

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

PATTY KARINA DOS SANTOS

PROTEOMA DA PEÇONHA DE *LACHESIS MUTA RHOMBEATA*

**SÃO CARLOS
2013**

PROTEOMA DA PEÇONHA DE *LACHESIS MUTA RHOMBEATA*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

PATTY KARINA DOS SANTOS

PROTEOMA DA PEÇONHA DE *LACHESIS MUTA RHOMBEATA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^ª Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

**SÃO CARLOS
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S237pp

Santos, Patty Karina dos.
Proteoma da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* /
Patty Karina dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2013.

1. Biologia molecular. 2. Proteômica. 3. *Lachesis muta
rhombeata*. 4. Peçonha. 5. Espectrometria de massas. I.
Título.

CDD: 574.88 (20^a)

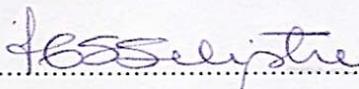
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

“Proteoma da peçonha de *Lachesis muta rhombeata*”.

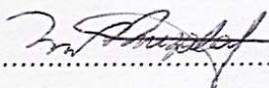
Dissertação de Mestrado de
PATTY KARINA DOS SANTOS

Banca Examinadora

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo


.....

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf


.....

Profa. Dra. Karla de Castro Figueiredo


.....

We are one! My family, my friends and I.

AGRADECIMENTOS

Essa é a parte mais divertida da escrita da dissertação. É o local onde podemos agradecer a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, nos acompanharam durante a caminhada árdua do Mestrado.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais (Cassia e Marco) e minha irmã (Giuliane) por todo o apoio durante esses anos. Quem me conhece bem sabe que o final de 2011 e o ano de 2012 foram difíceis para mim. Como me concentrar com pessoas importantes na minha vida sofrendo? Como continuar em frente quando na verdade você gostaria de se jogar numa cama ou num sofá e ficar lá o dia todo depressiva e chorando? Porque eu pensei milhares de vezes em jogar tudo para o alto e desistir... sim, desistir. É projeto que não vai para frente, é pressão por todos os lados, é falta de vontade de prosseguir... mas, eu continuei... consegui pensar e usar outro projeto para continuar a caminhada e, apesar de todas as dificuldades, ele deu resultados. E se minha família não estivesse ao meu lado, me incentivando, brigando comigo, eu não estaria agora escrevendo estas palavras.

Segundo, eu gostaria de agradecer a minha orientadora pelo incentivo, por ter-me aceitado para o Mestrado, por sempre falar que eu sou a mais “bióloga” do grupo. Realmente, eu amo essas serpentes... fascino-me com esses répteis sem membros, um tanto perigosos, mas fonte de inesgotáveis fármacos. Obrigada, Profa. Heloísa, por tudo. Agradeço também a todo o grupo do LBBM (às muitas meninas e poucos meninos!). Não citarei o nome de todos (tenho medo de esquecer alguém!!!), mas cada um de vocês sabe a ajuda e o incentivo que me deram e eu agradeço do fundo do coração!!! Obrigada também à Profa. Eliane e ao Prof. Labate por toda a hospitalidade em seus respectivos laboratórios e por toda a ajuda disponibilizada para que eu pudesse realizar grande parte da metodologia empregada neste trabalho (obrigada às equipes de vocês que me trataram muito bem nos dias em que eu fiquei em Ribeirão Preto e em Piracicaba). Obrigada ao apoio financeiro do CNPq. Com ele eu consegui trocar de notebook para fazer melhores análises e escrever esta dissertação.

Gostaria de agradecer também ao meu padrinho e madrinha e todos os amigos por toda a incrível força. Sim, uma força maravilhosa que me manteve em pé e com fé e esperança. Muito obrigada!!!

Um grande obrigada a todos os meus amigos virtuais que são incrivelmente importantes na minha vida. Quantas vezes eu chorei, dei risadas, fiz maluquices com eles?

Muitas. E pude conhecer alguns pessoalmente em 2012. Foi maravilhoso!!! Obrigada à Lívia, May, Poli, Paula, Akira, Rafa, Ana, Gab, Bruna, Kitty, Carly, Heitor, Deise, Janine, Lene-
unnie por todo o apoio... por todos os elogios, as brincadeiras, as risadas, o choro, a união, as
declarações de amor kkkkkkkkkkkkkkkkkkk amo todas!!! Tenho que agradecer também à
querida Jane. Saiba que você é especial para mim... que adoro nossas conversas, seus
conselhos, as trocas de figurinhas de livros ^^ o/ vai ter que me aguentar novamente esse
ano!!! Claro que tenho que agradecer ao kpop, minha trilha sonora durante estes últimos anos,
principalmente ao Joonie, SeungHo, G.O., Chandungui, Mir, Baozi, Chen, D.O., Bacon,
Chany, Suho, Yixing libriano, Tao, Kris, Kkamjong... e mais especialmente ao Luhan e ao
Sehun... sério... vocês não sabem a felicidade que trouxeram na minha vida... fora o treino de
inglês que tenho ao ler histórias sobre vocês. Um grande aprendizado!!! xDxD

Por fim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que passaram na minha vida
nestes últimos dois anos... muito obrigada!!! E não tenham medo de serpentes! Elas são lindas
__ o/

RESUMO

A serpente *Lachesis muta rhombeata* (Viperidae), popularmente conhecida como surucucu pico-de-jaca, é uma subespécie de *Lachesis muta* endêmica na Mata Atlântica brasileira, podendo ser encontrada do Ceará até o Rio de Janeiro. O gênero *Lachesis* apresenta uma peçonha complexa que engloba diferentes proteínas que possuem uma ampla variedade de atividades biológicas, como por exemplo, aquelas que afetam os fatores da coagulação sanguínea, agem na fibrinólise, provocam uma ação inflamatória no local da picada, e induzem um choque hipotensivo. Com o auxílio de técnicas proteômicas e de Bioinformática, este projeto teve como objetivo principal analisar o proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata*, identificando as principais famílias proteicas presentes. Para isso, 200µg da peçonha desta serpente foram aplicados em géis bidimensionais-2D. As proteínas obtidas foram extraídas dos géis, tratadas, e posteriormente identificadas e analisadas por meio de espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF). Os arquivos brutos provenientes dessas análises foram aplicados no programa MASCOT utilizando para a identificação proteica o banco de dados *SwissProt* e como especificação taxonômica o banco de dados SNAKES contido no site do NCBI. Foram identificadas 11 famílias proteicas: PLA₂s (37,93%), inibidores de proteases (22,41%), proteínas de sinalização intracelular (13,79%), NGFs (5,17%), metaloproteases (3,45%), fatores associados à DDB1 e CUL4 (3,45%), oxidoredutases (3,45%), proteínas de transdução de sinal (1,72%), componentes do complemento (1,72%), proteínas *NipSnap* (1,72%) e proteínas lin-7 (1,72%), das quais a grande maioria é de função metabólica e ajuda na difusão/entrada dos componentes tóxicos no organismo da vítima/presa. Cerca de 1-5mg da mesma peçonha também foram analisados por meio de FPLC e sequenciamento proteico e as proteínas obtidas foram identificadas por meio de busca no banco de dados nr (*non-redundant protein sequences*) do NCBI utilizando a ferramenta blast-p. As seguintes famílias proteicas foram encontradas: serinoproteases (30,03%), metaloproteases (24,17%), BPPs (19,64%), PLA₂s (14,95%), lectinas tipo C (1,94%), LAAOs (1,40%) e metaloendopeptidases (0,73%), ressaltando a toxicidade da peçonha. Os dois resultados obtidos foram comparados com proteomas de outras serpentes do gênero *Lachesis* encontrados na literatura. Observou-se que há uma grande similaridade entre os proteomas das peçonhas deste gênero, mas que alguns componentes proteicos são diferenciais e assim, podem ajudar na taxonomia destas serpentes, mantendo-as em suas respectivas espécies e subespécies. Além disso, a peçonha também foi analisada por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) para avaliar se o espécime em estudo era um neonato, um juvenil ou um adulto. A presença de uma proteína similar à mutalisina II (metaloprotease) confirmou que a *L. m. rhombeata* utilizada neste estudo era uma adulta. O conhecimento do proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* auxiliará (1) os estudos envolvendo a Sistemática do gênero e (2) a produção de novos fármacos que poderão ser desenvolvidos para o tratamento de diversas doenças.

Palavras-chave: *Lachesis muta rhombeata*. *Lachesis*. Proteoma. Eletroforese bidimensional. Espectrometria de massas. FPLC. Sequenciamento proteico. blast-p. Peçonha de serpente.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estátua da “Grande Deusa” grega Diktyнна segurando uma serpente em cada mão. As serpentes representam a autorrenovação e o rejuvenescimento.....	2
FIGURA 2. Representação do ouroboro asteca simbolizado por uma serpente mordendo a própria cauda.....	2
FIGURA 3. Quadro “Orestes perseguido pelas Fúrias” por Adolph William Bouguereau em 1862.....	3
FIGURA 4. Representações do caduceu de Mercúrio (1), do bastão de Esculápio (2) (ambos representando o símbolo da Medicina) e do cálice de Hígia (3) representando o símbolo da Farmácia.....	4
FIGURA 5. Modos reprodutivos das serpentes: oviparidade (à esquerda) e viviparidade (à direita).....	6
FIGURA 6. Imagens do varanídeo <i>Lanthanotus borneensis</i> (acima) e do mosassauro <i>Hainosaurus bernardi</i> (abaixo) representando os possíveis ancestrais das serpentes.....	7
FIGURA 7. Crânios de serpentes mostrando os tipos de dentição existentes: áglifa (acima do lado esquerdo), opistóglifa (acima do lado direito), proteróglifa (abaixo do lado esquerdo) e solenóglifa (abaixo do lado direito).....	9
FIGURA 8. Glândula venenífera de um viperídeo. O epitélio secretor libera a peçonha que fica estocada no lúmen da glândula e está pronta para ser utilizada durante a picada. Durante o ataque, a contração do músculo compressor da glândula força a peçonha pelos ductos para dentro da presa.....	12
FIGURA 9. Dermonecrose extensiva em uma garota, três semanas após ela ter sido picada por uma serpente da espécie <i>Naja ashei</i> em Kilifi, no Quênia.....	15
FIGURA 10. Serpentes que causam alta incidência de envenenamentos na África, na Ásia e na América Latina. (A) <i>Echis ocellatus</i> (Viperidae, presente na Nigéria); (B) <i>Naja naja</i> (Elapidae, presente no Sri Lanka) e (C) <i>B. asper</i> (Viperidae, presente na Costa Rica).....	18
FIGURA 11. Casos de acidentes por serpentes ocorridos no Brasil entre 2000 e 2011, com o maior número de acidentes ocorrendo em 2011 (30.836). *Dados preliminares sujeitos a revisão (2010 e 2011).....	20
FIGURA 12. Total de casos de acidentes por serpentes por região do Brasil (Norte, Sudeste, Nordeste, Sul e Centro-Oeste). O gráfico engloba dados obtidos de 2000 a 2011.....	21
FIGURA 13. <i>Crotalus horridus</i> . Crotalidae.....	22

FIGURA 14. <i>Bothrops asper</i> . Viperidae.....	24
FIGURA 15. <i>Micrurus fulvius tener</i> . Elapidae.....	26
FIGURA 16. <i>Lachesis muta muta</i> . Viperidae.....	27
FIGURA 17. Um neonato de <i>Lachesis muta rhombeata</i> nascendo de um ovo.....	29
FIGURA 18. Distribuição geográfica do gênero <i>Lachesis</i> nas Américas Central e do Sul. <i>Ls</i> = <i>L. stenophrys</i> (delimitado em amarelo); <i>Lme</i> = <i>L. melanocephala</i> (delimitado em preto); <i>La</i> = <i>L. acrochorda</i> (delimitado em laranja); <i>Lmm</i> = <i>L. muta muta</i> (delimitado em verde) e <i>Lmr</i> = <i>L. muta rhombeata</i> (delimitado em roxo).....	30
FIGURA 19. Padrão corporal característico da serpente <i>Lachesis muta rhombeata</i>	31
FIGURA 20. Modelo da estrutura tridimensional de LmLAAO advinda de <i>Lachesis muta</i> . Os domínios de ligação ao FAD (rosa), de ligação ao substrato (azul) e α -helicoidal (bege) estão representados. A molécula de FAD está representada em amarelo e o sítio de glicosilação (Asn172) em vermelho.....	35
FIGURA 21. Estrutura tridimensional da vaina, um VEGF-F encontrado na peçonha de <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> , obtida por cristalografia de raios-X.....	39
FIGURA 22. Representação esquemática das classes de SVMPs. Os pontos de interrogação (?) indicam que o produto processado ainda não foi identificado na peçonha.....	40
FIGURA 23. Diagrama mostrando as integrinas e os diferentes motivos (tripeptídeo) de desintegrinas que se ligam a elas, bloqueando suas interações específicas a outros ligantes. Os heterodímeros de integrinas antagonizadas pelas desintegrinas de peçonhas de serpentes estão circulados.....	42
FIGURA 24. Diagrama mostrando algumas estratégias utilizadas para a análise de proteomas de peçonhas de serpentes.....	45
FIGURA 25. Perfil proteico (<i>spots</i>) da peçonha da serpente <i>L. m. rhombeata</i> obtido por eletroforese bidimensional-2D. A imagem mostra a replicata 1A. O gel foi corado com <i>Coomassie Phastgel Blue R 0,2%</i> . A faixa de pH varia de 3 a 10. Foi visualizado o marcador de massa molar: 29kDa = anidrase carbônica e 12kDa = citocromo C.....	55
FIGURA 26. Perfil proteico (<i>spots</i>) da peçonha da serpente <i>L. m. rhombeata</i> obtido por eletroforese bidimensional-2D. A imagem mostra a replicata 2A. O gel foi corado com <i>Coomassie Phastgel Blue R 0,2%</i>	56
FIGURA 27. Detecção e seleção dos <i>spots</i> proteicos da peçonha da serpente <i>L. m. rhombeata</i> por meio do <i>software ImageMaster 2D Platinum</i> . Replicata 1A contendo 58 <i>spots</i> (marcados de 1 a 58). A faixa de pH varia de 3 a 10. Foi visualizado o marcador de massa molar: 29kDa	

= anidrase carbônica e 12kDa = citocromo C. Os números 1, 2 e 3 (retângulos azuis) referem-se aos *land markers*.....57

FIGURA 28. Detecção e seleção dos *spots* proteicos da peçonha da serpente *L. m. rhombeata* por meio do *software ImageMaster 2D Platinum*. Replicata 2A contendo 53 *spots* (marcados de 61 a 113). A faixa de pH varia de 3 a 10. Foi visualizado o marcador de massa molar: 29kDa = anidrase carbônica e 12kDa = citocromo C. Os números 1, 2 e 3 (retângulos azuis) referem-se aos *land markers*.....58

FIGURA 29. Curva de correlação, obtida por meio do *software ImageMaster 2D Platinum*, entre as replicatas dos géis bidimensionais da peçonha de *L. m. rhombeata*. A correlação de 0,9827 indica uma alta reprodutibilidade experimental.....59

FIGURA 30. Placa própria para espectrômetros do tipo MALDI onde foram ‘espotadas’ as amostras peptídicas extraídas dos *spots* do gel bidimensional 1A da peçonha de *L. m. rhombeata*.....60

FIGURA 31. Principais famílias proteicas encontradas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. As fosfolipases A₂ são os principais componentes desta peçonha (37,93% do total).....67

FIGURA 32. Principais processos biológicos ocasionados pelas famílias proteicas encontradas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. A inflamação (15,13%), a miotoxicidade e degradação lipídica dos tecidos e membranas de presas (14,47%) e a inibição da agregação plaquetária (14,47%), acarretando em hemorragia no organismo da presa, são os principais eventos provocados pela picada de uma serpente da subespécie em estudo.....70

FIGURA 33. Perfil cromatográfico das proteínas da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* separadas por meio de FPLC. 1-5mg da peçonha foram aplicados em uma coluna *Vydac C18* (250 x 4,6) 5µm seguindo o protocolo de purificação proposto por Sanz et al. (2008). As frações foram coletadas e identificadas por sequenciamento N-terminal.....72

FIGURA 34. Principais famílias proteicas encontradas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo FPLC e sequenciamento N-terminal. Serinoproteases, BPPs, metaloproteases e fosfolipases A₂ são os principais componentes desta peçonha. Desconhecidos é referente às frações proteicas não coletadas durante o procedimento de FPLC.....76

FIGURA 35. Principais processos biológicos ocasionados pelas famílias proteicas encontradas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo FPLC e sequenciamento N-terminal. A fibrinólise (14,29%), a interferência na agregação plaquetária (11,90%), a

hipotensão (9,52%), a hemólise (9,52%) e a inflamação (9,52%) são os principais eventos provocados pela picada de uma serpente da subespécie em estudo, provocando distúrbios sanguíneos e choque hipotensivo na vítima.....79

FIGURA 36. Perfil eletroforético da peçonha da serpente *L. m. rhombeata* (P) em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) sob condições redutoras. Foram aplicados 15µL de amostra (5µL de peçonha + 10µL de tampão contendo β-mercaptoetanol). MK = marcador de massa molar (97kDa = fosforilase b; 66kDa = albumina; 45kDa = ovalbumina; 30kDa = anidrase carbônica; 20,1kDa = inibidor de tripsina; 14,4kDa = lactalbumina-α.....80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação taxonômica da Subordem Serpentes.....	8
TABELA 2. Número anual de casos de acidentes ofídicos e mortes por peçonha de serpentes na América Latina.....	19
TABELA 3. Reagentes para a preparação do gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) utilizado para eletroforese e obtenção da segunda dimensão do gel 2D.....	49
TABELA 4. Reagentes para a preparação do gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) utilizado para a visualização da composição proteica da peçonha de <i>L. m. rhombeata</i>	53
TABELA 5. Análise por MS/MS e MASCOT (<i>SwissProt</i> e banco de dados SNAKES (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid8570%5bOrganism:exp%5d)) das amostras peptídicas extraídas dos <i>spots</i> proteicos da peçonha de <i>L. m. rhombeata</i>	61
TABELA 6. Recuperação dos componentes cromatografados no processo de purificação da peçonha de <i>L. m. rhombeata</i>	73
TABELA 7. Análise por sequenciamento N-terminal das frações proteicas obtidas pelo fracionamento da peçonha de <i>L. m. rhombeata</i> em coluna cromatográfica de fase reversa C18. As sequências obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados nr (<i>non-redundant protein sequences</i>) contido no site do NCBI, por meio de buscas utilizando os seguintes termos como organismos-chave: <i>Lachesis muta rhombeata</i> e <i>Lachesis</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS.....	Linhagem celular de adenocarcinoma gástrico
ALT-C.....	Alternagina-C
BPPs.....	Peptídeos potencializadores de bradicinina
BLAST.....	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTp.....	<i>Protein blast</i>
cDNA.....	DNA complementar
CHAPS.....	(3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato)
CID-MS/MS...	<i>Collision-induced dissociation-mass spectrometry/mass spectrometry</i>
cm.....	Centímetro
CRISP.....	Proteína secretória rica em cisteína
Da.....	Dalton
D/ECD.....	Ácido aspártico/ácido glutâmico-cisteína-ácido aspártico
DisBa-01.....	Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>
DTT.....	Ditiotreitol
ECA.....	Enzima conversora de angiotensina I
FAD.....	Flavina Adenina Dinucleotídeo
Flt-1.....	<i>Fms-like tyrosine kinase 1</i> ou receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
Flt-4.....	<i>Fms-like tyrosine kinase 4</i> ou receptor 3 do fator de crescimento endotelial vascular
FPLC.....	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g.....	Força centrífuga (rotação)
HT168.....	Linhagem celular de melanoma
HUVEC.....	Células endoteliais vasculares de cordão umbilical humano
IAA.....	Iodoacetamida
IC50.....	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> /metade da concentração inibitória máxima
IPG.....	Gradiente de pH imobilizado
ITIS.....	<i>Integrated Taxonomic Information System</i> /Sistema de Informação Taxonômica Integrada

IUCN.....*International Union for Conservation of Nature/União Internacional pela Conservação da Natureza*
kDa.....*Kilodalton (10³ daltons)*
KDR.....*Kinase insert domain receptor* ou receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
KGD.....*Lisina-glicina-ácido aspártico*
KTS.....*Lisina-treonina-serina*
LAAO.....*L-aminoácido oxidase*
LC/MS/MS.....*Liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry*
M.....*Molar (mol/L)*
MALDI-TOF/MS.....*Matrix assisted laser desorption ionization-Time of flight/mass spectrometry*
MALDI-TOF/TOF.....*Matrix assisted laser desorption ionization-Time of flight/Time of flight*
MCF-7.....*Linhagem celular de adenocarcinoma mamário*
MDA-MB-231...*Linhagem celular de câncer de mama*
MGD.....*Metionina-glicina-ácido aspártico*
MLD.....*Metionina-leucina-ácido aspártico*
mRNA.....*RNA mensageiro*
MVD.....*Metionina-valina-ácido aspártico*
NCBI.....*National Center for Biotechnology Information*
NGF.....*Fator de crescimento neural*
NP-1.....*Neuropilina-1*
nr.....*Non-redundant protein sequences*
OMS.....*Organização Mundial da Saúde*
PANC-1.....*Linhagem celular de carcinoma pancreático*
pI.....*Ponto isoelétrico*
PIGF.....*Fator de crescimento placentário*
PLA₂.....*Fosfolipase A₂ ou fosfatidil-acil-hidrolase*
RGD.....*Arginina-glicina-ácido aspártico*
RTS.....*Arginina-treonina-serina*
SDS.....*Dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio*
SDS-PAGE.....*Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS*
SE.....*Solução de equilíbrio*

