são completamente neutralizadas pelo antiveneno crotálico, o que nos leva a pontos importantes em questões de estudos sobre a composição das peçonhas e do aperfeiçoamento dos antivenenos comerciais já existentes.

Em vista disso, as perspectivas são para que a inclusão de um teste diagnóstico como esse trará muitos benefícios não somente para o paciente a possibilidade um diagnóstico preciso e rápido, mas será de grande importância para que se inicie o tratamento específico, podendo evitando sequelas e até mesmo, os óbitos decorrentes dos acidentes ofídicos brasileiros. Além disso, a inclusão destes testes diagnósticos poupará impactos econômicos sofridos pelos sistema de saúde brasileiro atualmente, com os gastos/investimentos elevadíssimos no tratamento dos pacientes internados, seja pela demora na identificação do tipo de acidente ofídico, na administração do antiveneno errôneo e na quantidade errada frente a gravidade do acidente, nas complicações decorrentes que levam ao uso de Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sessões de hemodiálise e cirurgias reparadoras no paciente. Cabe ressaltar que, propostas de testes diagnósticos estão inclusas nas metas propostas pela Organização Mundial da Saúde na redução de 50% dos acidentes envolvendo animais peçonhentos até o ano de 2030, visto que o Brasil é um dos países que mais possuem acidentes ofídicos no mundo.

6. REFERÊNCIAS

Amazonas DR, Portes-Junior JA, Nishiyama-Jr MY, Nicolau CA, Chalkidis HM, Mourão RHV, Grazziotin FG, Rokyta DR, Gibbs HL, Valente RH, Junqueira-de-Azevedo ILM, Moura-da-Silva AM. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. *J Proteomics*.181:60-72, 2018.

Araújo SCM, Andrade EB. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no estado do Piauí, Nordeste do Brasil, entre os anos de 2003 e 2017. *Pesquisa e Ensino em Ciências Exatas e da Natureza*. 3 (2): 154–165, 2019.

Bickler PE. Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling Pathways. *Toxins (Basel)*.;12(2):68, 2020.

Bradford MM. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, et al. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. *Nature protocols*.11(1):102-117, 2016.

Carvalho, D. Efeitos comportamentais do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e do soro anticrotálico em Ratos Wistar. São Paulo, 2010. Disponível em:<
https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41135/tde-21022011-151902/publico/Diego_simp.pdf> Acesso em: 05 de fev de 2022

Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett*. 583(11):1736-43, 2009.

Calvete JJ, Sanz L, Cid P, de la Torre P, Flores-Díaz M, Dos Santos MC, Borges A, Breimo A, Angulo Y, Lomonte B, Alape-Girón A, Gutiérrez JM. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J Proteome Res*. 9(1):528-44, 2010.

Casewell NR, Jackson TNW, Laustsen AH, Sunagar K. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends Pharmacol Sci.* 41(8):570-581, 2020.

Casewell NR, Wagstaff SC, Wüster W, Cook DA, Bolton FM, King SI, Pla D, Sanz L, Calvete JJ, Harrison RA. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;111(25):9205-10, 2014.

Chippaux JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ.*; 76(5):515-24, 1998.

Costa, S.R. PROSPECÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS POTENCIALIZADORES DE BRADICININA (BPPs) DA PEÇONHA DE *BOTHROPS sp.* Brasília, 2019 Disponível em:<
https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/35883/1/2019_SamuelRibeiroCosta.pdf> acesso em: 04 de fev de 2022.

Cunha, E. M.; martins, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *bothrops* e *crotalus* – uma revisão. 2012. Disponível em: <https://www.fira.edu.br/revista/reec_vol2_num2_pag21.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2024.

da Silva-Júnior LN, Abreu LS, Rodrigues CFB, Galizio NDC, Aguiar WDS, Serino-Silva C, Dos Santos VS, Costa IA, Oliveira LVF, Sant'Anna SS, Grego KF, Tanaka-Azevedo AM, Rodrigues LNDS, de Moraes-Zani K. Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 26:e20200016, 2020.

Dias GS, Kitano ES, Pagotto AH, Sant'anna SS, Rocha MM, Zelanis A, Serrano SM. Individual variability in the venom proteome of juvenile *Bothrops jararaca* specimens. *J Proteome Res.* 12(10):4585-98, 2013.

El-Corab, MDMK. Caracterização da crotamina e seu efeito sobre a contratilidade da musculatura lisa do ducto deferente de rato. São Paulo, 2015.

Farias IB, Morais-Zani K, Serino-Silva C, Sant'Anna SS, Rocha MMTD, Grego KF, Andrade-Silva D, Serrano SMT, Tanaka-Azevedo AM. Functional and proteomic comparison of *Bothrops jararaca* venom from captive specimens and the Brazilian Bothropic Reference Venom. *J Proteomics*. 174:36-46, 2018.

Fernandes, C. A. H. Estudos estruturais com fosfolipases A2 isoladas de venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* Botucatu, 2013. Disponível em : <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/108406/000734578.pdf;jsessionid=C0DC74EB9145B87E9F33629D5025B800?sequence=1>>. Acesso em: 04 de fev de 2022.

Ferraz CR, Arrahman A, Xie C, Casewell NR, Lewis RJ, Kool J, Cardoso FC. Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 7: 218, 2019.

Franco, R.F. FISILOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE. *Medicina*, Ribeirão Preto, SimpÔsio: HEMOSTASIA E TROMBOSE 34: 229-237, jul./dez. 2001.

Fusco LS, Neto EB, Francisco AF, Alfonso J, Soares A, Pimenta DC, Leiva LC. Fast venom analysis of *Crotalus durissus terrificus* from northeastern Argentina. *Toxicon X*. 7:100047, 2020.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Lomonte B, Angulo Y, Fox JW. Tissue pathology induced by snake venoms: how to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? *Toxicon*.;55(1):166-70, 2010.

Gutiérrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura Á, Vargas M, Villalta M, Sánchez A, Sanz L, Lomonte B, León G, Calvete JJ. Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins (Basel)*.;9(5):163, 2017.

Gutiérrez JM, Warrell DA, Williams DJ, Jensen S, Brown N, Calvete JJ, Harrison RA; Global Snakebite Initiative. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis*.;7(6):e2162, 2013.

Jackson TN, Koludarov I, Ali SA, Dobson J, Zdenek CN, Dashevsky D, Op den Brouw B, Masci PP, Nouwens A, Josh P, Goldenberg J, Cipriani V, Hay C, Hendrikx I, Dunstan N, Allen L, Fry BG. Rapid Radiations and the Race to Redundancy: An Investigation of the Evolution of Australian Elapid Snake Venoms. *Toxins (Basel)*. 8(11):309, 2016.

Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, Savioli L, Lalloo DG, de Silva HJ. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.*;5(11):e218, 2008.

Knudsen C, Jørgensen JA, Føns S, Haack AM, Friis RUW, Dam SH, Bush SP, White J, Laustsen AH. Snakebite Envenoming Diagnosis and Diagnostics. *Front Immunol.*12:661457, 2021.

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

Matos RR, Ignotti E. Incidência de acidentes ofídicos por gêneros de serpentes nos biomas brasileiros. *Ciênc. Saúde Coletiva* 25(7):2837-2846, 2020.

Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH et al. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 42-70, 2009.

Ministério da Saúde. Acidentes com animais peçonhentos aumentam no verão. Disponível em:<<https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sul/hu-ufsc/comunicacao/noticias/acidentes-com-animais-peconhentos-aumentam-no-verao>> Acesso em: 04 de jan 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica animais peçonhentos - nº 01/2021 – ciatoxes/nepaint/gevs/sesa. 2021 Disponível em:<https://ciatox.es.gov.br/Media/toxcen/Nota%20Tecnica/Nota_t%C3%A9cnica_animais_pe%C3%A7onhentos_n01.2021.pdf>. Acesso em: 04 de fev de 2022.

Neto, A.C. Estudo da variação ontogenética do veneno de *Bothrops atrox* por análise proteômica e peptidômica: Identificação de peptídeos potencializadores de bradicinina. Porto Velho, 2013. Disponível em:< <https://core.ac.uk/download/pdf/294852903.pdf>> acesso em: 05 de fev de 2022.

de Oliveira LA, Ferreira RS Jr, Barraviera B, de Carvalho FCT, de Barros LC, Dos Santos LD, Pimenta DC. *Crotalus durissus terrificus* crotopotin naturally displays preferred positions for amino acid substitutions. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 23:46, 2017.

de Oliveira LA. ESTUDO DA VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DA CROTAPOTINA NO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* NA REGIÃO DE BOTUCATU – SÃO PAULO. Botucatu, 2017. Disponível em< https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/151406/oliveira_la_me_bot.pdf?sequence=3&isAllowed=y> Acesso em: 21 de fev de 2022.

Portal do Butantan. Entenda por que a OMS quer reduzir pela metade os casos de envenenamento por picada de cobra até 2030. 2023. Disponível em:<<https://butantan.gov.br/noticias/entenda-por-que-a-oms-quer-reduzir-pela-metade-os-casos-de-envenenamento-por-picada-de-cobra-ate-2030#:~:text=O%20envenenamento%20por%20picada%20de,a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20Mundial%20da%20Sa%C3%BAde.>>>. Acesso em: 2 fev. 2024.

Puzari, U. Mukherjee, A. K. Recent developments in diagnostic tools and bioanalytical methods for analysis of snake venom: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, v 1137, p. 208-224, nov 2020.

Resende, L. M. et al. Toxinas de serpentes: protótipos de fármacos & patentes? *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 6, p. 23675–23691, nov. 2021.

Rosa, J. G. Efeito do veneno de serpentes *Bothrops jararaca* sobre a agregação e secreção de plaquetas humanas e de camundongos. São Paulo, 2018. Disponível em :< <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5167/tde-15012019-082126/publico/JaquelineGomesRosaVersaoCorrigida.pdf>> acesso em: 04 de fev de 2022.

Sanson, A.L. Caracterização estrutural e funcional de uma proteína isolada do plasma de serpentes *bothrops jararaca*, relacionada ao cininogênio de mamíferos. São Paulo, 2012. Disponível em:< <https://bibliotecadigital.butantan.gov.br/arquivos/126/126.pdf>> Acesso em: 04 de fev de 2022.

SINAN. Sistema de informação de agravo de notificação. Acidente por animais peçonhentos. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>> Acesso em: 04 de jan 2022.

Snake Venom Detection Kit (SVDK). Manual de aplicações Disponível em: http://www.seqirus.com.au/docs/129/765/SVDK_Method_Summary,0.pdf. Acesso em 10 de dezembro 2021.

Teixeira, S.S. Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A2 ácida isolado de veneno de *Bothrops pirajai*. Ribeirão Preto, 2009. Disponível em:<<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-10032009-162342/publico/SabrinaSchaafTeixeira.pdf>> Acesso em: 04 de fev de 2022

World Health Organization. Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control. SBN 978-92-4-151564-1, 54pp, 2019.

World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixty-Ninth Report, World Health Organization, 1e251 pp, 2019.

Zelani A, Tashima AK, Pinto AF, Paes Leme AF, Stuginski DR, Furtado MF, Sherman NE, Ho PL, Fox JW, Serrano SM. Bothrops jararaca venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. Proteomics. 11(21):4218-28, 2011.