Sinan.....Sistema de Informação de Agravos de Notificação
sp.....Espécie
sv-LAAO.....L-aminoácido oxidase de peçonha de serpente
SVMPs.....*Snake venom metalloproteinases*/Metaloproteases de peçonhas de serpentes
TEMED.....Tetrametiletilenodiamina
TFA.....Ácido trifluoroacético
Tris.....tris(hidroximetil)aminometano
U937.....Linhagem celular de linfoma histiocítico
VEGF.....Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A.....Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGF-B.....Fator de crescimento endotelial vascular B
VEGF-C.....Fator de crescimento endotelial vascular C
VEGF-D.....Fator de crescimento endotelial vascular D
VEGF-E.....Fator de crescimento endotelial vascular E
VEGF-F.....Fator de crescimento endotelial vascular F
VEGFR-1.....Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-2.....Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-3.....Receptor 3 do fator de crescimento endotelial vascular
WGD.....Triptofano-glicina-ácido aspártico
WHO.....*World Health Organization*
WM35.....Linhagem celular de melanoma
XCD.....Qualquer aminoácido-cisteína-ácido aspártico
2D PAGE.....Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com SDS
3FTx.....*Three finger toxins*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A SIMBOLOGIA DAS SERPENTES.....	1
1.2 SERPENTES: CARACTERÍSTICAS E ORIGEM.....	5
1.3 DIVISÃO EM SERPENTES NÃO PEÇONHENTAS E PEÇONHENTAS.....	9
1.4 SERPENTES PEÇONHENTAS: UM BREVE HISTÓRICO.....	10
1.5 GLÂNDULAS VENENÍFERAS.....	11
1.5.1 Características principais e tipos.....	11
1.5.2 Glândulas veneníferas de elapídeos e viperídeos.....	12
1.5.3 Síntese e armazenamento de peçonha.....	13
1.6 PEÇONHAS DE SERPENTES.....	14
1.6.1 Composição e ações no organismo.....	14
1.6.2 Envenenamento por peçonha ofídica.....	16
1.6.3 Envenenamento por peçonha ofídica no Brasil.....	19
1.7 CLASSIFICAÇÃO DAS PEÇONHAS OFÍDICAS.....	21
1.7.1 Peçonha crotálica.....	21
1.7.2 Peçonha botrópica.....	23
1.7.3 Peçonha elapídica.....	24
1.7.4 Peçonha laquética.....	26
1.8 GÊNERO DE SERPENTE EM ESTUDO: <i>LACHESIS</i> (DAUDIN, 1803).....	28
1.8.1 Subespécie de serpente em estudo: <i>Lachesis muta rhombeata</i> (ZAMUDIO; GREENE, 1997).....	31
1.9 EXEMPLOS DE FAMÍLIAS DE PROTEÍNAS ENCONTRADAS EM PEÇONHAS OFÍDICAS, PRINCIPALMENTE NO GÊNERO <i>LACHESIS</i>	32
1.9.1 Serinoproteases.....	32
1.9.2 Fosfolipases A₂.....	33
1.9.3 L-aminoácido oxidases.....	34
1.9.4 Lectinas tipo C e proteínas similares à lectina tipo C.....	36
1.9.5 CRISPs.....	36
1.9.6 BPPs.....	37
1.9.7 VEGFs.....	38
1.9.8 Metaloproteases.....	39

1.9.9 Desintegrinas.....	41
1.10 PROTEÔMICA: FERRAMENTA CHAVE PARA O MAIOR CONHECIMENTO DA PEÇONHA DE SERPENTES.....	43
2 OBJETIVOS.....	47
3 METODOLOGIA.....	48
3.1 OBTENÇÃO DA PEÇONHA DE <i>LACHESIS MUTA RHOMBEATA</i>	48
3.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D SDS-PAGE).....	48
3.3 DETECÇÃO DOS <i>SPOTS</i> OBTIDOS A PARTIR DO PROTEOMA DA PEÇONHA DE <i>L. M. RHOMBEATA</i>	49
3.4 DIGESTÃO <i>IN SITU</i> , no GEL DOS <i>SPOTS</i> PROTEICOS.....	49
3.5 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PEPTÍDICAS EXTRAÍDAS DOS <i>SPOTS</i>	50
3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM).....	50
3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS ORIUNDOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (BIOINFORMÁTICA).....	51
3.8 <i>FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY</i> (FPLC).....	52
3.9 SEQUENCIAMENTO PROTEICO E ANÁLISE DOS DADOS.....	52
3.10 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE).....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DA PEÇONHA.....	54
4.2 DETECÇÃO DOS <i>SPOTS</i> OBTIDOS A PARTIR DO PROTEOMA DA PEÇONHA DE <i>L. M. RHOMBEATA</i>	56
4.3 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	60
4.4 ANÁLISE DA PEÇONHA POR FPLC.....	71
4.5 SEQUENCIAMENTO PROTEICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR FPLC.....	73
4.6 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE) DA PEÇONHA DE <i>LACHESIS MUTA RHOMBEATA</i>	80
5 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

As serpentes são animais fascinantes que cativam e/ou amedrontam a maioria dos seres humanos. Elas apresentam uma simbologia incontestável dentro da cultura humana, estando envolvidas nos mais diversos mitos, rituais e histórias ao redor do mundo. Esses animais rastejantes, desprovidos de membros, são fonte inesgotável de superstições, e também possuem glândulas de peçonha com inestimáveis e complexos componentes (proteínas, peptídeos, aminoácidos livres, compostos inorgânicos, lipídios, carboidratos, etc.) que constituem uma fonte riquíssima de compostos bioativos importantes para a descoberta de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças.

1.1 A SIMBOLOGIA DAS SERPENTES

As serpentes são bastante famosas por representarem um símbolo de dualismo, ora sendo temidas, ora sendo adoradas pela humanidade. Essa dualidade é muito antiga e fez com que estes répteis fossem tidos como o símbolo ideal da cura, sabedoria, imortalidade, rejuvenescimento, amor, sensualidade, pecado e morte (ANTONIOU et al., 2011).

Na Psicologia, a serpente simboliza o raro, o incompreensível e o misterioso, além de ser associada às atitudes sexuais e ao fálico (PIZZATTO, 2003). Para os babilônios, ela representava a juventude, assim como é visto na lenda do príncipe Gilgamés, em que uma serpente após comer a erva da vida, despiu-se de sua pele velha e rejuvenesceu (NASCIMENTO; RAMOS; LICHTENSTEIN, 2006). Na Grécia Antiga, na região de Tessalia, a autorrenovação e o rejuvenescimento eram personificados pela “Grande Deusa” Diktyнна (Figura 1) que é retratada segurando uma serpente em cada mão, indicando seus poderes imortais (ANTONIOU et al., 2011).



Figura 1. Estátua da “Grande Deusa” grega Diktyнна segurando uma serpente em cada mão. As serpentes representam a autorrenovação e o rejuvenescimento. Fonte: <<http://arthistoryresources.net/snakegoddess/minoanwomen.html>>. Acesso em 20 de novembro de 2012.

Em outras mitologias, a serpente é tida como símbolo da preservação, como por exemplo, na forma do deus hindu Vishnu, representado pela serpente Ananta e na forma do deus sumérico Ningishizidu, representado por duas serpentes nascidas de seus ombros (NASCIMENTO; RAMOS; LICHTENSTEIN, 2006). Na mitologia egípcia, o deus do rio Nilo era um deus-serpente, simbolizando o poder do Faraó (ALVES et al., 2012). Na cultura asteca, o ouroboros é simbolizado por uma serpente mordendo a própria cauda, indicando um ciclo, a autorrenovação e a imortalidade (PIZZATTO, 2003).

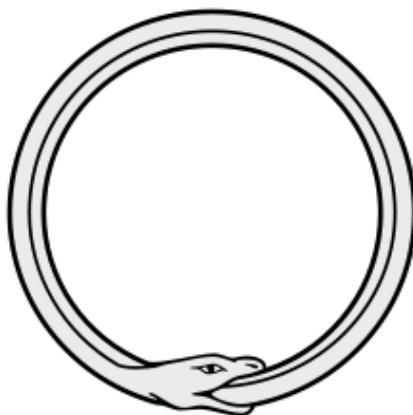


Figura 2. Representação do ouroboros asteca simbolizado por uma serpente mordendo a própria cauda. Fonte: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Ouroboros>>. Acesso em 20 de novembro de 2012.

O culto à serpente é um ritual mítico que ainda ocorre na Índia, na África Central, na Oceania, na Grécia, no Egito e em outros locais do leste, onde as serpentes são veneradas e deuses-serpentes são protetores, símbolos da fecundidade e do infinito (ALVES et al., 2012). Curandeiros africanos utilizam peles de serpentes como amuletos mágicos para assegurar saúde e sucesso às pessoas (LUGIRA, 2009). Em algumas tradições africanas, esses répteis são associados ao arco-íris, tendo o poder de controlar as chuvas e os rios (Cansdale¹, 1955 apud ALVES et al., 2012). Além disso, ao redor do mundo, principalmente na África Equatorial, é comum encontrarmos imagens de serpentes representando sábios espíritos protetores das florestas (Cascudo², 1962 apud ALVES et al., 2012).

Diversas divindades da mitologia greco-romana são representadas por serpentes: as Erínias (Fúrias) possuíam as cabeças cobertas de serpentes tendo um aspecto ameaçador (Figura 3) e eram deusas que puniam os crimes de pessoas que fugiam da justiça pública (BULFINCH, 2005); já Equidna era um monstro metade mulher, metade serpente, mãe de criaturas como a Esfinge de Tebas e a Hidra de Lerna (RIBEIRO JR., 2012).



Figura 3. Quadro “Orestes perseguido pelas Fúrias” por Adolph William Bouguereau em 1862. Fonte: < http://diariodegoldmundo.blogspot.com.br/2006_01_01_archive.html>. Acesso em 21 de novembro de 2012.

O símbolo da Medicina também é representado por serpentes: tanto pelo caduceu de Mercúrio (Hermes) quanto pelo bastão de Esculápio (Asclepius) (Figura 4). Mercúrio, filho de Júpiter e de Maia, era o deus do comércio (BULFINCH, 2005), mensageiro dos deuses e guia dos mortos para o Inferno (ANTONIOU et al., 2011). Ele sempre segurava

¹ CANSDALE, G. S. **Reptiles of West Africa**. Penguin, 1955.

² CASCUDO, C. L. **Dicionário do folclore brasileiro**. Ed. do Instituto Nacional do Livro, 1962.

em sua mão uma haste com duas serpentes enroladas, seu famoso caduceu de ouro (figura 4-1) (ANTONIOU et al., 2011; BULFINCH, 2005; PRATES, 2002). Esculápio, filho de Apolo, em uma visita a pacientes, foi surpreendido por uma serpente que se enrolou em seu bastão e aí permaneceu (Figura 4-2) (PRATES, 2002). Além disso, é tido que o deus Esculápio, assumindo a forma de uma serpente, liberou Roma de uma praga, curando os cidadãos romanos com seu poder (ANTONIOU et al., 2011). A serpente, por representar um símbolo de cura, terapia e redenção, foi considerada o símbolo da atividade médica e especula-se que seu primeiro uso oficial, como símbolo na Medicina Moderna, ocorreu em 1857 pelos ajudantes hospitalares do Exército dos Estados Unidos (ANTONIOU et al., 2011; HART, 1972).

A Farmácia também possui como símbolo uma serpente; neste caso, a serpente aparece enrolada em uma taça, também representando a cura e a sabedoria (Figura 4-3). Esse símbolo teve origem a partir de Hígia, filha do deus Esculápio, que zelava pela saúde e bem-estar dos homens, sendo sempre representada junto de uma serpente (PRADO, 2012).

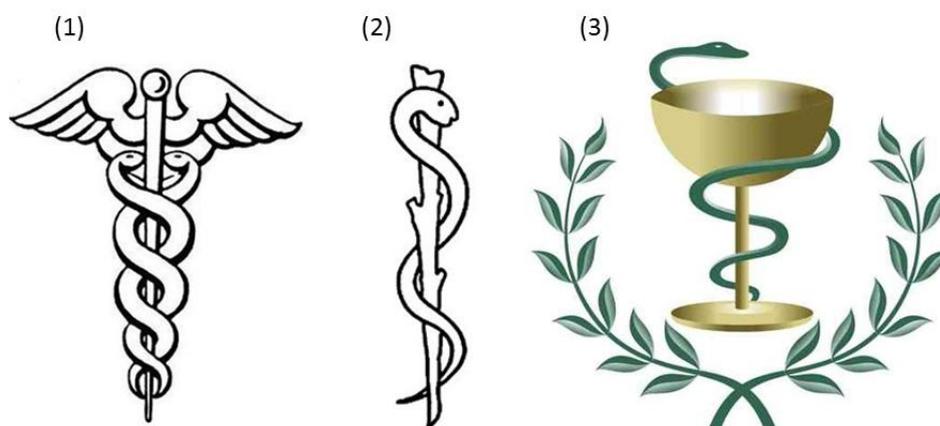


Figura 4. Representações do caduceu de Mercúrio (1), do bastão de Esculápio (2) (ambos representando o símbolo da Medicina) e do cálice de Hígia (3) representando o símbolo da Farmácia. Fonte: PRADO, 2012 e PRATES, 2002.

No Cristianismo, a serpente representa a maldade, o demônio, o pecado e a tentação. Na tradição judaica e no Velho Testamento Cristão, Adão e Eva foram tentados pela serpente, que incentivou Eva a comer o fruto do conhecimento, traíndo as ordens de Deus (ALVES et al., 2012; ANTONIOU et al., 2011; PIZZATTO, 2003). A serpente aparece mais uma vez quando Moisés lidera os Israelitas pelo deserto e Deus envia serpentes peçonhentas contra aqueles que falaram mal Dele (ANTONIOU et al., 2011), reforçando a crença e a associação desses animais com o ‘mal’ e a ‘doença’.

Como pode ser visto, as serpentes são um símbolo ambíguo, levando a dualidades, representando tanto o bem na forma de cura, rejuvenescimento e terapia, quanto o mal, na forma de doenças, traição e pecado. Entretanto, elas estão sempre presentes na imaginação, na cultura e nas histórias da humanidade, sendo temidas e/ou adoradas.

1.2 SERPENTES: CARACTERÍSTICAS E ORIGEM

As serpentes são animais cordados, pertencentes ao subfilo Vertebrata, classe Reptilia, ordem Squamata, subordem Serpentes (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2012) que apresentam as seguintes características: escamas epidérmicas, corpo alongado (SHINE, 1991), sendo ápodas (sem membros) e ectotérmicas (não conseguem controlar a temperatura corpórea) (KLEIN, 2006; MULLIN; SEIGEL, 2009), sem orifício auditivo externo e sem pálpebras móveis (GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2009). Trocam de pele (muda) periodicamente, substituindo a pele velha, livrando-se de parasitas, tais como ácaros e carrapatos (SINGAPORE ZOOLOGICAL GARDENS DOCENTS, 2012).

Devido à ausência de membros anteriores e posteriores, as serpentes capturam, manipulam e consomem suas presas usando somente seu corpo e boca (ZUG; VITT; CALDWELL, 2001). São carnívoras, alimentando-se de invertebrados (principalmente artrópodes) e de vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, incluindo outras serpentes, aves, mamíferos e roedores) (BUTANTAN, 2010; MEHRTENS, 1987), e são encontradas em todos os continentes com exceção da Antártida (KASTURIRATNE et al., 2008; MULLIN; SEIGEL, 2009; PYRON et al., 2011; ZUG; VITT; CALDWELL, 2001). A presença de numerosas vértebras (entre 120 e 240) em seu tronco e pescoço faz com que uma serpente tenha um corpo realmente flexível, permitindo uma eficiente locomoção ondulatória na água, dentro da terra, na superfície, em arbustos e em árvores (SHINE, 1991; ZUG; VITT; CALDWELL, 2001).

As serpentes possuem uma grande variedade de estruturas oculares, envolvendo cones e bastonetes na retina, e sabe-se que algumas diurnas têm receptores para as cores vermelha e verde (SHINE, 1991). As noturnas geralmente utilizam outros sentidos como o olfato e a temperatura corpórea de suas presas, e tendem a ter olhos menores (SHINE, 1991). A quimiorrecepção (detecção de odores) é muito mais utilizada por esses répteis. Suas línguas bifurcadas ‘coletam’ traços químicos no ar que são carregados para dentro da boca da

serpente e analisados por uma estrutura complexa no palato, o órgão de Jacobson, que consegue identificar odores de presas, de potenciais pares para acasalamento, de rivais e predadores (SHINE, 1991). Algumas serpentes conseguem detectar radiação infravermelha devido à presença de ‘poços’ sensoriais em seus maxilares, que são receptores de calor capazes de detectar diferenças mínimas de temperatura, ajudando as serpentes a localizarem suas presas numa noite escura (SHINE, 1991).

As serpentes possuem dois modos reprodutivos: (a) a oviparidade, onde ocorre a postura de ovos com casca, contendo embriões pouco desenvolvidos e (b) a viviparidade, onde temos o parto do filhote totalmente desenvolvido, independente da retenção de ovos no útero (Figura 5) (Shine³, 1985 apud PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006).



Figura 5. Modos reprodutivos das serpentes: oviparidade (à esquerda) e viviparidade (à direita).
Fonte: <<http://www.flogao.com.br/serpentescomopet/91292713>>. Acesso em 22 de novembro de 2012.

Outra característica interessante é a existência de dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, que se pode manifestar nas diferenças entre as dimensões corporais, entre o número e formato das escamas e entre a posição e o tamanho de órgãos e glândulas (PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006). Na maioria das espécies, a fêmea apresenta o corpo maior que o do macho, pois ela precisa ter um maior sucesso reprodutivo, tendo um grande número de filhotes; já o macho precisa ter um corpo menor para uma locomoção mais rápida, porém ele possui uma cauda mais longa para a acomodação do

³ SHINE, R. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. In: GANS, C.; BILLET, F. (eds.). **Biology of reptilian**. Wiley, New York, v. 15, p. 605-694, 1985.

hemipênis (órgão sexual masculino) e seus músculos retratores (PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006).

As serpentes apareceram na Era Cenozóica (GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2009; PYRON et al., 2011) e há duas hipóteses com relação à origem desses répteis: (1) a hipótese de lagartos ‘escavadores’ ancestrais e (2) a hipótese de mosassauros aquáticos ancestrais (MADRIGAL et al., 2012) (Figura 6). A primeira hipótese é sustentada por achados fósseis e diz que as serpentes se originaram de lagartos que viviam em túneis na terra (como os varanídeos) (O’SHEA, 2008), o que pode ser evidenciado nas serpentes pela presença de pálpebras fundidas e perda de orelhas externas, características típicas de animais fossoriais (MERTENS, 1961). Wiens et al. (2012) observaram, em um estudo filogenético utilizando dados moleculares de 161 espécies de escamados (ordem Squamata), sendo 44 genes nucleares para cada espécie, que as ‘cobras-cegas’ estão na base da filogenia de serpentes, sugerindo, portanto, que as serpentes ancestrais eram fossoriais e evoluíram, retornando para uma vida na superfície. A segunda hipótese é sustentada por caracteres morfológicos e sugere que os ancestrais das serpentes são os mosassauros, répteis aquáticos extintos no Cretáceo (O’SHEA, 2008; SANCHEZ, 2012). De acordo com essa hipótese, a presença de pálpebras fundidas, nas serpentes, evoluiu para combater as condições marinhas e a perda de orelhas externas ocorreu pelo desuso em ambiente aquático (SANCHEZ, 2012). O debate com relação a essas duas hipóteses ainda continua e mais estudos precisam ser feitos para desvendar essa questão.



Figura 6. Imagens do varanídeo *Lanthanotus borneensis* (acima) e do mosassauro *Hainosaurus bernardi* (abaixo) representando os possíveis ancestrais das serpentes. Fontes: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/collections/contributors/Grzimek_herps/Varanidae/Lanthanotus_borneensis/> e <<http://dino-mania.blogspot.com.br/2011/01/hainossauro.html>>. Acesso em 22 de novembro de 2012.

Segundo o ITIS (Sistema de Informação Taxonômica Integrada), um *site* resultante da parceria de agências federais formado para satisfazer as necessidades mútuas de informação taxonômica cientificamente credível, a subordem Serpentes descrita por Lineu em 1758 é subdividida em duas infraordens: Scolecophidia e Alethinophidia. A primeira infraordem engloba as chamadas cobras-cegas, enquanto que a segunda infraordem engloba as serpentes típicas (não peçonhentas e peçonhentas) (Tabela 1). Essa subdivisão é baseada em características morfológicas e similaridades de sequências de DNA mitocondrial (POUGH et al., 2002).

Tabela 1. Classificação taxonômica da Subordem Serpentes. Modificado de ITIS. Fonte: < <http://www.itis.gov/>>. Acesso em 22 de novembro de 2012.

Subordem	Serpentes	Linnaeus, 1758
Infraordem	Scolecophidia	Cope, 1864
Família	Anomalepididae	Taylor, 1939
Família	Leptotyphlopidae	Stejneger, 1892
Família	Typhlopidae	Merrem, 1820
Infraordem	Alethinophidia	Nopcsa, 1923
Família	Acrochordidae	Bonaparte, 1831
Família	Aniliidae	Stejneger, 1907
Família	Anomochilidae	Cundall, Wallach & Rossman, 1993
Família	Atractaspididae	Günther, 1858
Família	Boidae	Gray, 1825
Família	Bolyeriidae	Hoffstetter, 1946
Família	Colubridae	Oppel, 1811
Família	Cylindrophiidae	Fitzinger, 1843
Família	Elapidae	F. Boie, 1827
Família	Loxocemidae	Cope, 1861
Família	Pythonidae	Fitzinger, 1826
Família	Tropidophiidae	Brongersma, 1951
Família	Uropeltidae	Müller, 1832
Família	Viperidae	Oppel, 1811
Família	Xenopeltidae	Bonaparte, 1845

1.3 DIVISÃO EM SERPENTES NÃO PEÇONHENTAS E PEÇONHENTAS

Uma classificação bastante utilizada (Boulenger⁴, 1893 apud ZUG; VITT; CALDWELL, 2001) divide as serpentes em não peçonhentas e peçonhentas (que inoculam peçonha). Há alguns critérios para essa divisão: (1) presença nas serpentes peçonhentas de fosseta loreal, um orifício entre o olho e a narina utilizado para perceber a presença de calor (a única exceção é a cobra-coral, *Micrurus* sp., que não apresenta essa fosseta) (BUTANTAN, 2010), e (2) tipo de dentição (Figura 7).

As serpentes não peçonhentas apresentam uma dentição mais simples chamada de áglifa (dentes fixos, pequenos e maciços), enquanto que as serpentes peçonhentas apresentam três tipos de dentição: (a) a opistóglifa (tipo mais primitivo de ‘sistema de entrega de peçonha’, onde temos além dos dentes pequenos e maciços, a presença de um par de dentes mais longos, com sulcos, no fundo da boca, por onde a peçonha escorre); (b) a proteróglifa (com a presença de um par de dentes dianteiros, fixos, pequenos e semi canaliculados que injetam peçonha, como pode ser visto em todas as serpentes peçonhentas australianas); e (c) a solenóglifa (o par de dentes dianteiros é longo, completamente canaliculado e retrátil, se movendo para frente no momento do bote) (BUTANTAN, 2010; SHINE, 1991).

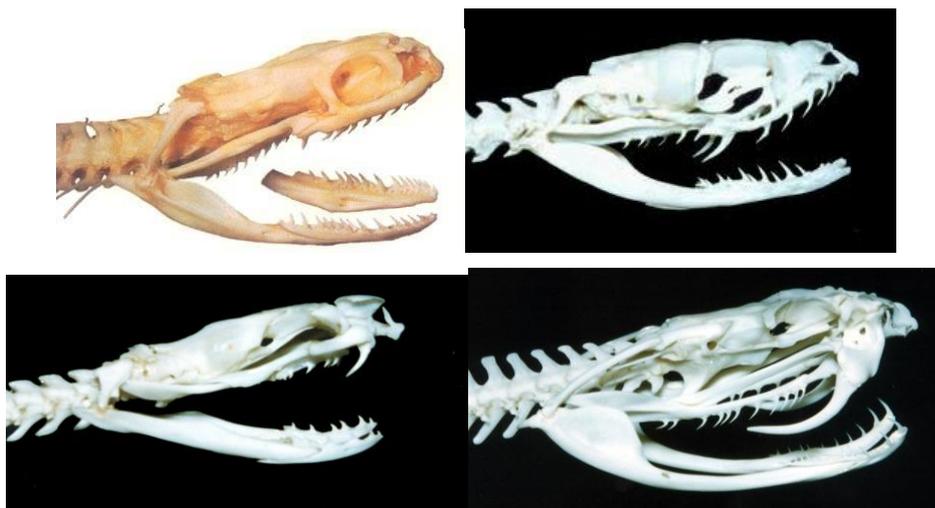


Figura 7. Crânios de serpentes mostrando os tipos de dentição existentes: áglifa (acima do lado esquerdo), opistóglifa (acima do lado direito), proteróglifa (abaixo do lado esquerdo) e solenóglifa (abaixo do lado direito). Fonte: <<http://vinnybiologia.blogspot.com.br/2012/05/tipos-de-denticao-serpentes.html>>. Acesso em 22 de novembro de 2012.

⁴ BOULENGER, G. A. **Catalogue of the snakes in the British Museum (Natural History). Vols I-III.** British Museum (Nat. Hist.), London, 1893.

Existe outra maneira de se classificar as serpentes em não peçonhentas e peçonhentas que também leva em consideração a dentição desses répteis e está sendo muito utilizada na literatura atual. Segundo essa classificação, as serpentes não peçonhentas são chamadas de serpentes basais sem presas (dentes inoculadores), enquanto que as serpentes peçonhentas estão subdivididas em (a) serpentes com presas dianteiras e (b) serpentes com presas traseiras (VONK et al., 2008).

1.4 SERPENTES PEÇONHENTAS: UM BREVE HISTÓRICO

As serpentes peçonhentas apareceram durante o Mioceno (25 milhões de anos atrás) (KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009; WARRELL, 2010), época em que houve uma imensa diversificação das serpentes do norte do super continente Laurásia, possivelmente devido à grande disponibilidade de pequenos mamíferos (presas) e à abertura de numerosos habitats e nichos ecológicos (O'SHEA, 2008). Essa diversificação foi tão rápida que esse período foi chamado de 'A Idade das Serpentes' (O'SHEA, 2008).

Dentre as quase 3000 espécies de serpentes no mundo, as peçonhentas perfazem um total de 20% e estão classificadas em quatro famílias: (1) Viperidae (víboras, *adders* (serpentes da Europa e do nordeste da Ásia) e jararacas), (2) Elapidae (cobras, mambas, *kraits* (*Bungarus sp.*), corais, serpentes peçonhentas australianas e serpentes marinhas), (3) Atractaspididae (cobras estilete africanas) e (4) Colubridae (serpentes típicas) (GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2009; INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2012; PYRON et al., 2011; WARRELL, 2010). Todas estas serpentes têm a habilidade de injetar ou inocular peçonha, que é secretada por meio de glândulas orais, usando dentes modificados (presas) (WARRELL, 2010).

1.5 GLÂNDULAS VENENÍFERAS

1.5.1 CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS E TIPOS

As glândulas veneníferas das serpentes peçonhentas derivam de glândulas salivares especializadas, e localizam-se atrás dos olhos, na região temporal, na maxila superior (KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009; MELGAREJO, 2003; TUCKER; MILETICH, 2010; VITORINO-CARDOSO, 2005; VONK et al., 2008). Constituem-se de tecidos especializados que produzem e armazenam a peçonha, secretando-a por meio de contrações musculares no momento da picada (VITORINO-CARDOSO, 2005).

Os viperídeos e os elapídeos possuem uma glândula venenífera principal, que se mantém pressurizada por músculos estriados adjacentes durante o ataque (picada), e uma glândula acessória com ductos que se conectam a uma presa oca, enquanto que os atractaspídídeos possuem somente uma glândula venenífera principal que também é pressurizada por músculos estriados adjacentes; ambos os sistemas produzindo uma repentina descarga de alta pressão da peçonha para um reservatório dentro da glândula (KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009; VONK et al., 2008). Os colubrídeos, por sua vez, possuem um sistema de baixa pressão baseado numa glândula venenífera que não contém um grande reservatório, liberando a peçonha vagarosamente dentro de um epitélio oral adjacente até o dente (presa), que muitas vezes é bastante sulcado, mas nunca oco (KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009; VONK et al., 2008).

As glândulas veneníferas são ligadas ao crânio da serpente por meio de ligamentos e músculos que se inserem na mandíbula, principalmente o músculo compressor da glândula (*M. compressor glandulae*) em viperídeos e o músculo adutor mandibular externo superficial (*M. adductor mandibulae externus superficialis*) em elapídeos (MELGAREJO, 2003).

1.5.2 GLÂNDULAS VENENÍFERAS DE ELAPÍDEOS E VIPERÍDEOS

Como citado brevemente no subtópico anterior, em diversas espécies de elapídeos e viperídeos, a glândula venenífera pode ser dividida morfológicamente em quatro regiões: (1) glândula principal – parte secretora que ocupa toda a região posterior; (2) ducto primário – forma uma alça na região suborbital; (3) glândula acessória – estrutura ovalada que contribui com secreções durante a passagem da peçonha; e (4) ducto secundário – localizado na base da presa (dente inoculador) (Figura 8) (KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009; MELGAREJO, 2003; TUCKER; MILETICH, 2010).

A glândula principal é formada por túbulos ramificados compostos pelo epitélio produtor de peçonha, sendo esta produzida e armazenada no lúmen de diversos ductos coletores (MELGAREJO, 2003), e por células epiteliais secretoras, células ricas em mitocôndrias, células horizontais e células escuras (MACKESSY, 1991).

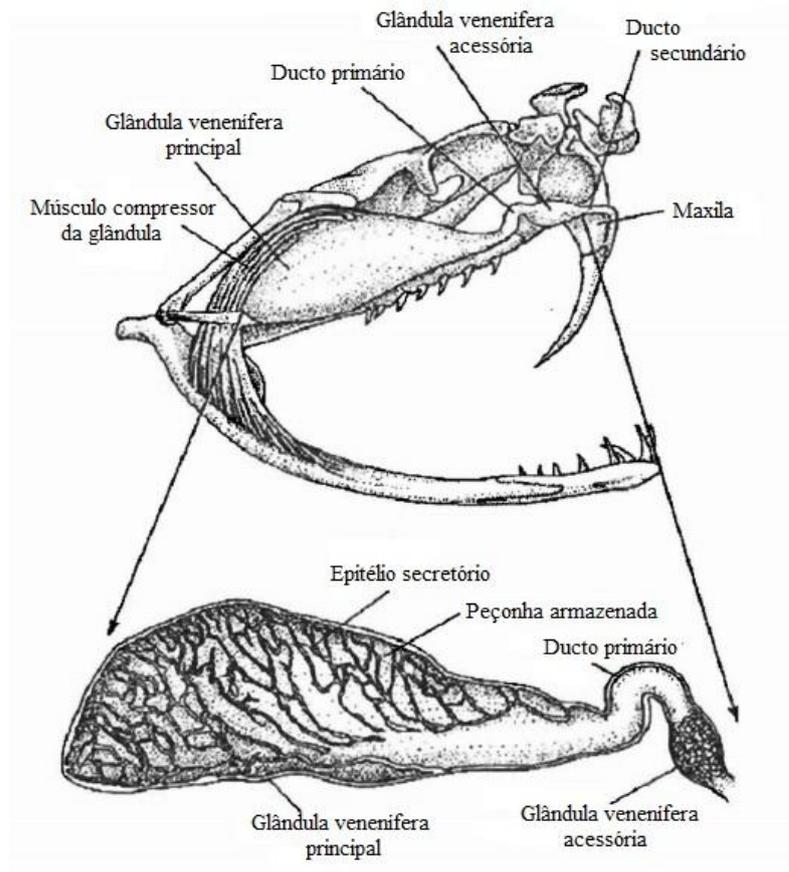


Figura 8. Glândula venenífera de um viperídeo. O epitélio secretor libera a peçonha que fica estocada no lúmen da glândula e está pronta para ser utilizada durante a picada. Durante o ataque, a contração do músculo compressor da glândula força a peçonha pelos ductos para dentro da presa. Fonte: modificado de KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009.

1.5.3 SÍNTESE E ARMAZENAMENTO DE PEÇONHA

As glândulas veneníferas passam por diversas mudanças fisiológicas, bioquímicas e histoquímicas após a extração manual da peçonha estocada ou após a inoculação da peçonha por meio da picada. As células secretoras epiteliais que revestem os túbulos da glândula venenífera iniciam rapidamente a síntese proteica, devido à estimulação do sistema nervoso autônomo (MACKESSY; BAXTER, 2006). Após aproximadamente 8 dias, a proliferação do retículo endoplasmático rugoso e os níveis de mRNA chegam ao máximo com a subsequente exocitose merócrina reabastecendo de peçonha os ductos epiteliais e o grande lúmen basal (MACKESSY; BAXTER, 2006). A síntese e secreção de peçonha completam-se após 16 dias (KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009) e durante todo este período, as células mudam de cubóides para colunares, voltando à forma cubóide no final do processo. Finalmente, a peçonha é estocada no lúmen basal e nos ductos da glândula venenífera por muito tempo, estando disponível quando for necessária (MACKESSY; BAXTER, 2006).

As serpentes peçonhentas possuem mecanismos de proteção contra suas próprias toxinas, fazendo com que a peçonha estocada continue potente e estável mesmo sob uma gama variável de condições (MACKESSY; BAXTER, 2006). Essa estabilização é acompanhada pela regulação dos níveis de pH, pois células ricas em mitocôndrias da glândula principal acidificam a mistura e inibidores endógenos inibem a atividade enzimática da peçonha durante seu armazenamento (KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009). Quando injetada na vítima, a peçonha é ativada espontaneamente (MACKESSY; BAXTER, 2006).

Muitas espécies de serpentes, principalmente as pertencentes à família Viperidae, apresentam inibidores de proteases (como a cistatina) e fosfolipases no sangue, evitando danos ao próprio organismo caso ocorra uma inoculação acidental de peçonha (MELGAREJO, 2003). Os viperídeos podem regular a quantidade de peçonha que aplicam, desde uma mordida de advertência sem injeção, até um ataque com descarga total da glândula venenífera (MELGAREJO, 2003).

1.6 PEÇONHAS DE SERPENTES

1.6.1 COMPOSIÇÃO E AÇÕES NO ORGANISMO

Segundo Fry et al. (2012), peçonha é toda secreção, produzida num tecido especializado (geralmente encapsulada dentro de uma glândula) em um animal e liberada em um animal-alvo através da imposição de uma ferida.

As peçonhas de serpentes são misturas complexas de proteínas e peptídeos (CUNHA; FULY; ARAUJO, 2011; LI et al., 2004; WARRELL, 2010), englobando enzimas (serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases, fosfolipases A₂), componentes proteicos não-enzimáticos (lectinas tipo C, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP, VEGFs, cistatina, inibidores de proteases tipo-Kunitz) e proteínas não-tóxicas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003; LEMOS et al., 2009; SANZ et al., 2008), que podem diferenciar-se entre as famílias, gêneros e espécies, dentro de uma única espécie ou até dentro do mesmo indivíduo, em relação à fase de desenvolvimento deste (ontogenia), além de variarem conforme a dieta e o habitat de cada espécime (CISCOTTO et al., 2011; DA ROCHA; FURTADO, 2005; MADRIGAL et al., 2012). Além de proteínas e peptídeos, as peçonhas de serpentes possuem componentes inorgânicos (Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, P⁵⁺, Co²⁺ e Zn²⁺), carboidratos (glicoproteínas), lipídios (fosfolipídios), aminas biogênicas, citrato, nucleotídeos e aminoácidos livres (BJARNASON; FOX, 1994; DA CUNHA; MARTINS, 2012; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003; LEMOS et al., 2009). Todos esses componentes interrompem processos fisiológicos e bioquímicos importantes, permitindo que a peçonha auxilie na captura, mobilização e digestão de presas (CISCOTTO et al., 2011; SANZ et al., 2008; TUCKER; MILETICH, 2010) e na defesa da própria serpente contra predadores (CISCOTTO et al., 2011; KARDONG, 1982; TUCKER; MILETICH, 2010).

As toxinas contidas na peçonha podem agir sinérgica ou individualmente (SANCHEZ et al., 2003) e evoluíram de um pequeno conjunto de proteínas com funções fisiológicas normais (MADRIGAL et al., 2012). Pressões evolutivas selecionaram as toxinas que são específicas e têm muitos alvos nos tecidos animais e que afetam vários sistemas do corpo humano, principalmente os sistemas nervoso central, cardiovascular, muscular e vascular (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; WARRELL, 2010), perturbando a

atividade de enzimas, receptores ou canais iônicos, interferindo na coagulação sanguínea (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011) e na hemostase (CALVETE, 2011b).

As neurotoxinas de peçonhas de serpentes bloqueiam ou excitam junções neuromusculares periféricas, agindo em diferentes sítios, podendo fazer com que a vítima da picada tenha sonolência, sugerindo uma ação sedativa do sistema nervoso central (WARRELL, 2010). Muitos componentes das peçonhas causam hipotensão na vítima, acarretando em um aumento no número de fatores de permeabilidade que causam hipovolemia devido ao extravasamento do plasma (WARRELL, 2010). Já outros componentes acarretam em distúrbios hemostáticos, ativando ou inibindo fatores de coagulação ou plaquetas, perturbando o endotélio vascular, ligando-se aos receptores de plaquetas e assim induzindo ou inibindo a agregação, podendo promover uma severa hemorragia na vítima (WARRELL, 2010). Há também os componentes miotóxicos e citolíticos que contribuem para a necrose tecidual local da região da picada (Figura 9) (WARRELL, 2010).

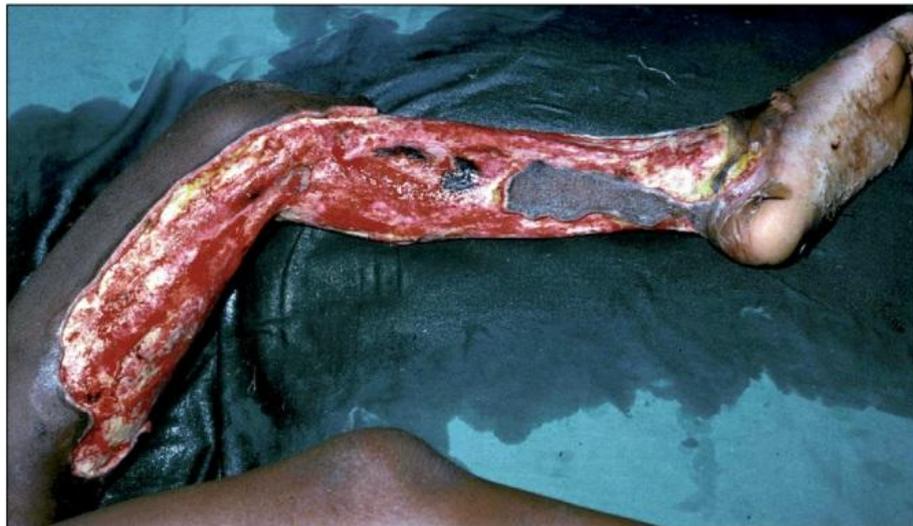


Figura 9. Dermonecrose extensiva em uma garota, três semanas após ela ter sido picada por uma serpente da espécie *Naja ashei* em Kilifi, no Quênia. Fonte: WARRELL, 2010.

No tópico 1.9 serão vistos com mais detalhes as características de algumas famílias de proteínas presentes na peçonha de serpentes.

1.6.2 ENVENENAMENTO POR PEÇONHA OFÍDICA

O envenenamento é considerado um relevante problema de saúde pública mundial e foi incluído pela Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) no rol de condições negligenciadas pertencentes à lista do Departamento de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) (CALVETE, 2011a, 2011b; CHACÓN et al., 2012; CISCOTTO et al., 2011; DE MORAIS et al., 2013; GUTIÉRREZ, 2011; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009; KASTURIRATNE et al., 2008; WARRELL, 2010). Picadas de serpentes causam significativa mortalidade e incapacidade (física e psicológica) humana, porém seu reconhecimento internacional como algo danoso à saúde é prejudicado por falta de dados epidemiológicos (GUTIÉRREZ, 2011; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; KASTURIRATNE et al., 2008; WARRELL, 2010).

Desde a década de 50, vários pesquisadores tem tentado fazer estimativas globais do número (1) de acidentes ofídicos, (2) de envenenamentos e de (3) mortes ocasionadas por acidentes com serpentes. Swaroop e Grabb (1954) reconheceram que a estimativa global anual de 30.000-40.000 mortes por picada de serpentes foi subestimada devido à falta de dados hospitalares e a exclusão da Europa central e do norte da Ásia durante as pesquisas. Chippaux (1998) extrapolou as estimativas globais anuais, obtendo um total de 5.400.000 acidentes ofídicos, mais que 2.500.000 de envenenamentos por peçonha ofídica e aproximadamente 125.000 mortes. Kasturiratne et al. (2008) obtiveram uma estimativa global anual de 421.000-1.841.000 de envenenamentos por peçonha ofídica e de 20.000-94.000 mortes.

De acordo com Warrell (2010), o sul e o sudeste da Ásia foram identificados como tendo o maior índice de envenenamento por peçonha ofídica. O maior número de acidentes ofídicos ocorre em países tropicais e subtropicais subdesenvolvidos (na África, Ásia e América Latina) com falta de conscientização, baixo acesso ao soro antiofídico (único ‘tratamento’ até então efetivo contra picadas de serpentes peçonhentas), falta do antiveneno específico, retardo na administração do soro antiofídico e seu uso incorreto durante o tratamento. Na savana africana, por exemplo, de cada 100.000 pessoas, 500 são vítimas de picadas de serpentes e aproximadamente 40 delas morrem (WARRELL, 2010). No Nepal (Ásia) de cada 100.000 pessoas, 162 morrem por ano devido a acidentes ofídicos com serpentes peçonhentas (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006). Na Europa, nos Estados Unidos e no Canadá, o envenenamento por peçonha ofídica é relativamente raro já

que cerca de 90% dos 8.000 casos ocorridos anualmente são hospitalizados, resultando em cerca de 15 a 30 mortes (LEMOS et al., 2009).

É necessário que os habitantes de áreas com maior incidência de acidentes ofídicos saibam como evitar esse problema: conhecer os habitats preferidos das serpentes mais perigosas e seus picos de períodos reprodutivos (hora do dia, estação do ano, etc.) pode ajudar a evitar o aumento no número de acidentes. Mulheres, crianças e trabalhadores rurais de comunidades pobres são os mais acometidos (CHIPPAUX, 1998; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006), sendo que nas crianças os efeitos da picada são mais severos do que nos adultos por causa de seus baixos pesos corpóreos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Nos continentes, as espécies de serpentes que causam o maior número de envenenamentos e mortalidades são: (1) *Echis sp.* no norte da África, (2) *Bothrops sp.* nas Américas Central e do Sul, e (3) *Naja sp.* e (4) *Bungarus sp.* na Ásia (Figura 10) (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006).



Figura 10. Serpentes que causam alta incidência de envenenamentos na África, na Ásia e na América Latina. (A) *Echis ocellatus* (Viperidae, presente na Nigéria); (B) *Naja naja* (Elapidae, presente no Sri Lanka) e (C) *B. asper* (Viperidae, presente na Costa Rica) Fonte: GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006. Fotos (A) e (B) tiradas por D. A. Warrell e foto (C) tirada por Mahmood Sasa.

Na América Latina (Central, Sul, Andina e Tropical) foi estimado um total de 80.329 a 129.084 casos anuais de acidentes ofídicos por peçonha de serpente e um total de mortes anuais entre 540 e 2.298 (Tabela 2) (KASTURIRATNE et al., 2008).

Tabela 2. Número anual de casos de acidentes ofídicos e mortes por peçonha de serpentes na América Latina. Modificado de KASTURIRATNE et al., 2008.

	Número de acidentes ofídicos		Número de Mortes	
	Baixa estimativa	Alta estimativa	Baixa estimativa	Alta estimativa
América Andina	6.548	27.653	243	533
América Central	42.087	67.373	193	1.461
América do Sul	2.058	2.163	4	5
América Tropical	29.636	31.895	100	299

1.6.3 ENVENENAMENTO POR PEÇONHA OFÍDICA NO BRASIL

Vital Brazil foi o primeiro pesquisador a realizar um estudo epidemiológico de acidentes ofídicos aqui no Brasil, quando levantou o número de mortes por picadas de serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo, registrando 63 mortes em 1897, 88 em 1899 e 104 em 1900 (Brazil⁵, 1901 apud BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

Em 1986, com a criação do Programa Nacional de Ofidismo, tornou-se obrigatório notificar a ocorrência de acidentes ofídicos no nosso país, permitindo uma troca de informações epidemiológicas entre o Ministério da Saúde e as Secretárias Estaduais (LEMOS et al., 2009), tentando-se obter o maior número possível de dados relacionados às serpentes peçonhentas, para uma maior prevenção e controle dos acidentes e da produção de soro antiofídico.

De 2000 a 2011, o número de acidentes ofídicos brasileiros notificados (englobando serpentes peçonhentas e não peçonhentas) aumentou (Figura 11) (BRASIL, 2012). Em 2011 foram registrados 30.836 acidentes (Figura 11), correspondendo a uma incidência de 16,0 casos a cada 100 mil habitantes brasileiros (BRASIL, 2012).

⁵ BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ofídico. *Revista Médica de São Paulo*, São Paulo, vol. 4, p. 255-260, 1901.

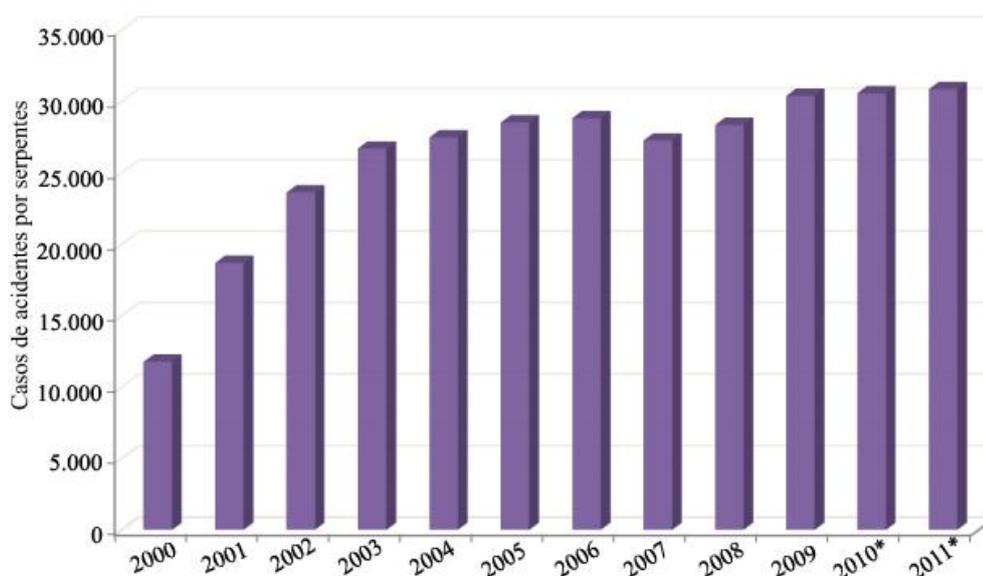


Figura 11. Casos de acidentes por serpentes ocorridos no Brasil entre 2000 e 2011, com o maior número de acidentes ocorrendo em 2011 (30.836). *Dados preliminares sujeitos a revisão (2010 e 2011). Fonte: Sinan/SVS/MS – atualizado em 21 jun. 2012.

O Ministério da Saúde registrou, em 2009, que o gênero de serpentes *Crotalus* (cascavéis) foi responsável pelo maior índice de letalidade (1,25%; 26/2078), seguido dos gêneros *Micrurus* (corais-verdadeiras, 1,02%; 2/192), *Lachesis* (surucucus, 0,7%; 6/871) e *Bothrops* (jararacas, urutus, 0,35%; 77/20.299) (BRASIL, 2010a).

No Brasil, os envenenamentos por peçonha ofídica geralmente ocorrem em maior número nas épocas de calor e chuvas (LEMOS et al., 2009) e os adultos jovens do sexo masculino (trabalhadores agrícolas entre 15 e 49 anos) são os mais acometidos (BERNARDE, 2011; BOCHNER; STRUCHINER, 2003; BRASIL, 2010), além de mulheres e crianças que moram em áreas rurais (GUTIÉRREZ, 2011; LEMOS et al., 2009). Os membros inferiores foram os mais atingidos pelas picadas, em cerca de 75% dos casos observados (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; LEMOS et al., 2009). De acordo com dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), há variações significativas no número de acidentes por região brasileira, com o Norte, Sudeste e Nordeste tendo o maior número de casos de acidentes por serpentes, com 88.727; 81.763 e 79.494 acidentes respectivamente (Figura 12) (dados englobando os anos de 2000 a 2011).

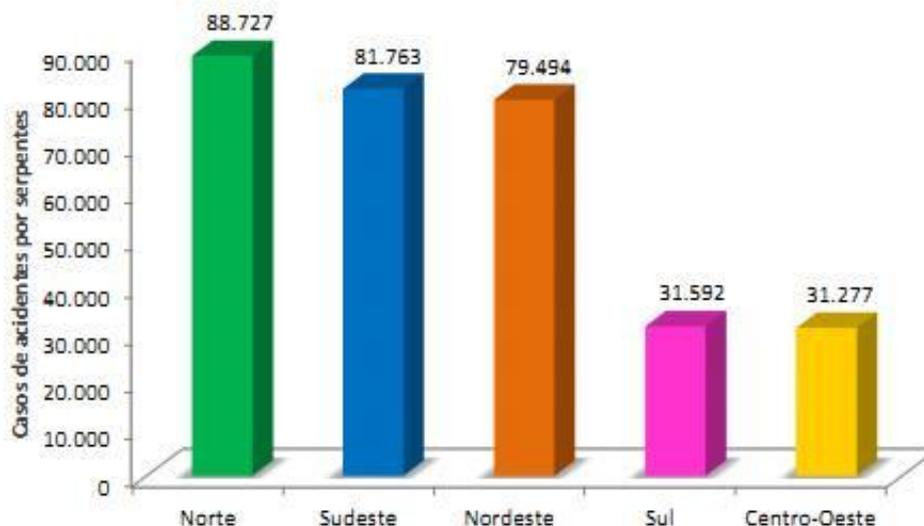


Figura 12. Total de casos de acidentes por serpentes por região do Brasil (Norte, Sudeste, Nordeste, Sul e Centro-Oeste). O gráfico engloba dados obtidos de 2000 a 2011. Fonte: Sinan/SVS/MS – atualizado em 21 jun. 2012.

1.7 CLASSIFICAÇÃO DAS PEÇONHAS OFÍDICAS

As peçonhas podem ser classificadas como neurotóxicas e hemorrágicas de acordo com o maior efeito tóxico promovido durante o envenenamento (CALVETE et al., 2005). Elas também podem ser divididas em quatro categorias de acordo com o gênero da serpente ao qual pertencem: (a) peçonha crotálica, (b) peçonha botrópica, (c) peçonha elapídica e (d) peçonha laquética.

1.7.1 PEÇONHA CROTÁLICA

No Brasil, o gênero *Crotalus* (cascavéis) é representado por uma única espécie, a *Crotalus durissus* (PINHO; PEREIRA, 2001), com ampla distribuição geográfica (BRASIL, 2010b) (atualmente, as cascavéis foram alocadas ao gênero *Caudisona*, e *C. durissus* passou a ser denominada de *Caudisona durissa*) (BERNARDE, 2011).

A peçonha crotálica (Figura 13) produz dor e edema discretos e restritos ao redor da picada (BRASIL, 2010b). Possui atividade neurotóxica, causando paralisia da musculatura esquelética, levando a um quadro de insuficiência respiratória aguda (DAMICO

et al., 2005); atividade coagulante, provocando sangramentos e distúrbios da coagulação e atividade miotóxica sistêmica, podendo evoluir para insuficiência renal aguda (PINHO; PEREIRA, 2001). Sabe-se que a peçonha da subespécie *C. d. ruruima* apresenta ações hemorrágicas e proteolíticas com sintomatologia diferente das subespécies de outras regiões do Brasil, não sendo bem neutralizada pelo soro anticrotálico (BERNARDE, 2011). A subespécie *C. d. durissus* tem uma peçonha bastante neurotóxica e que também acarreta em miotoxicidade sistêmica, podendo causar desfibrinogenação e insuficiência renal aguda (GUTIÉRREZ, 2011).

O complexo crotoxina é o componente mais abundante na peçonha crotálica (65% da composição desta peçonha) (DA CUNHA; MARTINS, 2012) e é formado por 2 subunidades: A (ácida), denominada crotapotina, e B (básica) com alta atividade fosfolipásica denominada crotactina (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978). A crotoxina possui ação miotóxica e neurotóxica, inibindo a liberação de neurotransmissores, interferindo no processo de neurotransmissão (DA CUNHA; MARTINS, 2012). A peçonha de cascavéis também contém crotamina (uma miotoxina que causa mionecrose do tecido muscular, induzindo a paralisia espasmódica de músculos esqueléticos), convulxina (uma neurotoxina responsável por perda de equilíbrio, alterações gastrointestinais e visuais e convulsões), giroxina (uma glicoproteína tóxica que age no sistema nervoso central levando à lesão do labirinto) (DA CUNHA; MARTINS, 2012) e croftalfina (um potente analgésico que atua em receptores opioides) (KONNO et al., 2008), além de outros componentes.



Figura 13. *Crotalus horridus*. Crotalidae. Fonte: <<http://www.arkive.org/timber-rattlesnake/crotalus-horridus/image-G74090.html>>. Acesso em 09 de dezembro de 2012.

1.7.2 PEÇONHA BOTRÓPICA

O gênero *Bothrops* engloba um grupo de serpentes peçonhentas com cerca de 32 espécies distribuídas em todo o território brasileiro (DA CUNHA; MARTINS, 2012). Atualmente, essas espécies estão distribuídas em cinco gêneros: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis* (FENWICK et al., 2009). A espécie *Bothrops jararacussu* é a segunda maior serpente peçonhenta brasileira (podendo ter mais de 2 metros de comprimento), além de ser a com maior produção e inoculação de peçonha (BERNARDE, 2011).

A peçonha botrópica (Figura 14) é responsável por ações locais e sistêmicas (DE MORAIS et al., 2013; FONSECA et al., 2004). As manifestações locais evidenciam-se pela presença de edema, sangramento, dor severa e equimose na região da picada (BRASIL, 2010; DAMICO et al., 2005; DE MORAIS et al., 2013), podendo ocorrer necrose dos tecidos moles (PINHO; PEREIRA, 2001). As manifestações sistêmicas incluem hemorragias como gengivorragias, hematêmese e hematúria, podendo ocorrer náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e choque (DA SILVA et al., 2012; PINHO; PEREIRA, 2001), contribuindo para a instalação de insuficiência renal aguda (BRASIL, 2010; DE MORAIS et al., 2013). Esses efeitos são mediados por diversas toxinas que agem sinérgica ou individualmente como metaloproteases, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases e enzimas que afetam a cascata de coagulação (mais detalhes dessas toxinas serão apresentados no tópico 1.9) (DE MORAIS et al., 2013).

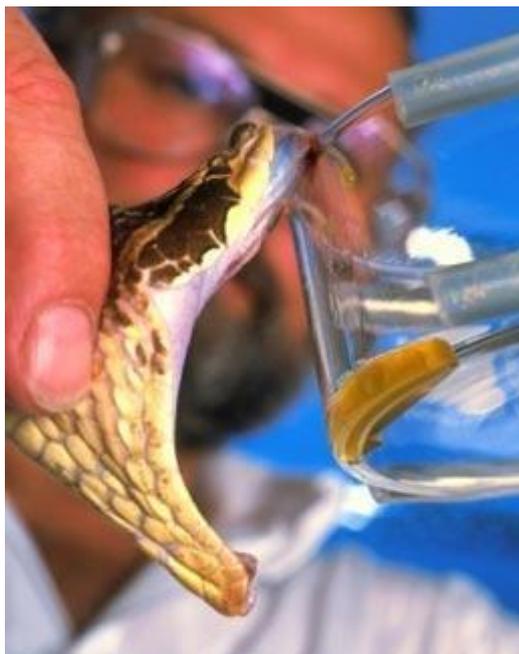


Figura 14. *Bothrops asper*. Viperidae. Fonte: <<http://www.nature.com/news/2008/080716/full/news.2008.954.html>>. Acesso em 09 de dezembro de 2012.

De Moraes et al. (2013), por exemplo, ao fazerem a perfusão de peçonha de *B. leucurus* (10µg/mL) em rins de ratos *Wistar* adultos machos observaram um decréscimo da resistência vascular renal, do fluxo urinário e da taxa de filtração glomerular, assim como a diminuição do transporte de sódio e de cloreto, confirmando a nefrotoxicidade das peçonhas botrópicas. Já Da Silva et al. (2012) purificaram e caracterizaram uma proteína não hemorrágica (BJ-PI2) de *B. jararaca* que tem papel importante na resposta inflamatória e no edema local após o envenenamento por esta serpente, mostrando a migração de células inflamatórias aos tecidos danificados.

1.7.3 PEÇONHA ELAPÍDICA

As corais-verdadeiras estão classificadas em três gêneros: *Leptomicrurus* com três espécies de pequeno tamanho, *Micruroides* (CHACÓN et al., 2012) e *Micrurus* com representantes distribuídos por todo o território brasileiro (BERNARDE, 2011), como a *Micrurus corallinus* (Sudeste, Sul e litoral baiano), a *Micrurus ibiboboca* (interior do Nordeste) e a *Micrurus spixii* (bacia Amazônica) (BRASIL, 2010). Envenenamentos por essas serpentes são relativamente raros devido aos seus hábitos subfossoriais; porém, quando

ocorrem, são graves, provocando paralisia respiratória na maioria das vítimas, 5-6 horas após a picada (CHACÓN et al., 2012; GUTIÉRREZ, 2011; LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009; PARDAL et al., 2010; TANAKA et al., 2010). Um estudo de caso de um jovem de 18 anos, residente em Belém do Pará, picado por uma *M. surinamensis* mostrou que o rapaz apresentou visão borrada, dificuldade de falar, andar e manter os olhos abertos, 20 minutos após o acidente ofídico, apresentando posteriormente uma grande dificuldade ao respirar, precisando ser entubado antes da administração do soro antielapídico (PARDAL et al., 2010). Após aproximadamente 12 horas, o jovem já estava praticamente normal, e após 48 horas ele foi liberado do hospital sem sequelas (PARDAL et al., 2010).

A principal característica da peçonha elapídica (Figura 15) é conter neurotoxinas (TAN; PONNUDURAI, 1992; TANAKA et al., 2010), substâncias de baixa massa molar que são rapidamente absorvidas pelo organismo, produzindo bloqueio neuromuscular (PINHO; PEREIRA, 2001) ao se ligarem aos receptores de acetilcolina (PARDAL et al., 2010). Todavia, já foram reportados casos de que esta peçonha induziu miotoxicidade e lesões no local da picada (CHACÓN et al., 2012; PARDAL et al., 2010; TANAKA et al., 2010).

Diversos estudos mostraram que as peçonhas de *Micrurus* são cardiotoxinas, miotóxicas, hemolíticas, hemorrágicas e edematogênicas, além de poderem apresentar uma ação anticoagulante (CHACÓN et al., 2012; CISCOTTO et al., 2011; TAN; PONNUDURAI, 1992; TANAKA et al., 2010). Leão, Ho e Junqueira-de-Azevedo (2009), ao analisarem o transcriptoma da glândula venenífera de *M. corallinus*, observaram que existem três principais famílias de toxinas nesta peçonha: (a) neurotoxinas, (b) toxinas “*three-finger*”/3FTx e (c) fosfolipases A₂, além de outras toxinas como lectinas tipo C, peptídeos natriuréticos, metaloproteases e LAAOs. Todas essas famílias de toxinas (proteínas) variam consideravelmente de espécie para espécie, indicando a grande complexidade da peçonha elapídica.



Figura 15. *Micrurus fulvius tener*. Elapidae. Fonte: <<http://bugsinthenews.info/?p=1769>>. Acesso em 09 de dezembro de 2012.

1.7.4 PEÇONHA LAQUÉTICA

Os acidentes com o gênero *Lachesis* correspondem a 1,6-2,4% do total de acidentes com serpentes no Brasil (DAMICO et al., 2012; DE PAULA, 2010; STEPHANO et al., 2005). A peçonha laquética (Figura 16) possui ação proteolítica acarretando em lesão tecidual; alta ação coagulante com o desenvolvimento de incoagulabilidade sanguínea (AGUIAR et al., 1996; DE PAULA, 2010; MADRIGAL et al., 2012); ação hemorrágica e ação neurotóxica com estimulação vagal e alterações de sensibilidade (DE PAULA, 2010; PINHO; PEREIRA, 2001).

Apesar de ter baixa toxicidade e atividade letal, se comparada à de outros viperídeos, a peçonha do gênero *Lachesis* é inoculada em grande quantidade no momento da picada (200-400mg), acarretando efeitos extremamente severos no organismo, podendo levar até mesmo à morte (MADRIGAL et al., 2012; STEPHANO et al., 2005). É uma peçonha que pode causar: intensa dor local, sangramento abundante e necrose na região da picada, inchaço, diarreia e dor abdominal, vômito, bradicardia, hipotensão, dor ao tentar engolir, disfagia, falência renal e choque (CAMPOS et al., 2009; DAMICO et al., 2005, 2012; FERREIRA et al., 2009; JORGE et al., 1996; MADRIGAL et al., 2012; OTERO et al., 1998; ROSENTHAL et al., 2002; RUCAVADO et al., 1999; SANZ et al., 2008; STEPHANO et al., 2005).

Diferencia-se da peçonha botrópica por poder causar síndrome da excitação vagal em algumas de suas vítimas (DE PAULA, 2010).



Figura 16. *Lachesis muta muta*. Viperidae. Fonte: RIPA, 2007. Foto por Regina Ripa. *Cape Fear Serpentarium*.

Segundo Ripa (2007), a ação letal da peçonha da surucucu deve-se ao fato de sua habilidade em produzir uma rápida e fatal ‘síndrome de choque’, conhecida como “Síndrome *Lachesis*”, resultando em uma hipotensão irreversível. O único tratamento atual contra o acidente laquético é a administração intravenosa de soro antilaquético ou antibotrópico-laquético (10-20 ampolas) na pessoa acidentada (DE PAULA, 2010).

Ferreira et al. (2009) demonstraram que a peçonha bruta de *Lachesis muta* induz edema de pata em ratos e extravasamento de proteínas do plasma na pele dorsal de ratos, levando à formação de um edema inflamatório no local. Otero et al. (1998), ao analisarem um *pool* da peçonha de *L. m. rhombeata*, comprovaram que este tipo de peçonha leva à indução de atividades hemorrágica, miotóxica, coagulante, proteolítica e formadora de edema. Essa análise foi feita utilizando testes *in vivo* em camundongos *Swiss-Webster*.

Estudos observaram que usualmente a peçonha laquética consome protrombina e fibrinogênio, resultando em uma coagulopatia do tipo ‘Coagulação Intravascular Disseminada’ com um aumento na coagulação e nas quantidades de hemorragia (MADRIGAL et al., 2012).

Por meio de estudos proteômicos, foi visto que a peçonha laquética contém proteínas que afetam fatores da coagulação sanguínea (como ativadores dos fatores V, X e de protrombina, enzimas tipo-trombina, ativadores de proteína C, fosfolipases A_2 e metaloproteases hemorrágicas), que agem na fibrinólise (como enzimas fibrinolíticas e

ativadores de plasminogênio) (DAMICO et al., 2012; JORGE et al., 1996), que produzem hemólise (como lectinas tipo C), e que causam miotoxicidade (como enzimas e proteases especializadas em conjunto com leucócitos e macrófagos do organismo da vítima) (RIPA, 2007). É uma peçonha que também provoca uma ação inflamatória no local da picada, por conter serotonina, óxido nítrico, fosfolipases A₂, metaloproteases e histamina, e que induz um quadro de choque hipotensivo devido à presença de serinoproteases tipo calicreína e cininogenina que liberam bradicinina e calidina ocasionando uma rápida hipotensão (RIPA, 2007).

1.8 GÊNERO DE SERPENTE EM ESTUDO: *LACHESIS* (DAUDIN, 1803)

O gênero *Lachesis* (DAUDIN, 1803), pertencente à família Viperidae, inclui as espécies *Lachesis stenophrys*, *Lachesis melanocephala*, *Lachesis acrochorda* e *Lachesis muta*, sendo esta última subdividida nas subespécies *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata* (FERNANDES; FRANCO; FERNANDES, 2004; MADRIGAL et al., 2012; SANZ et al., 2008; TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008; ZAMUDIO; GREENE, 1997). Este gênero engloba as maiores serpentes peçonhentas das Américas que podem medir de 2,0 a 2,5 metros de comprimento, com o maior espécime descrito chegando a 3,65 metros (AGUIAR et al., 1996; BERNARDE, 2011; DAMICO et al., 2012; DE PAULA, 2010; FERREIRA et al., 2009; JORGE et al., 1996; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2006; MADRIGAL et al., 2012; ROSENTHAL et al., 2002; RUCAVADO et al., 1999).

Popularmente conhecidas como surucutingas, surucucus (do tupi-guaraní, serpentes que atacam muito) (STEPHANO et al., 2005) e surucucus-pico-de-jaca, devido à presença de protuberâncias afiadas em suas peles, que se assemelham à fruta jaca (JORGE et al., 1996), elas são as únicas serpentes neotropicais que põem ovos (Figura 17) (O'SHEA, 2008; SANZ et al., 2008). Sabe-se que quanto maior a temperatura de incubação dos ovos, maior é a quantidade de neonatos fêmeas, e quanto menor essa temperatura, maior a quantidade de neonatos machos, mostrando que a temperatura é um possível influenciador do gênero em *Lachesis* (TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008). Essas serpentes habitam preferencialmente áreas florestais remotas nas Américas do Sul e Central (MADRIGAL et al., 2012).



Figura 17. Um neonato de *Lachesis muta rhombeata* nascendo de um ovo. Fonte: <http://www.lachesisbrasil.com.br/galeria_nsg_en.html>. Acesso em 11 de dezembro de 2012. Foto por Rodrigo Souza.

A espécie *L. stenophrys* é encontrada na costa caribenha da América Central; a *L. melanocephala* tem distribuição restrita no Parque Nacional Corcovado na costa pacífica do sudoeste da Costa Rica e no extremo oeste do Panamá; a *L. acrochorda* habita as costas atlântica e pacífica do oeste do Panamá e o noroeste da Colômbia e do Equador (MADRIGAL et al., 2012) e a *L. muta* é encontrada na América do Sul, desde os Andes até a Colômbia, leste do Equador, Peru, norte da Bolívia, leste e sudeste da Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Brasil (Figura 18) (AGUIAR et al., 1996; ROSENTHAL et al., 2002; SANZ et al., 2008).

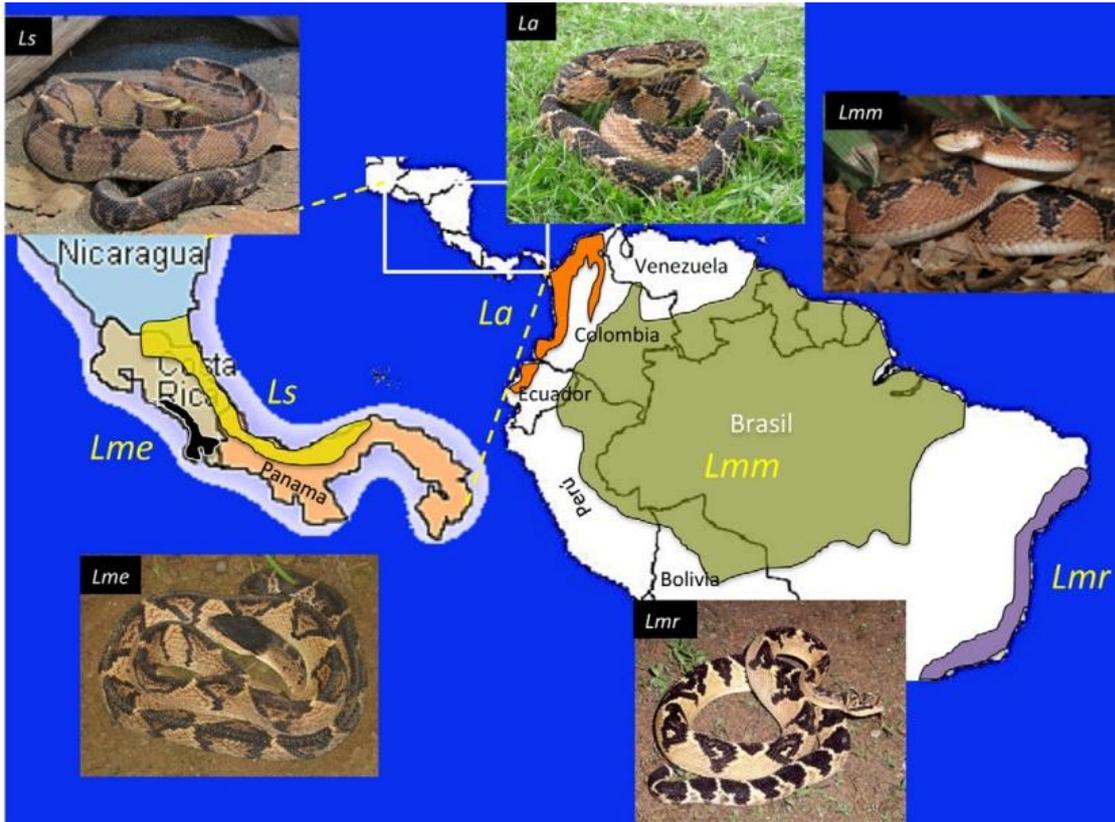


Figura 18. Distribuição geográfica do gênero *Lachesis* nas Américas Central e do Sul. *Ls* = *L. stenophrys* (delimitado em amarelo); *Lme* = *L. melanocephala* (delimitado em preto); *La* = *L. acrochorda* (delimitado em laranja); *Lmm* = *L. muta muta* (delimitado em verde) e *Lmr* = *L. muta rhombeata* (delimitado em roxo). Fotos das serpentes por M. Sasa. Fonte: MADRIGAL et al., 2012.

Zamudio e Greene (1997) utilizando a evolução de DNA mitocondrial como relógio molecular calibrado para ‘taxas reptilianas’, estimaram o tempo em que ocorreram os maiores eventos de divergência entre o gênero *Lachesis*. Seus resultados mostraram que a divergência entre os espécimes das Américas Central e do Sul pode ter ocorrido há 18-6,5 milhões de anos, provavelmente devido ao ‘levantamento’ dos Andes, enquanto que as duas espécies da América Central podem ter divergido há 11-4 milhões de anos devido ao ‘nascimento’ da Serra montanhosa Talamanca que as separa na Costa Rica atualmente. A divergência entre as linhagens da América do Sul só aconteceu há 800 – 300 mil anos (ZAMUDIO; GREENE, 1997). A diferenciação entre as populações de *L. muta* pode ser explicada pelas sucessivas expansões e retrações da floresta Neotropical que ligava as florestas amazônica e atlântica durante certos períodos do Quaternário (MADRIGAL et al., 2012). Fluxo gênico entre populações contíguas ao redor da região do Mato Grosso pode ter prevenido uma total diferenciação entre os grupos amazônico e atlântico de *Lachesis* (MADRIGAL et al., 2012). O grande porte (fácil de ser visualizada), comportamento não

agressivo e baixa densidade fazem com que a *L. muta* esteja envolvida em uma baixa frequência de acidentes (BERNARDE, 2011).

1.8.1 SUBESPÉCIE DE SERPENTE EM ESTUDO: *LACHESIS MUTA RHOMBEATA* (ZAMUDIO; GREENE, 1997)

A subespécie *Lachesis muta rhombeata* (ZAMUDIO; GREENE, 1997), utilizada neste trabalho, é endêmica da Mata Atlântica brasileira, indo do Ceará até o Rio de Janeiro (FERNANDES; FRANCO; FERNANDES, 2004; GIOVANNI-DE-SIMONE et al., 1997; MADRIGAL et al., 2012; OTERO et al., 1998; ROSENTHAL et al., 2002) e está na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção da IUCN (União Internacional pela Conservação da Natureza), sendo classificada como uma subespécie vulnerável devido aos recentes declínios em sua população por culpa da fragmentação de seu habitat original (O'SHEA, 2008; TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008).

Seu corpo apresenta um padrão característico de desenhos em forma de diamante, alternando entre as cores amarela e preta (Figura 19) e sua cauda tem escamas modificadas na ponta, com a presença de um espinho terminal (BREGGE-SILVA, 2011; MELGAREJO, 2003; O'SHEA, 2008).



Figura 19. Padrão corporal característico da serpente *Lachesis muta rhombeata*. Fonte: <www.lachesisbrasil.com.br>. Acesso em 19 de novembro de 2012. Foto por Rodrigo Souza.

A *L. m. rhombeata* possui uma cabeça arredondada diferente dos demais viperídeos, cuja cabeça é mais triangular, e se alimenta de ratos, outros roedores e gambás (O'SHEA, 2008). Seu alimento preferido é o pequeno roedor marrom conhecido como “paca” (*Oryzomys* sp.) (TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008). É uma serpente não agressiva de hábitos noturnos (JORGE et al., 1996) que se move constantemente à procura de presas ‘leves’ (90g) se alimentando mais de uma vez por semana (TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008). As surucucus (*Lachesis*) são serpentes extremamente seletivas com relação à alimentação, e mesmo as que medem mais de 2,4 metros não tentam se alimentar de presas ao redor de 220g (TURNER; CARMICHAEL; SOUZA, 2008).

A surucucu só ataca quando ameaçada. Nesse caso, ela ergue seu corpo, infla seu pescoço e vibra sua cauda, batendo-a no solo (O'SHEA, 2008). Foram reportados somente 25 casos de envenenamento humano por picada de *Lachesis* até meados de 2002 (ROSENTHAL et al., 2002) confirmando a não-agressividade destas serpentes. Os envenenamentos animais também são relevantes, mas não há estatística sobre eles.

1.9 EXEMPLOS DE FAMÍLIAS DE PROTEÍNAS ENCONTRADAS EM PEÇONHAS OFÍDICAS, PRINCIPALMENTE NO GÊNERO *LACHESIS*

1.9.1 SERINOPROTEASES

As serinoproteases são moléculas que atuam principalmente no sistema hemostático da vítima (VITORINO-CARDOSO, 2005). Apesar de compartilharem características estruturais similares, as serinoproteases de peçonhas de serpente possuem um perfil farmacológico altamente diversificado, tendo ação sobre proteínas da cascata de coagulação, na ativação do fator V e da proteína C, na fibrinogenólise, na ativação do plasminogênio e na indução de agregação plaquetária (VILCA-QUISPE, 2010). Elas têm a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas por meio de uma tríade de resíduos formada por histidina, ácido aspártico e serina (His, Asp e Ser ou H, D e S) que se organizam formando um sítio catalítico muito bem caracterizado (DA CUNHA; MARTINS, 2012).

Como exemplos de serinoproteases, temos: (a) enzimas trombina-símile (batroxobina de *B. atrox*), (b) ativadores de fator X presentes nas peçonhas de *B. jararaca* e

B. atrox (DE LIMA et al., 2005), (c) cininogenina (28kDa) presente na peçonha do gênero *Lachesis*, que induz um efeito hipotensivo ao liberar bradicinina do cininogênio (RIPA, 2007), e (d) serinoproteases calicreína-símile presentes nas peçonhas de Viperidae, causando hipotensão na vítima de envenenamento (WARRELL, 2010), dentre outros.

A calicreína é uma serinoprotease encontrada na peçonha de *Lachesis* e, além de causar hipotensão (com o aumento da permeabilidade vascular), ela estimula um quadro inflamatório (FRY et al., 2012) e aumenta a contração da musculatura lisa (WEINBERG et al., 2004). A enzima calicreína-símile LMR-32, purificada da peçonha de *L. m. rhombeata*, induziu edema em camundongos *Swiss* e apresentou um efeito hipotensivo em ratos *Wistar* (GIOVANNI-DE-SIMONE et al., 1997). Felicori et al. (2003) purificaram a serinoprotease LV-Ka da peçonha de *L. m. muta*, uma enzima com atividade calicreína-símile que na concentração de 0,8µg/g (injeção intravenosa) provocou a diminuição da pressão sanguínea em ratos *Wistar*. LV-Ka apresenta atividade liberadora de cinina e ativadora de plasminogênio, mas não tem atividade coagulante (WEINBERG et al., 2004).

1.9.2 FOSFOLIPASES A₂

As PLA₂s ou fosfatidil-acil-hidrolases são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise de fosfolipídios, liberando quantidades equimolares de ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (CHACUR, 2004; DA CUNHA; MARTINS, 2012; LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009). Esse processo libera ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, iniciando uma cascata inflamatória (DA CUNHA; MARTINS, 2012).

As PLA₂s podem ser divididas em cerca de 15 grupos de acordo com suas estruturas, funções e localização (KANG et al., 2011). Os grupos I e II são encontrados em peçonhas de serpentes e consistem de PLA₂s secretórias de baixa massa molar (FERREIRA et al., 2009).

As PLA₂s encontradas em serpentes da família Viperidae apresentam massa molar de 13 a 17kDa, sendo constituídas por aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos contendo 6 ou 7 pontes dissulfeto, e apresentando estruturas de α-hélice e barril-β (CHACUR, 2004; LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009). Estão envolvidas na digestão de presas (CUNHA; FULY; ARAUJO, 2011), e são relacionadas com a paralisia da vítima ao

bloquearem presinápticamente ou destruírem os nervos terminais (WARRELL, 2010), impossibilitando a liberação de neuromediadores (LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009), além de causarem miotoxicidade, hemólise, inflamação, necrose (ao despolarizarem as membranas de células musculares), efeitos plaquetários (CAMPOS et al., 2009; WARRELL, 2010), cardiotoxicidade, citotoxicidade, convulsão, hipotensão (CAMPOS et al., 2009; CISCOTTO et al., 2011; DA CUNHA; MARTINS, 2012) e injúrias na membrana celular (DE MORAIS et al., 2013).

A LmTX-I é um exemplo de PLA₂ básica contendo Asp na posição 49 que foi isolada da peçonha de *L. m. muta* e que induz extravasamento proteico no plasma e edema em pele dorsal e patas de ratos *Wistar*, respectivamente (FERREIRA et al., 2009). LM-PLA₂-I é uma fosfolipase A₂ de *L. muta* que promove a sobrevivência de células ganglionares da retina de ratos *Lister Hooded* e inibe a agregação plaquetária, a indução de edema e a miotoxicidade (CUNHA; FULY; ARAUJO, 2011).

1.9.3 L-AMINOÁCIDO OXIDASES

As L-aminoácido oxidases de peçonhas de serpente (sv-LAAOs) são flavoenzimas (cofator FAD) funcionalmente homodiméricas que catalizam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos com a subsequente produção de α -ceto ácidos, amônia e peróxido de hidrogênio (BREGGE-SILVA et al., 2012; CISCOTTO et al., 2011; DU; CLEMETSON, 2002; FOX, 2013; LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009; MADRIGAL et al., 2012). São largamente distribuídas nas peçonhas de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae e cada subunidade possui três domínios: um domínio de ligação ao FAD, um domínio de ligação ao substrato e um domínio α -helicoidal (Figura 20) (FOX, 2013; LU; CLEMETSON; CLEMETSON, 2005), podendo ser ácidas, básicas ou neutras (DU; CLEMETSON, 2002). Segundo Du e Clemetson (2002), as LAAOs de peçonhas de serpentes têm 110-150kDa quando determinadas por purificação em gel filtração ou 50-70kDa quando determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

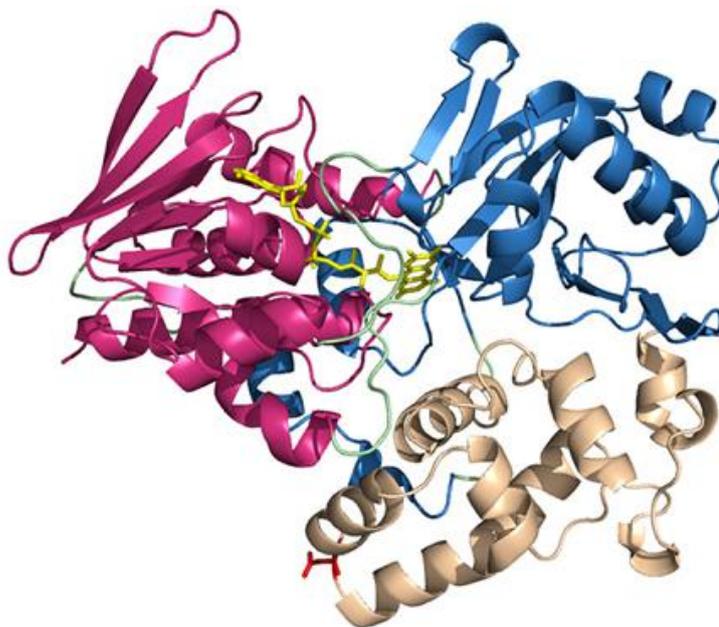


Figura 20. Modelo da estrutura tridimensional de LmLAAO advinda da peçonha de *Lachesis muta*. Os domínios de ligação ao FAD (rosa), de ligação ao substrato (azul) e α -helicoidal (bege) estão representados. A molécula de FAD está representada em amarelo e o sítio de glicosilação (Asn172) em vermelho. Fonte: BREGGE-SILVA et al., 2012.

Estudos observaram que as LAAOs contribuem para a toxicidade da peçonha devido a produção de peróxido de hidrogênio durante a reação de oxidação (MADRIGAL et al., 2012), resultando num *stress* oxidativo (FOX, 2012), e sabe-se que a LAAO de *Bothrops alternatus* (atual *Rhinocerophis alternatus*) induz a agregação plaquetária em humanos através da formação do peróxido de hidrogênio (LU; CLEMETSON; CLEMETSON, 2005), podendo induzir também apoptose celular (WARRELL, 2010) e citotoxicidade. As LAAOs têm uma potente atividade catalítica, tendo um considerável efeito bactericida (KARDONG; WEINSTEN; SMITH, 2009). Induzem ou inibem a agregação plaquetária, possuem atividade anticoagulante, estimulam a formação de edema e do mecanismo de apoptose celular (CISCOTTO et al., 2011). Bregge-Silva et al. (2012) observaram uma leve mionecrose em ratos após a injeção intravenosa de 100 μ g de LmLAAO (LAAO de peçonha de *L. muta*), além da indução de toxicidade em células AGS (adenocarcinoma gástrico, IC₅₀: 22,7 μ g/mL) e em células MCF-7 (adenocarcinoma mamário, IC₅₀: 2,22 μ g/mL).

1.9.4 LECTINAS TIPO C E PROTEÍNAS SIMILARES À LECTINA TIPO C

As lectinas tipo C constituem um grupo de proteínas não enzimáticas que têm a capacidade de se ligarem específica e reversivelmente a alguns carboidratos de uma maneira dependente de Ca^{2+} (DE CARVALHO, 1997; LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009).

Podem ser classificadas em 7 grupos de acordo com suas características estruturais: o grupo I contém um domínio lectina tipo C; o grupo II apresenta um domínio transmembrana; o grupo III contém um domínio colágeno na porção N-terminal e um domínio lectina tipo-C na porção C-terminal; o grupo IV está envolvido na interação de adesão entre os leucócitos e as células endoteliais vasculares; o grupo V apresenta um domínio transmembrana II; o grupo VI contém uma região extracelular com os domínios rico em cisteína e fibronectina; e o grupo VII apresenta um domínio que reconhece carboidratos (OGAWA et al., 2005).

As lectinas tipo C de peçonhas de serpentes estão agrupadas dentro do grupo VII, sendo agonistas ou antagonistas da agregação plaquetária, interferindo nos fatores de coagulação sanguínea (fatores IX e X) e afetando a hemostase e a trombose (OGAWA et al., 2005). Podem ser homodímeros ou heterodímeros compostos por uma unidade A(α) e uma B(β) (OGAWA et al., 2005).

Ligam-se a β -galactosídeos, induzindo agregação plaquetária (DE CARVALHO, 1997; FRY et al., 2012; LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009; WARRELL, 2010), precipitação de polissacarídeos e outras glicoproteínas (KASSAN, 1999) e hemaglutinação dependente de Ca^{2+} *in vitro* (MADRIGAL et al., 2012). Na presença de Ca^{2+} , as lectinas tipo C iniciam processos como a adesão, a aglutinação, a endocitose e a neutralização de patógenos (LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009; OGAWA et al., 2005).

1.9.5 CRISPs

As CRISPs, proteínas secretórias ricas em cisteína, conhecidas antigamente como helveprinas (MCCLEARY; KINI, 2013), são encontradas em uma grande variedade de

tecidos animais, sendo primeiramente descritas em epidídimos de mamíferos (HEYBORNE; MACKESSY, 2010; YAMAZAKI; MORITA, 2004). São polipeptídeos de cadeia única com massa molecular em torno de 20 a 30kDa, apresentando 16 cisteínas altamente conservadas (YAMAZAKI & MORITA, 2004) e são altamente expressas em tecidos pancreáticos, glândulas salivares, tratos reprodutivos e ductos de peçonha de répteis (SUNAGAR et al., 2012).

Estudos relatam que a maioria das peçonhas de serpentes contém pelo menos uma isoforma dessa proteína (HEYBORNE; MACKESSY, 2010). Sabe-se que as CRISPs possuem uma diversidade de atividades biológicas, incluindo inibição de vários tipos de canais iônicos (principalmente os canais para cálcio, potássio e rianodina), indução de hipotermia em presas animais (FRY et al., 2012; HEYBORNE; MACKESSY, 2010), paralisia da musculatura lisa periférica (FRY et al., 2012; WARRELL, 2010; YAMAZAKI; MORITA, 2004) e participação nas respostas inflamatórias (MCCLEARY; KINI, 2013).

Pesquisas realizadas por Yamazaki et al. em 2002 identificaram 4 CRISPs em peçonhas de serpentes: (1) tigrina de *Rhabdophis tigrinus tigrinus*, (2) ablomina de *Gloydius blomhoffi*, (3) triflina de *Protobothrops flavoviridis*, e (4) latisemina de *Laticauda semifasciata*. Em outro estudo, as CRISPs pseudequetonina (*Pseudechis australis*) e pseudecina (*P. porphyriacus*) foram caracterizadas, e observou-se que elas bloqueiam a subunidade- α homotetramérica dos canais cíclicos da retina e do olfato, respectivamente (YAMAZAKI; BROWN; MORITA, 2002).

1.9.6 BPPs

Os BPPs, peptídeos potencializadores de bradicinina, são proteoliticamente liberados a partir de precursores maiores (~180 resíduos) por um processamento do tipo furina (MADRIGAL et al., 2012), e inibem a atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA) (FERNANDEZ; NESHICH; CAMARGO, 2004; KARDONG; WEINSTEIN; SMITH, 2009; WARRELL, 2010). A ECA cliva o peptídeo vasodilatador angiotensina-I gerando o peptídeo vasoconstritor angiotensina-II, e sua inibição por BPPs leva a um quadro de hipotensão nas vítimas de envenenamento por serpentes (MCCLEARY; KINI, 2013).

Esses potencializadores de bradicinina foram essenciais para o desenvolvimento do primeiro inibidor comercial da ECA, o captopril, utilizado no tratamento

da hipertensão humana (FERNANDEZ; NESHICH; CAMARGO, 2004). Além do captopril, outros medicamentos foram desenvolvidos baseados nestes peptídeos (MCCLEARY; KINI, 2013).

1.9.7 VEGFs

A família proteica VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) engloba 7 membros: VEGF-A, VEGF-B, fator de crescimento placentário (PIGF), VEGF-C, VEGF-D, VEGF viral ou VEGF-E e VEGF de peçonha de serpente ou VEGF-F (YAMAZAKI et al., 2009). Os VEGF-Fs funcionam como potentes fatores de permeabilidade vascular, facilitando a penetração da toxina no corpo da vítima e induzem angiogênese, promovendo a proliferação de células endoteliais *in vitro* (SUTO et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2004; YAMAZAKI et al., 2003). Ligam-se à heparina e também causam hipotensão e choque (FRY et al., 2012). São altamente variáveis em estrutura e função entre as diferentes espécies de serpentes (YAMAZAKI et al., 2009).

Os VEGFs possuem 8 resíduos de cisteína que formam um “nó” de cistina, estrutura conservada em todos os membros da família (YAMAZAKI et al., 2009). Possuem como receptores o VEGFR-1 (ou Flt-1), o VEGFR-2 (ou KDR), o VEGFR-3 (ou Flt-4) e como correceptores, a neuropilina-1 (NP-1) e a heparina (MCCLEARY; KINI, 2013; YAMAZAKI et al., 2003, 2009).

Yamazaki et al. (2003) identificaram e caracterizaram dois VEGFs, vamina (110 resíduos de aminoácidos) (Figura 21) e VR-1 (109 resíduos) das peçonhas das serpentes *Vipera ammodytes ammodytes* e *Daboia russelli russelli*, respectivamente. Eles se ligam com alta afinidade ao VEGFR-2 (YAMAZAKI et al., 2003). A administração intravascular de 0,3µg/g de vamina em cobaias resultou em uma rápida e drástica hipotensão, que chegou ao seu máximo após 3-5 minutos (YAMAZAKI et al., 2003). Também foram descritos o *Tf*-svVEGF e o *Pm*-VEGF, VEGF-Fs das peçonhas de *Trimeresurus flavoviridis* e *Protobothrops mucrosquamatus*. Ambos se ligam preferencialmente ao receptor VEGFR-2, diferentemente de vamina e VR-1 (YAMAZAKI et al., 2009).



Figura 21. Estrutura tridimensional da vamina, um VEGF-F encontrado na peçonha de *Vipera ammodytes ammodytes*, obtida por cristalografia de raios-X. Fonte: MCCLEARY; KINI, 2013. Modificado de SUTO et al., 2005.

1.9.8 METALOPROTEASES

As metaloproteases de peçonhas de serpente (SVMPs) são enzimas zinco-dependentes (DA CUNHA; MARTINS, 2012) que induzem principalmente hemorragia (MARKLAND JR; SWENSON, 2013) ao afetarem diretamente os capilares dos vasos sanguíneos e suas interações com as células endoteliais (DE LIMA et al., 2005). São classificadas em três classes (P-I a P-III) de acordo com seu tamanho (massa molar) e sua organização estrutural, ou seja, em relação aos domínios adicionais ao domínio metaloprotease (Figura 22). As SVMPs da classe P-I (20-30kDa) possuem apenas o prodomínio e o domínio metaloprotease que contém um sítio de ligação ao metal e um sítio catalítico para a atividade de proteinase (SANCHEZ et al., 2003). As P-II (30-60kDa) contêm o prodomínio, o domínio metaloprotease e um domínio desintegrina adicional onde se encontra a sequência adesiva K/RGD capaz de se ligar a integrinas de plaquetas ou células endoteliais (DA CUNHA; MARTINS, 2012; DA SILVA et al., 2012; FOX; SERRANO, 2008b; LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009). E as P-III (60-100kDa) apresentam o prodomínio, o domínio metaloprotease e um domínio tipo-desintegrina, contendo a sequência adesiva D/ECD ligada ao domínio denominado de rico em cisteína (DA

SILVA et al., 2012; FOX & SERRANO, 2008b; MARKLAND JR; SWENSON, 2013). Alguns autores também consideram a existência da classe P-IV que engloba as SVMPs que possuem o domínio metaloprotease e os domínios adicionais tipo desintegrina, rico em cisteína e lectina tipo C (DA CUNHA; MARTINS, 2012; MARKLAND JR; SWENSON, 2013), enquanto outros consideram essa classe uma modificação pós-traducional da classe P-III, classificando-a dentro desta (MARKLAND JR; SWENSON, 2013). O domínio metaloprotease contém a sequência conservada de aminoácidos HEXXHGXHD e um “*Met-turn*”, uma estrutura com um resíduo Met conservado que forma uma base hidrofóbica para as três histidinas ligantes de zinco da sequência conservada (DA SILVA et al., 2012).

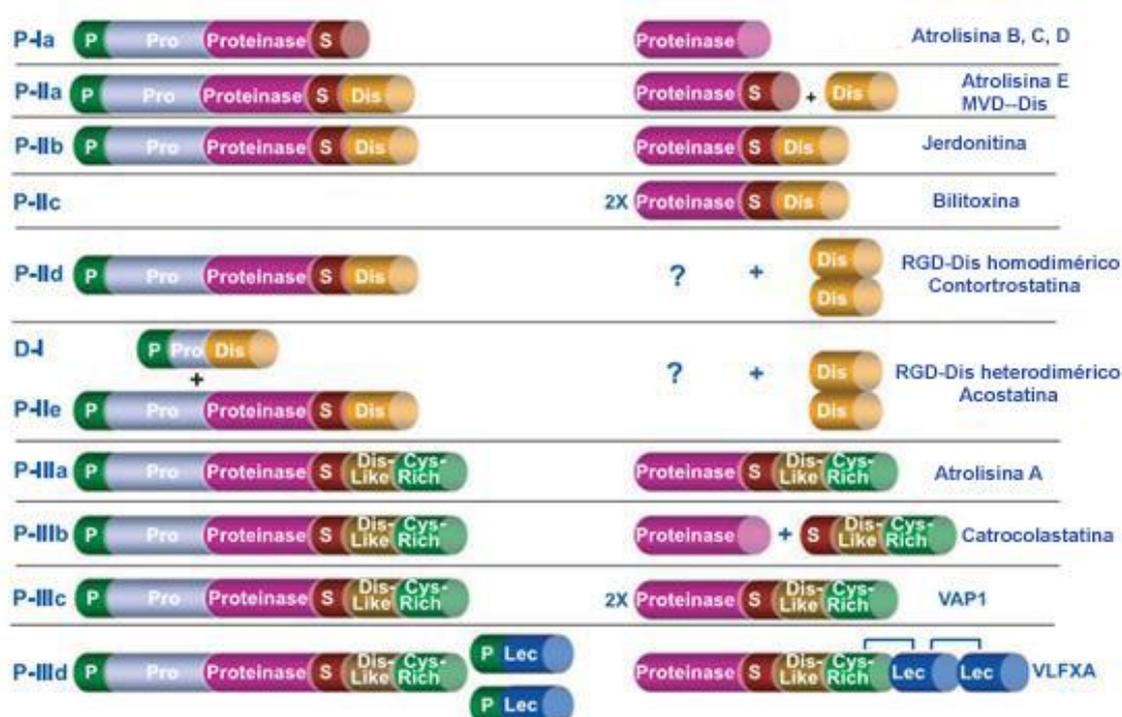


Figura 22. Representação esquemática das classes de SVMPs. Os pontos de interrogação (?) indicam que o produto processado ainda não foi identificado na peçonha. Fonte: modificado de FOX; SERRANO, 2008.

As metaloproteases também podem causar proteólise da matriz extracelular, perturbações entre a matriz e a célula (DE MORAIS et al., 2013) e o rompimento da membrana basal celular (AVILA et al., 2011). Elas possuem atividade fibrin(ogen)olítica e apoptótica, agem como ativadores de protrombina, ativam o fator X de coagulação sanguínea, inibem a agregação plaquetária, são próinflamatórias e inativam os inibidores de serinoproteases (MARKLAND JR; SWENSON, 2013).

Foram encontradas duas metaloproteases na peçonha de *L. m. muta*: LHF-I e LHF-II, correspondentes à mutalisina-I (classe P-IV) e mutalisina-II (classe P-I) (AVILA et al., 2011). As mutalisinas degradam componentes da matriz extracelular como o fibrinogênio, a laminina, a fibronectina e o colágeno tipo-IV, causando hemorragia local e sistêmica (RIPA, 2007). Estudos mostraram que a mutalisina-I inibe seletivamente a agregação plaquetária induzida por colágeno (AVILA et al., 2011), e produz edema e inflamação (RIPA, 2007). Sanchez et al. (2003) mostraram que a mutalisina-II degrada fibrina e fibrinogênio *in vitro*, clivando preferencialmente as cadeias A α .

As SVMPs podem variar de aproximadamente 11% a 65% da quantidade de proteína total presente na peçonha de um viperídeo, mostrando a grande importância dessas proteases (MARKLAND JR; SWENSON, 2013).

1.9.9 DESINTEGRINAS

As desintegrinas são peptídeos derivados do processamento proteolítico das SVMPs (BJARNASON; FOX, 1994). Possuem baixa massa molar e têm de 40-100 aminoácidos (CALVETE, 2013; DA CUNHA; MARTINS, 2012). Apresentam em sua estrutura uma alça saliente de 11 resíduos de aminoácidos na porção C-terminal que ajuda a expor a sequência de um tripeptídeo ativo, possibilitando a interação com integrinas reconhecedoras desse motivo (CALVETE, 2013; FUJI et al., 2003). Assim, as desintegrinas bloqueiam a ligação das integrinas (proteínas da superfície celular) com outras células, interferindo nos processos de proliferação, diferenciação e ativação celular (CALVETE, 2013; DA CUNHA; MARTINS, 2012). Ao se ligarem às integrinas α Ib β 3, α v β 3 e α 5 β 1, as desintegrinas podem ser utilizadas como agentes terapêuticos na trombose arterial, na angiogênese, na metástase tumoral, na inflamação e em outras doenças relacionadas às integrinas (HUANG⁶, 2010 apud CALVETE, 2013).

Funcionalmente, podem ser divididas em três grupos de acordo com as integrinas pelas quais têm afinidade e pela presença de motivos ativos específicos (Figura 23) (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006). O primeiro grupo engloba as desintegrinas que contém o motivo RGD (bloqueiam α 8 β 1, α 5 β 1, α v β 1, α Ib β 3 e α v β 3) e as com motivos similares

⁶ HUANG, T.-F. The Discovery of disintegrins. In: **Toxins and Hemostasis: from Bench do Bedside**. Springer, Amsterdam, p. 269-284, 2010.

KGD (bloqueiam $\alpha_{IIb}\beta_3$), MVD (bloqueiam $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_v\beta_3$), MGD (bloqueiam $\alpha_5\beta_1$) e WGD (bloqueiam $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_v\beta_3$); o segundo grupo é representado pelas desintegrinas com motivo MLD que interagem com as integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$ e $\alpha_9\beta_1$; e o terceiro grupo, consiste de desintegrinas com os motivos KTS e RTS, potentes inibidores seletivos da integrina $\alpha_1\beta_1$ (CALVETE, 2013; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006).

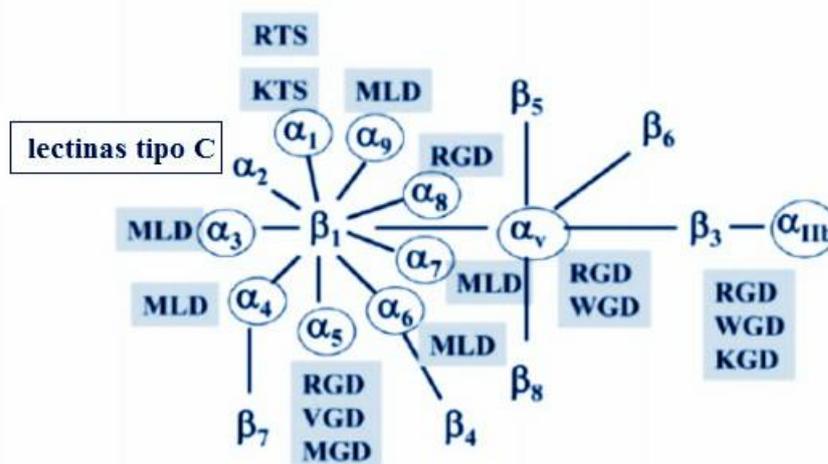


Figura 23. Diagrama mostrando as integrinas e os diferentes motivos (tripeptídeo) de desintegrinas que se ligam a elas, bloqueando suas interações específicas a outros ligantes. Os heterodímeros de integrinas antagonizadas pelas desintegrinas de peçonhas de serpentes estão circunscritos. Modificado de: CALVETE, 2013.

As desintegrinas com o motivo RGD bloqueiam a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, inibindo a agregação plaquetária e contribuindo para o efeito hemorrágico provocado pelas SVMPs (GOULD et al., 1990). Isso foi visto pela primeira vez por Huang et al. (1987) ao caracterizarem a desintegrina trigamina da peçonha de *T. gramineus*. A trigamina liga-se à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas, inibindo a ligação desta ao fibrinogênio, sendo utilizada como um potente agente antitrombótico ao prolongar o tempo de sangramento (HUANG et al., 1987). Outro exemplo é a DisBa-01, uma desintegrina recombinante de 12kDa com motivo RGD, que foi isolada de uma biblioteca de cDNA construída a partir de RNAs mensageiros (RAMOS, 2005) da glândula venenífera da serpente brasileira *Rhinocerophis alternatus* (FENWICK et al., 2009; KAUSKOT et al., 2008; NUNES, 2006; RAMOS, 2005; RAMOS et al., 2008). Pesquisas indicaram que a DisBa-01 tem forte ligação com integrinas β_3 (KAUSKOT et al., 2008; RAMOS et al., 2008), principalmente com a $\alpha_v\beta_3$ e a $\alpha_{IIb}\beta_3$, que estão envolvidas, respectivamente, na formação de tumores e trombose (RAMOS, 2005), mostrando a potente atividade antimetastática, antiangiogênica e antitrombótica desta desintegrina (KAUSKOT et al., 2008).

Também foi observada a existência de desintegrinas P-III, ou desintegrinas-símiles, que apresentam em sua alça o motivo XCD (normalmente D/ECD). As desintegrinas-símiles reconhecem a integrina $\alpha_2\beta_1$, ligante de colágeno (MAHIMKAR et al., 2005; ZHOU et al., 2001). Um exemplo é a alternagina-C (ALT-C) de *R. alternatus*, que tem o motivo ECD e foi descrita inicialmente por Souza et al. (2000), uma forte indutora da proliferação de HUVECs *in vitro* (COMINETTI et al., 2004).

As desintegrinas também podem ser divididas em quatro subfamílias de acordo com seu tamanho (40-100 resíduos) e número de pontes dissulfeto (4-8): desintegrinas grandes (84 resíduos de aminoácidos e 7 pontes dissulfeto), médias (~70 resíduos de aminoácidos e 6 pontes dissulfeto), homo e heterodiméricas (~67 resíduos e 4 pontes dissulfeto), e pequenas (41-51 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto) (CALVETE et al., 2003; CALVETE, 2013).

1.10 PROTEÔMICA: FERRAMENTA CHAVE PARA O MAIOR CONHECIMENTO DA PEÇONHA DE SERPENTES

O conhecimento da composição proteica (proteoma) de uma peçonha auxilia nos estudos de variações ontogenética, individual e geográfica envolvendo as serpentes, possibilitando um melhor efeito no tratamento dos acidentes ofídicos e na seleção de espécimes para a geração de eficientes antídotos contra o envenenamento (CALVETE, 2011a, 2011b; GUTIÉRREZ, 2011; MENDOZA, et al., 2009).

Observou-se através de estudos proteômicos que a composição da peçonha sofre alterações durante o desenvolvimento da serpente, ocorrendo uma grande variação nas concentrações das toxinas com o passar do tempo (MADRIGAL et al., 2012). Isso reflete no tipo de sintomatologia apresentado após um acidente ofídico, sendo essencial esse conhecimento para o correto tratamento da vítima. Gutiérrez et al. (1990) reportaram um aumento de toxinas proteolíticas, hemorrágicas e miotóxicas, principalmente metaloproteases e fosfolipases A_2 , em serpentes adultas de *Lachesis* quando comparadas com as neonatas e juvenis. Madrigal et al. (2012) descreveram mudanças ontogenéticas na peçonha de *L. stenophrys* de uma peçonha rica em serinoproteases em neonatos para outra rica em metaloproteases em adultos. Ripa (2007) mostrou que neonatos e juvenis de *L. melanocephala* apresentam uma peçonha rica em liberadores de bradicinina (vasodilatador)

como proteases tipo calicreína e cininogenina, sendo responsáveis pela síndrome de choque e provável morte de suas presas/vítimas. Essas proteases estão em maiores quantidades em neonatos/juvenis, enquanto a peçonha de serpentes adultas apresenta mais proteases hemorrágicas como a mutalisina-II (metaloprotease) e fosfolipases A₂, as quais estão ausentes ou em menor quantidade, respectivamente, em neonatos/juvenis (RIPA, 2007). Esses estudos contribuem para um melhor conhecimento da peçonha de serpentes com relação à sua ontogenia, o que possibilita um tratamento mais adequado para a vítima picada por uma serpente neonata, juvenil ou adulta desse gênero.

É de suma importância estudar os componentes proteicos presentes na peçonha ofídica, pois a partir deles novos fármacos poderão ser desenvolvidos para o tratamento de diversas doenças como, cânceres e doenças relacionadas às perturbações da homeostase do organismo (ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2006). Crescenti et al. (2003) ao administrarem 4ng/mL de peçonha de *Lachesis muta* em combinação com Mn²⁺, Zn²⁺ e Se²⁺ (4µg/mL cada) em camundongos *nude* que desenvolveram tumores, comprovaram que a peçonha desta serpente inibe o crescimento tumoral e a angiogênese, induzindo apoptose e modulando a atividade de enzimas antioxidantes. Posteriormente, em 2011, utilizando o mesmo procedimento de 2003, Crescenti et al. observaram que a combinação entre oligoelementos e a peçonha de *L. muta* inibe o dano histológico no intestino delgado de ratos machos *Sprague-Dawley*, restaurando o número de criptas e o peso das vilosidades intestinais que foram diminuídos previamente por radiação gama. Sanz et al. (2008) também observaram que a administração subcutânea de 4ng/ml (num total de 0,5mL) da peçonha de *L. muta* aumenta a sobrevivência de ratos com tumores em 37 dias (de 66 para 103 dias), quando comparada com a de animais controle não-tratados. Esses pesquisadores também comprovaram que a peçonha desta espécie inibe em 50-70% a proliferação celular nas linhagens celulares MDA-MB-231 (câncer de mama), MCF-7 (câncer de mama), PANC-1 (carcinoma pancreático), WM35 (melanoma), HT168 (melanoma) e U937 (linfoma histiocítico).

Além disso, o proteoma da peçonha é uma grande ferramenta em estudos envolvendo a Sistemática de serpentes (ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008), podendo facilitar a classificação de espécimes dentro de subespécies, espécies, gêneros, etc. A composição da peçonha tende a refletir a história evolutiva dos taxa relacionados e permite a diferenciação entre espécies relacionadas e a elucidação de linhagens filogenéticas (ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008; GUTIÉRREZ, 2011). Nawarak et al. (2003) usando várias técnicas proteômicas, analisaram as peçonhas de 10 espécies de serpentes das

famílias Elapidae e Viperidae, o que revelou diferenças específicas nas proteínas das peçonhas intraespécies, assim como entre espécies e famílias.

Outra contribuição deste tipo de estudo diz respeito ao entendimento de como as peçonhas funcionam, quais proteínas estão relacionadas com quais tipos de ação no organismo da vítima e como utilizar algumas dessas mesmas proteínas no retardo do envenenamento. Esse entendimento, conhecido como “toxinologia” da peçonha, ajuda-nos a identificar quais os caminhos e as maneiras com que cada componente tóxico contribui para as patologias associadas ao envenenamento (FOX, 2013).

Para que tudo isso ocorra, há a necessidade de avanços na tecnologia e na pesquisa sobre as peçonhas. A proteômica das peçonhas de serpentes tem ajudado no desenvolvimento de métodos importantíssimos, que podem ser utilizados não somente na caracterização dessas peçonhas, como também na análise da capacidade dos soros antiofídicos em neutralizar seus efeitos letal, hemorrágico, miotóxico, coagulante e desfibrinogenante (GUTIÉRREZ, 2011). As técnicas de separação de proteínas de alta performance, como HPLC e eletroforese bidimensional, os sensíveis sequenciadores automáticos de DNA e proteínas e o surgimento da espectrometria de massas, são ferramentas proteômicas essenciais para o estudo da complexa composição da peçonha (Figura 24) (CALVETE, 2011a; ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008; FOX; SERRANO, 2008).

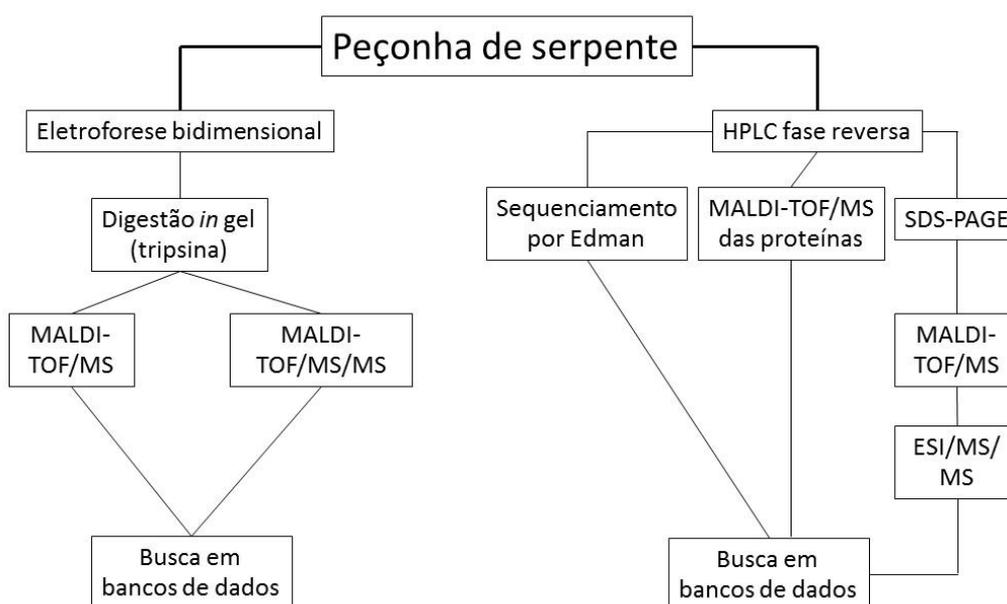


Figura 24. Diagrama mostrando algumas estratégias utilizadas para a análise de proteomas de peçonhas de serpentes. Modificado de: FOX; SERRANO, 2008.

Os primeiros estudos comparativos de peçonhas de Viperidae utilizando eletroforese bidimensional (2D PAGE) associada à espectrometria de massas (LC/MS/MS) ocorreram em 2002, quando Fox et al. compararam as peçonhas de *Crotalus atrox* e *Bothrops jararaca*. Em 2003, Creer et al. demonstraram variações intraespecíficas entre espécimes de *Trimeresurus stejnegeri* por meio de MALDI-TOF/MS e eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Sanz et al. (2008) utilizando HPLC, sequenciamento N-terminal e espectrometria de massas (MALDI-TOF e CID-MS/MS), compararam as peçonhas de *Lachesis muta* e *Lachesis stenophrys*.

Atualmente, a maior dificuldade em estudos proteômicos de peçonhas de serpentes é a correta identificação de suas proteínas devida à falta de bancos de dados com sequências proteicas de peçonhas (FOX; SERRANO, 2008). Poucas espécies de serpentes possuem bancos de dados com sequências proteicas publicadas, o que dificulta a vida do pesquisador neste campo. Porém, avanços estão sendo alcançados com a publicação de transcritomas de glândulas veneníferas de alguns gêneros de serpentes.

Saber a composição da peçonha de uma serpente é tentar elucidar sua variação e assim relacionar essa variação com o habitat, a dieta, a idade e o dimorfismo sexual existente entre espécimes, subespécies, espécies, famílias, entre outros aspectos, permitindo uma maior visualização da importância dessa peçonha nos mais diversos estudos biológicos e biotecnológicos.

Assim sendo, para se ter uma visão mais realista da complexidade de uma peçonha, seu proteoma tem sido estudado por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas das proteínas presentes ou HPLC e sequenciamento proteico (FOX; SERRANO, 2008) de uma forma bem sucedida, provendo resultados bastante favoráveis que podem ser utilizados na comparação de diversos proteomas, além de possibilitarem acesso a proteínas individuais que podem ser relacionadas com certas funções de cunho tóxico na sintomatologia de vítimas acometidas por picadas de serpentes, favorecendo o tratamento antiofídico destas.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve os seguintes objetivos:

Analisar o proteoma da peçonha da serpente *Lachesis muta rhombeata* com o auxílio de técnicas proteômicas (eletroforese bidimensional-2D, espectrometria de massas, FPLC e sequenciamento proteico amino-terminal) e de Bioinformática (BLAST e uso de bancos de dados).

Identificar as principais famílias proteicas presentes neste proteoma.

Correlacionar os resultados obtidos com proteomas de outras serpentes do gênero *Lachesis* encontrados na literatura.

Com isso, espera-se que este proteoma auxilie os mais variados estudos biológicos e biotecnológicos existentes.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DA PEÇONHA DE *LACHESIS MUTA RHOMBEATA*

A peçonha de um espécime de *Lachesis muta rhombeata* foi extraída manualmente, liofilizada e mantida a -20°C até o uso. Esta peçonha foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga da FCFRP-USP. O espécime analisado pertencia ao serpentário Bosque da Saúde de Americana sob o registro de número 647.998, mas tinha como habitat original a Região de Ilhéus, na Bahia.

3.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D SDS-PAGE)

De um total de 5mg de peçonha liofilizada de *L. m. rhombeata*, uma quantidade equivalente a 400µg foi purificada seguindo o protocolo do kit *2-D Clean-Up Kit* (GE *Life Sciences*), para a remoção de sais, sendo ressuspendida em tampão de rehidração-TR (Uréia 8M, CHAPS 3%, IPG *Buffer* pH 3-10 1%, Azul de Bromofenol 0,002%).

Posteriormente, replicatas de 200µg da peçonha foram submetidas à focalização isoeétrica (FI) das proteínas, segundo os seus respectivos pontos isoeletricos, utilizando fitas (*strips*) de 13cm de variação de pI 3-10 (*Immobiline Drystrip* pH 3-10; GE *Life Sciences*) com o auxílio do programa *Ettan™ IPGphor™ 3*.

Após a corrida de eletroforese (EF) na primeira dimensão, as proteínas já separadas pelo pI foram reduzidas e alquiladas por meio de incubação sequencial com solução de equilíbrio (SE) composta de: Tris-HCl 75mM pH 8,8, Uréia 6M, Glicerol 29,3%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0,002%), 10mg/mL de DTT (ditiotreitól) em SE e 25mg/mL de IAA (iodoacetamida). Em seguida, as proteínas foram submetidas à EF em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), cujas concentrações estão descritas na Tabela 3, para a separação segundo suas massas molares, obtendo a segunda dimensão e o perfil proteico (*spots*) da peçonha de *Lachesis muta rhombeata*. As EFs foram realizadas em equipamentos *Hoefler SE 600_{series} Electrophoresis Unit e Electrophoresis Power Supply* – EPS

601. Os géis obtidos foram corados com *Coomassie Phastgel Blue R 0,2%* (GE Life Sciences).

Tabela 3. Reagentes para a preparação do gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) utilizado para eletroforese e obtenção da segunda dimensão do gel 2D.

Concentração final do gel	10%
Solução do monômero	30mL
Tris 1,5mmol/L	22,5mL
SDS 10%	900µL
Água milli-Q	36,20mL
TEMED	29,70µL
Persulfato de amônio 10%	450µL
<i>Volume total</i>	<i>90mL</i>

3.3 DETECÇÃO DOS SPOTS OBTIDOS A PARTIR DO PROTEOMA DA PEÇONHA DE *L. M. RHOMBEATA*

Os géis corados, obtidos após eletroforese bidimensional da peçonha de *L. m. rhombeata*, foram escaneados utilizando o equipamento *ImageScanner* (GE Life Sciences) e o programa *LabScan* (GE Life Sciences) para captura das imagens. Posteriormente, o *software ImageMaster 2D Platinum* (GE Life Sciences) foi utilizado para a detecção dos *spots* proteicos. Esse *software* permite uma precisa detecção e visualização de todos os *spots* de um gel bidimensional, facilitando a seleção desses *spots* para futura extração (recorte manual) e tratamento. Além disso, com a utilização da ferramenta *Scatter Plots* tem-se acesso à reprodutibilidade dos géis, às similaridades existentes entre as replicatas e às informações adicionais como os pIs, as massas molares e as porcentagens de volume de todos os *spots*.

3.4 DIGESTÃO *IN SITU*, no GEL DOS SPOTS PROTEICOS

Os *spots* proteicos detectados e selecionados pelo *software ImageMaster 2D Platinum* (GE Life Sciences) foram extraídos do SDS-PAGE e passaram por uma digestão *in*

situ para posterior análise no espectrômetro de massas. Essa digestão foi realizada segundo Celedon et al. (2007) com algumas modificações.

Os *spots* recortados manualmente foram descorados com lavagens sucessivas utilizando uma solução *Destain* (metanol 50% em ácido acético 2,5%). Posteriormente, eles foram desidratados com 100% de acetonitrila e reduzidos com 10mM de ditiotreitól. Após incubação, esses *spots* foram alquilados com uma solução de IAA 50mM, lavados com bicarbonato de amônio 100mM, desidratados com acetonitrila 100%, rehidratados com bicarbonato de amônio 100mM e desidratados novamente com acetonitrila 100%. A digestão proteica ocorreu com a adição de 20ng/ μ L de tripsina aos *spots* desidratados. Após meia hora essa tripsina foi retirada e os *spots* foram incubados *overnight* com bicarbonato de amônio 50mM à 37°C.

No dia seguinte os peptídeos foram extraídos dos *spots* por meio de soluções de extrações contendo ácido fórmico 5% em água e ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. As amostras peptídicas foram concentradas e armazenadas em -20°C até posterior purificação.

3.5 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PEPTÍDICAS EXTRAÍDAS DOS *SPOTS*

Todas as amostras obtidas foram purificadas utilizando o protocolo da *Reverse-Phase ZipTip C18 Millipore (Zip-Tips)*, para posterior análise pela espectrometria de massas. As *ZipTips* são ponteiros de 10 μ L que contêm ‘*beads*’ de C18 imobilizadas em suas pontas. Elas funcionam como micro colunas de cromatografia de fase reversa (geralmente C18) e são utilizadas para dessalinizar e concentrar os peptídeos antes da análise pela espectrometria de massas.

3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

Após digestão e purificação, as amostras peptídicas obtidas pela eletroforese bidimensional foram analisadas pela determinação de suas massas e sequências por EM em espectrômetro SCIEX TOF/TOF™ 5800 *System* no Laboratório *Max Feffer*, do grupo de

Genética de Plantas da ESALQ, USP-Piracicaba. 1 μ L de cada amostra peptídica (eluída em 50% de acetonitrila) foi misturada a 1 μ L de matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Dessa mistura, 1 μ L foi ‘espotado’ em uma placa própria e o solvente orgânico foi evaporado. Durante a evaporação, a matriz formou pequenos cristais e a amostra peptídica foi incorporada a esses cristais. Após esta etapa, a placa foi levada para dentro do espectrômetro (na fonte iônica MALDI), onde foi ‘atingida’ por laser. A matriz absorveu luz no comprimento de onda do laser, permitindo com que a amostra fosse protonada, gerando íons. Esses íons foram acelerados por alta voltagem até um primeiro analisador (TOF), onde íons de interesse (chamados íons precursores) foram selecionados.

Os íons precursores selecionados passaram por uma célula de colisão (CID), colidindo com moléculas do gás de colisão, sendo fragmentados, produzindo ‘produtos iônicos’. Estes, por sua vez, passaram para um segundo analisador (TOF), onde foram resolvidos e, posteriormente, detectados por um detector que gerou um espectro para cada íon. Cada espectro forneceu dados para a determinação da massa e da sequência peptídica, ressaltando que as massas foram medidas de acordo com o tempo de vôo do íon dentro do tubo de vôo dos analisadores (TOF).

Um espectrômetro do tipo MALDI-TOF/TOF possui uma alta sensibilidade e alta resolução, permitindo uma sensível análise posterior por programas computacionais (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS ORIUNDOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS (BIOINFORMÁTICA)

Os arquivos brutos provenientes das análises obtidas pela EM foram aplicados no programa MASCOT *Sequency Query* (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), utilizando para a identificação dos *spots* o banco de dados *SwissProt*, de alta qualidade, composto de sequências não-redundantes, e que também fornece resultados experimentais.

O MASCOT é uma ferramenta que usa dados de espectrometria de massas para a identificação de proteínas contidas em bancos de dados primários. O *Sequency Query* é uma ferramenta de busca dentro do MASCOT, na qual uma ou mais massas moleculares de

peptídeos são combinadas com dados de sequência e composição, potencializando os ‘*matches*’ nos bancos de dados.

Somente os peptídeos com probabilidade $<0,05$ foram considerados aptos e identificados pelo MASCOT e a busca no *SwissProt* foi realizada no Laboratório *Max Feffer* de Genética de Plantas da ESALQ, USP-Piracicaba, utilizando como especificação taxonômica o banco de dados SNAKES contido no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid8570%5bOrganism:exp%5d>).

Os dados foram organizados em tabelas e gráficos para visualização das principais famílias proteicas presentes na peçonha de *L. m. rhombeata*. Esses resultados foram comparados com os proteomas de peçonhas de outras serpentes do gênero *Lachesis* existentes na literatura.

3.8 FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY (FPLC)

Amostras de 1 a 5mg da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* foram dispersas em 90-100 μ L de uma solução de TFA 0,05% e acetonitrila 5%, centrifugadas a 13.000 \times g por 10 minutos e aplicados em coluna de fase reversa (C18, 250 \times 4,6mm, partículas de 5 μ m, *Vydac*) acoplada ao equipamento *ÄKTA Purifier* UPC-10 (*GE Life Sciences*), utilizando um comprimento de onda igual a 214nm.

A aplicação foi feita seguindo o protocolo de purificação proposto por Sanz et al. (2008) e as amostras eluídas por um gradiente linear de TFA 0,1% em água (solução A) e TFA 0,1% em acetonitrila (solução B) (5% de B por 10 minutos, seguido de 5-15% de B por 20 minutos, 15-45% de B por 120 minutos e 45-70% de B por 20 minutos). Para obtenção do perfil cromatográfico e da tabela de recuperação foi utilizado o programa *Unicorn* 5.0 (*GE Life Sciences*).

3.9 SEQUENCIAMENTO PROTEICO E ANÁLISE DOS DADOS

As frações obtidas pelo fracionamento da peçonha de *L. m. rhombeata* em coluna cromatográfica de fase reversa C18 foram liofilizadas (Liofilizador *Benchtop K*, *Virtis*)

e suas seqüências amino-terminal foram determinadas posteriormente por degradação de Edman em Sequenciador PPSQ-33A, *Shimadzu*.

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados nr (*non-redundant protein sequences*) do NCBI, por meio de buscas utilizando os seguintes termos como organismos-chave: *Lachesis muta rhombeata* e *Lachesis*. Essa análise foi comparada com aquela feita por meio de gel bidimensional e espectrometria de massas, esperando-se uma complementação dos resultados obtidos.

3.10 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)

Um gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) foi feito sob condições redutoras para a visualização da composição proteica da peçonha de *L. m. rhombeata* (Tabela 4).

Com isso, espera-se verificar a idade da serpente utilizada neste projeto devido à maior presença de proteínas hemolíticas e proteolíticas (adultas) ou proteínas causadoras de choque hipotensivo (neonatas-juvenis). Essa análise foi confrontada com os resultados da comparação das peçonhas de serpentes neonatas, juvenis e adultas de serpentes do gênero *Lachesis* obtidos por Ripa (2007).

Tabela 4. Reagentes para a preparação do gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) utilizado para a visualização da composição proteica da peçonha de *L. m. rhombeata*.

Reagentes	Gel de corrida 15%	Gel de empilhamento
Água milli-Q	2,13mL	1,725mL
Acrilamida 30%	2,75mL	300µL
1,5M Tris pH 8,8	1,03mL	-----
1,0M Tris pH 6,8	-----	125µL
SDS 10%	55µL	20µL
Persulfato de amônio 10%	50µL	40µL
TEMED	13µL	12µL

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DA PEÇONHA

Replicatas de 200 μ g de peçonha liofilizada de *L. m. rhombeata* foram preparadas conforme descrito no tópico 3.2. Duas *strips* de 13cm (pI entre 3-10), contendo a mesma amostra, foram submetidas simultaneamente à focalização isoeletrica das proteínas, sendo posteriormente reduzidas, alquiladas e separadas segundo diferenças de massas molares na eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), obtendo-se a segunda dimensão e o perfil proteico (*spots*) da peçonha de *Lachesis muta rhombeata*.

Logo em seguida, os géis bidimensionais foram corados com corante *PhastGel Blue R* 0,2% (20mL) em 54mL de metanol, 18mL de ácido acético e 108mL de água destilada por 1 hora e 30 minutos. Para descorar os géis, foram feitas lavagens sucessivas com solução descorante (etanol 20% em ácido acético 5%). Os géis bidimensionais podem ser vistos nas figuras 25 e 26.

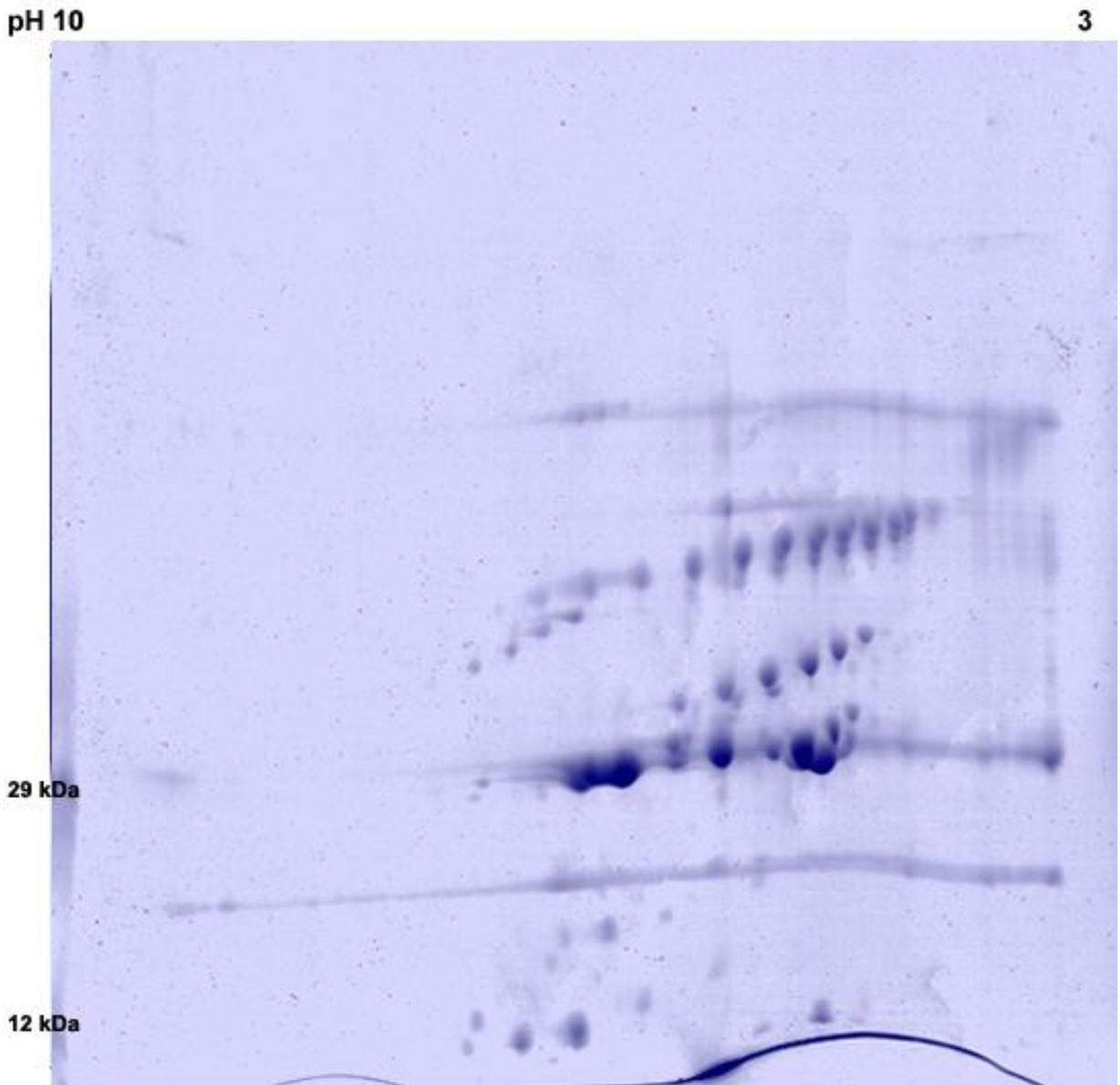


Figura 25. Perfil proteico (*spots*) da peçonha da serpente *L. m. rhombeata* obtido por eletroforese bidimensional-2D. A imagem mostra a replicata 1A. O gel foi corado com *Coomassie Phastgel Blue R* 0,2%. A faixa de pH varia de 3 a 10. Foi visualizado o marcador de massa molar: 29kDa = anidrase carbônica e 12kDa = citocromo C.

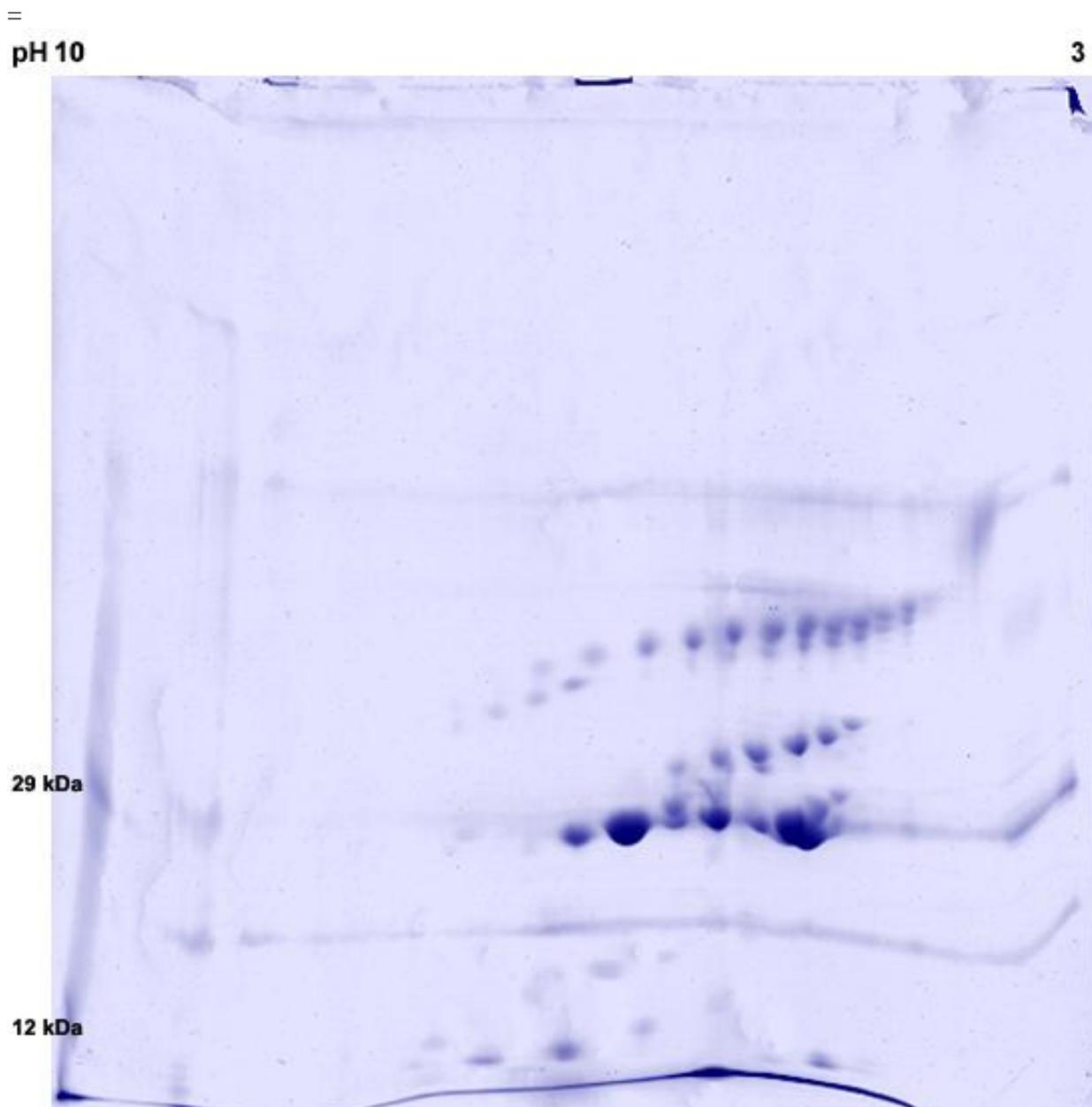


Figura 26. Perfil proteico (*spots*) da peçonha da serpente *L. m. rhombeata* obtido por eletroforese bidimensional-2D. A imagem mostra a replicata 2A. O gel foi corado com *Coomassie Phastgel Blue R* 0,2%.

4.2 DETECÇÃO DOS *SPOTS* OBTIDOS A PARTIR DO PROTEOMA DA PEÇONHA DE *L. M. RHOMBEATA*

Foram detectados e selecionados 111 *spots* por meio do *software ImageMaster 2D Platinum* (GE Life Sciences): 58 no gel bidimensional 1A e 53 no 2A (Figuras 27 e 28).

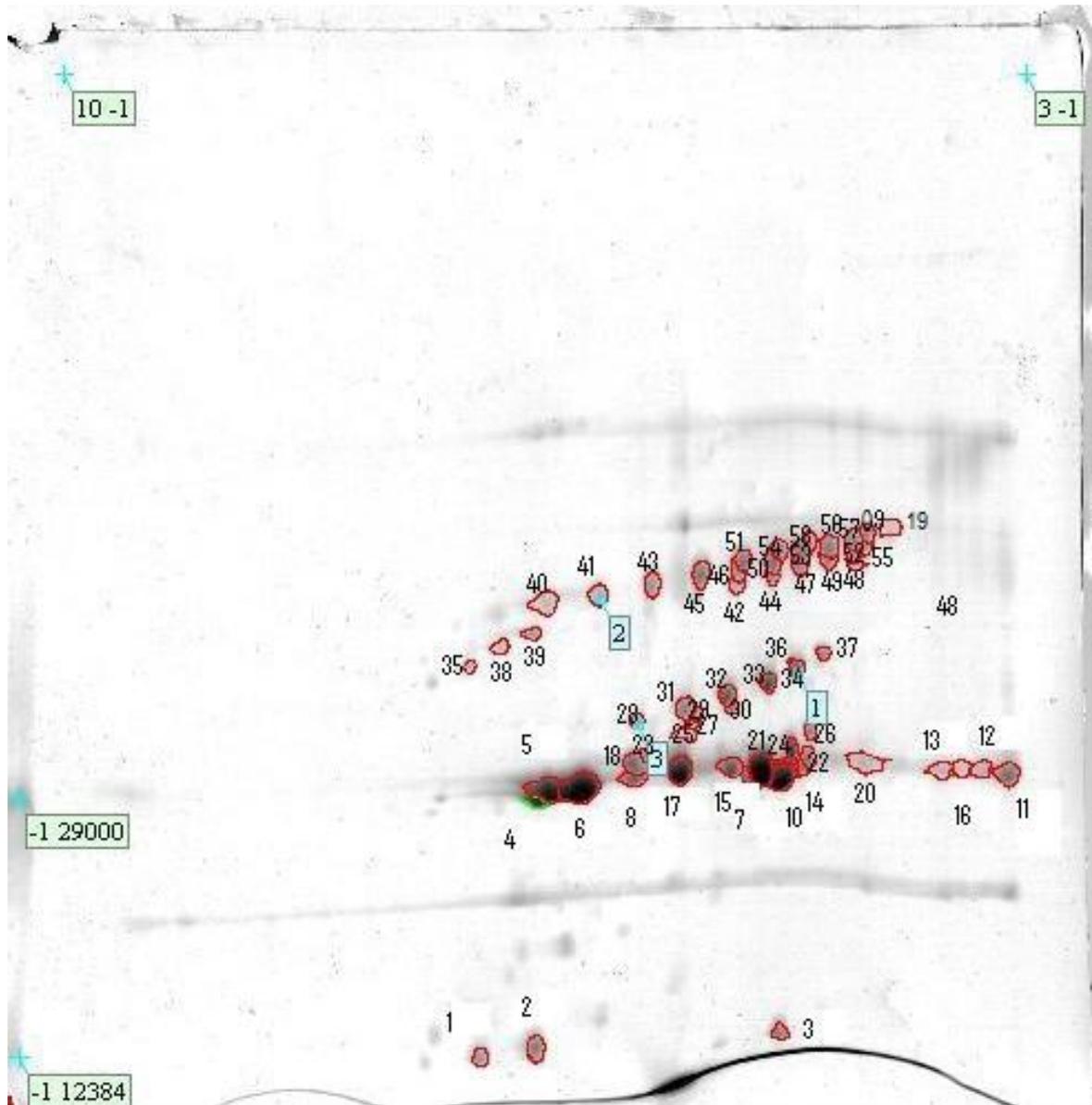


Figura 27. Detecção e seleção dos *spots* proteicos da peçonha da serpente *L. m. rhombeata* por meio do software *ImageMaster 2D Platinum*. Replicata 1A contendo 58 *spots* (marcados de 1 a 58). A faixa de pH varia de 3 a 10. Foi visualizado o marcador de massa molar: 29kDa = anidrase carbônica e 12kDa = citocromo C. Os números 1, 2 e 3 (retângulos azuis) referem-se aos *land markers*.



Figura 28. Detecção e seleção dos *spots* proteicos da peçonha da serpente *L. m. rhombeata* por meio do *software ImageMaster 2D Platinum*. Replicata 2A contendo 53 *spots* (marcados de 61 a 113). A faixa de pH varia de 3 a 10. Foi visualizado o marcador de massa molar: 29kDa = anidrase carbônica e 12kDa = citocromo C. Os números 1, 2 e 3 (retângulos azuis) referem-se aos *land markers*.

Também foi feita uma correlação para mostrar o nível/grau de semelhança entre as duplicatas utilizando o *software ImageMaster 2D Platinum* (GE Life Sciences). A correlação obtida foi de 0,9827, indicando a alta reprodutibilidade do experimento e a grande semelhança entre os dois géis bidimensionais (Figura 29), o que é um resultado ótimo, pois indica a confiabilidade da técnica, após padronizações prévias referentes (1) à quantidade de amostra a ser aplicada nos géis, (2) à purificação da amostra para retirada de sais e outras substâncias, para diminuir o *background* nos géis e (3) à duração das etapas de focalização isoeétrica e eletroforese em gel (SDS-PAGE) para correta separação das proteínas e também para a diminuição do *background*.

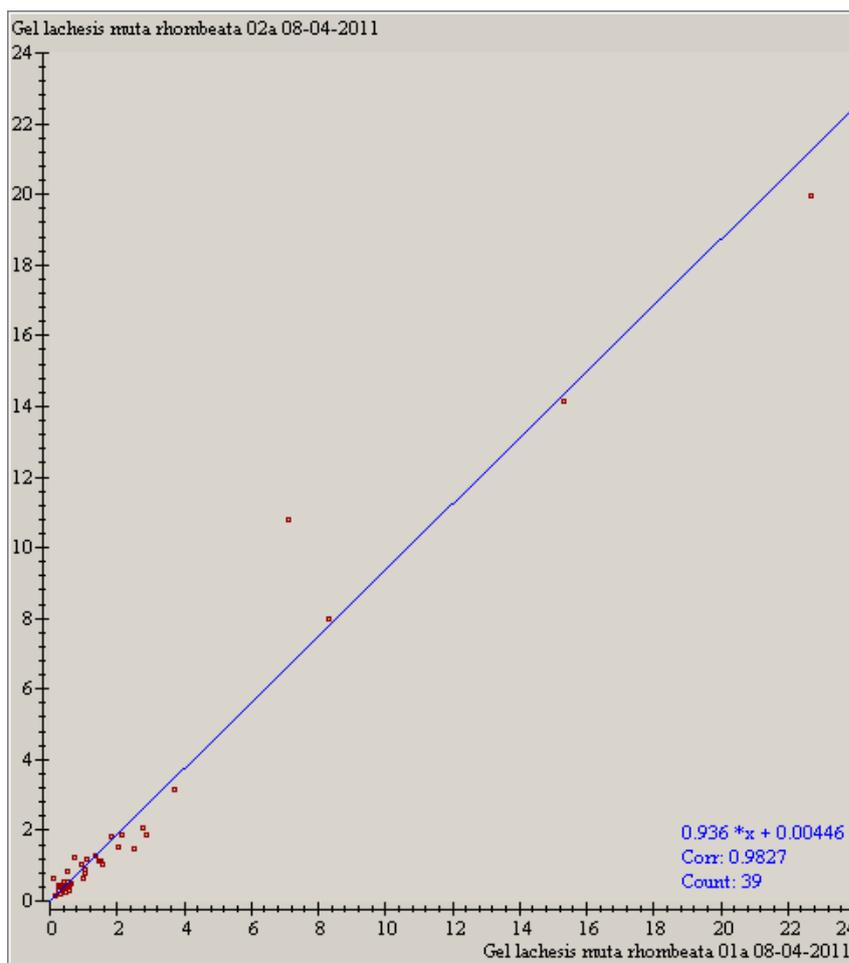


Figura 29. Curva de correlação, obtida por meio do *software ImageMaster 2D Platinum*, entre as replicatas dos géis bidimensionais da peçonha de *L. m. rhombeata*. A correlação de 0,9827 indica uma alta reprodutibilidade experimental.

Os *spots*, preferencialmente selecionados do gel 1A (número de *spots* igual a 58), foram digeridos segundo Celedon et al. (2007) com algumas modificações (tópico 3.4.) e purificados/concentrados por meio de *ZipTips* para posterior análise por espectrometria de massas. As etapas de digestão e purificação/concentração das amostras peptídicas extraídas dos *spots* são críticas para a obtenção de resultados proveitosos e, por isso, foram realizadas minuciosamente, tendo-se o cuidado de evitar ao máximo possíveis contaminações (o uso de máscara, luvas, jaleco e bancadas limpas foi essencial).

4.3 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As 58 amostras peptídicas extraídas, purificadas e concentradas a partir dos *spots* do gel bidimensional 1A da peçonha de *L. m. rhombeata* foram levadas para análise por espectrometria de massas (SCIEX TOF/TOF™ 5800 System) no Laboratório *Max Feffer*, do grupo de Genética de Plantas da ESALQ, USP-Piracicaba. Lá, as amostras foram preparadas conforme citado no tópico 3.6. Apenas 1µL de cada amostra foi ‘espotado’ em uma placa própria para espectrômetros do tipo MALDI (Figura 30) juntamente com 1µL de 3 padrões para calibração do equipamento.



Figura 30. Placa própria para espectrômetros do tipo MALDI onde foram ‘espotadas’ as amostras peptídicas extraídas dos *spots* do gel bidimensional 1A da peçonha de *L. m. rhombeata*. Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Matrix-assisted_laser_desorption/ionization>. Acesso em 17 de dezembro de 2012.

Após todas as etapas de espectrometria citadas no tópico 3.6, os arquivos brutos provenientes das análises dos espectros foram aplicados no programa MASCOT *Sequency Query* (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), utilizando para a identificação dos *spots* o banco de dados *SwissProt* contido dentro do próprio MASCOT e, como especificação taxonômica, o banco de dados SNAKES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid8570%5bOrganism:exp%5d>) contido no site do NCBI. Foram consideradas tolerâncias de $\pm 0,5$ Da para a massa do peptídeo e $\pm 0,5$ Da para os fragmentos de peptídeos obtidos.

Damico et al. (2012) também utilizaram o acoplamento do banco de dados SNAKES juntamente de suas análises, e conseguiram isolar e caracterizar parcialmente uma

fosfolipase A₂ básica (nomeada de LmrTX) da peçonha de *L. m. rhombeata*. Isso mostra que a utilização de um banco de dados categorizado (o banco de dados SNAKES apresenta 35.185 entradas de proteínas tóxicas e não tóxicas de serpentes) em conjunto com o banco estipulado pelo próprio programa de análises (*SwissProt* no MASCOT) delimita a identificação proteica, diminuindo o número de eventuais aleatoriedades. Exemplo ressaltando este aspecto foi obtido numa análise prévia dos 58 *spots* da peçonha de *L. m. rhombeata* realizada durante este trabalho sem a utilização deste acoplamento e os resultados obtidos não foram biologicamente condizentes com o esperado, já que os *spots* foram identificados contendo não apenas proteínas de serpentes e sim dos mais diversos organismos como mamíferos, aves e principalmente bactérias. Com a conjunção do banco de dados SNAKES, a nova análise de identificação dos *spots* desta peçonha forneceu somente resultados significativos, interessantes e de grande valor biológico.

Das 58 amostras analisadas, somente 2 não foram identificadas pelo MASCOT (*spots* de número 16 e 20). As demais foram identificadas e classificadas dentro das famílias proteicas presentes na peçonha de serpentes (Tabela 5).

Tabela 5. Análise por MS/MS e MASCOT (*SwissProt* e banco de dados SNAKES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid8570%5bOrganism:exp%5d>)) das amostras peptídicas extraídas dos *spots* proteicos da peçonha de *L. m. rhombeata*.

Spot no.	Proteína e código de acesso	Identidade com uma proteína encontrada em	Peptídeos correspondentes	Mr (massa calculada)	MS/MS sequência derivada	Família proteica
1	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	6	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720 1928,9720	R.IVEAQSQVVSGAK.Y R.IVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
2	svPLA2 (pdb 4H0Q A)	<i>Trimeresurus stejneri</i>	2	1927,8590 1927,8040	K.EICECDKAAAICFRDNK.D R.YSSNNGDIVCEANNPCTK.E	Fosfolipases A ₂
3	Tipo proteína 14 ligante de RNA (gb AFJ51199.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	5	1314,6680 1314,6680 1712,8628 1712,8628 1750,8863	R.HSPTKAQLDYR.R R.HSPTKAQLDYR.R K.IPTLENMQARNDGVR.S K.IPTLENMQARNDGVR.S R.RLSDSPHAYRHSPTK.A	Proteínas de sinalização intracelular
4	Tipo proteína 14 ligante de RNA (gb AFJ51199.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	5	1314,6680 1314,6680 1712,8628 1712,8628 1750,8863	R.HSPTKAQLDYR.R R.HSPTKAQLDYR.R K.IPTLENMQARNDGVR.S K.IPTLENMQARNDGVR.S R.RLSDSPHAYRHSPTK.A	Proteínas de sinalização intracelular

Tabela 5. Continuação.

Spot no.	Proteína e código de acesso	Identidade com uma proteína encontrada em	Peptídeos correspondentes	Mr (massa calculada)	MS/MS sequência derivada	Família proteica
5	Atragina (gb ACN50006.1)	<i>Naja atra</i>	7	1339,6303 1712,7103 1712,7103 1750,6596 1927,9792 1927,9792 1928,8768	R.DSCFTLNQRTR.G K.CGDGMVCSNRQCVDVK.T K.CGDGMVCSNRQCVDVK.T K.LQHEAQCDSEECCEK.C R.YEFQVNGEPVVLHLER.N R.YEFQVNGEPVVLHLER.N R.DSCFTLNQRTRGCGLCR.M	Metaloproteases
6	Fator tipo VAV2 (gb AFJ52029.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	6	1314,6707 1314,6707 1562,8392 1562,8392 1712,8046 1712,8046	K.YYKTLEEIEK.N K.YYKTLEEIEK.N R.TFLKVCHDKFGLR.N R.TFLKVCHDKFGLR.N R.NSELFDPFDLFDVR.D R.NSELFDPFDLFDVR.D	Proteínas de transdução de sinal
7	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	6	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720 1928,9720	R.IVEAQSQVVSGAK.Y R.IVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
8	DDB1- e CUL4- associados ao fator tipo 13 (gb AFJ49848.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	6	856,5607 1314,7118 1314,7118 1712,8958 1712,8958 1750,8237	M.RVKVLSR.N R.HLPKMIYSQAK.E R.HLPKMIYSQAK.E K.VLSRNPDPHYVRETK.Q K.VLSRNPDPHYVRETK.Q R.FCGTSFFTVDGDDKTVK.H	Fatores associados à DDB1 e CUL4
9	Precursor de cistatina (gb ACR83840.1)	<i>Pseudonaja textilis</i>	5	1298,7194 1298,7194 1417,7864 1417,7864 1928,9720	R.IVEAQSQVVAGAK.Y R.IVEAQSQVVAGAK.Y .MVHSQLPVAAPLR.L .MVHSQLPVAAPLR.L K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
10	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
11	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
12	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	6	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720 1928,9720	R.IVEAQSQVVSGAK.Y R.IVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
13	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	6	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720 1928,9720	R.IVEAQSQVVSGAK.Y R.IVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
14	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	4	1712,9421 1712,9421 1928,9720 1928,9720	K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases

Tabela 5. Continuação.

Spot no.	Proteína e código de acesso	Identidade com uma proteína encontrada em	Peptídeos correspondentes	Mr (massa calculada)	MS/MS sequência derivada	Família proteica
15	Atragina (gb ACN50006.1)	<i>Naja atra</i>	7	1339,6303 1712,7103 1712,7103 1750,6596 1927,9792 1928,8768 1928,8768	R.DSCFTLNQRTR.G K.CGDGMVCSNRQCVDVK.T K.CGDGMVCSNRQCVDVK.T K.LQHEAQCDSEECCEK.C R.YEFQVNGEPVVLHLER.N R.DSCFTLNQRTRGCGLCR.M R.DSCFTLNQRTRGCGLCR.M	Metaloproteases
16	-----	-----	-----	-----	-----	-----
17	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
18	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
19	Oxidoredutase contendo FAD e FMN dependente de NADPH (gb AFJ50115.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	2	1712,8958 1712,8217	R.DQEEKIYVQHRIR.E R.ATLQPEDALSDVPSDR.N	Oxidoredutases
20	-----	-----	-----	-----	-----	-----
21	Fator de crescimento neural-β (gb ACC85834.1)	<i>Pareas hamptoni</i>	4	1340,7452 1340,7452 1734,8397 1927,9487 1927,9487	R.VLFSTQPPPLSR.D R.VLFSTQPPPLSR.D R.NTNQNHPSPKKAEDR.E K.SEDNVPLGSPATSALSDIR.F K.SEDNVPLGSPATSALSDIR.F	NGFs
22	Proteína C5 (gb AEB33426.1)	<i>Naja atra</i>	2	1712,9104 1712,9104	R.RRIEIANLCLNER.Q R.RRIEIANLCLNER.Q	Componentes do complemento
23	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	6	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720 1928,9720	R.IVEAQSQVVSAGK.Y R.IVEAQSQVVSAGK.Y K.ELRIVEAQSQVVSAGK.Y K.ELRIVEAQSQVVSAGK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
24	Tipo proteína 14 ligante de RNA (gb AFJ51199.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	6	1314,6680 1314,6680 1712,8628 1712,8628 1750,8863 1750,8863	R.HSPTKAQLDYR.R R.HSPTKAQLDYR.R K.IPTLENMQARNDGVR.S K.IPTLENMQARNDGVR.S R.RLSDSPHAYRHSPTK.A R.RLSDSPHAYRHSPTK.A	Proteínas de sinalização intracelular
25	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	5	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720	R.IVEAQSQVVSAGK.Y R.IVEAQSQVVSAGK.Y K.ELRIVEAQSQVVSAGK.Y K.ELRIVEAQSQVVSAGK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
26	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	6	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720 1928,9720	R.IVEAQSQVVSAGK.Y R.IVEAQSQVVSAGK.Y K.ELRIVEAQSQVVSAGK.Y K.ELRIVEAQSQVVSAGK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases

Tabela 5. Continuação.

Spot no.	Proteína e código de acesso	Identidade com uma proteína encontrada em	Peptídeos correspondentes	Mr (massa calculada)	MS/MS sequência derivada	Família proteica
27	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
28	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
29	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	5	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720	R.IVEAQSQVVSGAK.Y R.IVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.LTCHFQVSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
30	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
31	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
32	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
33	Tipo proteína 14 ligante de RNA (gb AFJ51199.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	6	1125,6367 1125,6367 1314,6680 1314,6680 1712,8628 1712,8628 1750,8863	R.TRLSPPRGSR.E R.TRLSPPRGSR.E R.HSPTKAQLDYR.R R.HSPTKAQLDYR.R K.IPTLENMQARNDGVR.S K.IPTLENMQARNDGVR.S R.RLSDSPHAYRHSPTK.A	Proteínas de sinalização intracelular
34	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
35	Oxidoredutase contendo FAD e FMN dependente de NADPH (gb AFJ50115.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	2	1712,8958 1712,8217	R.DQEEKIYVQHRIR.E R.ATLQPEDALSDVPSDR.N	Oxidoredutases
36	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
37	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
38	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2

Tabela 5. Continuação.

Spot no.	Proteína e código de acesso	Identidade com uma proteína encontrada em	Peptídeos correspondentes	Mr (massa calculada)	MS/MS sequência derivada	Família proteica
39	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbis</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
40	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbis</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
41	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbis</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
42	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbis</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
43	Tipo proteína 14 ligante de RNA (gb AFJ51199.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	5	1314,6680 1314,6680 1712,8628 1712,8628 1750,8863	R.HSPTKAQLDYR.R R.HSPTKAQLDYR.R K.IPTLENMQARNDGVR.S K.IPTLENMQARNDGVR.S R.RLSDSPHAYRHSPTK.A	Proteínas de sinalização intracelular
44	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbis</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
45	Sequência de glioblastoma (gb AFJ50153.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	4	1314,7190 1314,7190 1562,8529 1562,8529	M.AAGVVLRGSGGCLR.R M.AAGVVLRGSGGCLR.R K.VDPRKDAHSNLLAK.K K.VDPRKDAHSNLLAK.K	Proteínas NipSnap
46	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	5	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421 1928,9720	R.IVEAQSQVVSAGK.Y R.IVEAQSQVVSAGK.Y K.ELRIVEAQSQVVSAGK.Y K.ELRIVEAQSQVVSAGK.Y K.LTCHFQVWSRPWLEK.M	Inibidores de proteases
47	Superbina a (sp P59067.1 PA2 S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbis</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
48	Homólogo C da proteína lin-7 (gb AFJ50480.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	5	840,4341 1126,6710 1126,6710 1340,7234 1340,7234	R.SGEVPPQK.L K.AVELLKAAQGK.V K.AVELLKAAQGK.V .MAALGEPVRLER.D .MAALGEPVRLER.D	Proteínas lin-7
49	Fator de crescimento neural- β (gb ACC85834.1)	<i>Pareas hamptoni</i>	6	1126,6750 1340,7452 1340,7452 1734,8397 1927,9487 1927,9487	.ILIEIWAAAK.S R.VLFSTQPPPLSR.D R.VLFSTQPPPLSR.D R.NTNQNHPSPKKAEDR.E K.SEDNVPLGSPATSALSDIR.F K.SEDNVPLGSPATSALSDIR.F	NGFs
50	Tipo proteína 14 ligante de RNA (gb AFJ51199.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	5	1314,6680 1314,6680 1712,8628 1712,8628 1750,8863	R.HSPTKAQLDYR.R R.HSPTKAQLDYR.R K.IPTLENMQARNDGVR.S K.IPTLENMQARNDGVR.S R.RLSDSPHAYRHSPTK.A	Proteínas de sinalização intracelular

Tabela 5. Continuação.

Spot no.	Proteína e código de acesso	Identidade com uma proteína encontrada em	Peptídeos correspondentes	Mr (massa calculada)	MS/MS sequência derivada	Família proteica
51	Superbina a (sp P59067.1 PA2_S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
52	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	4	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421	R.IVEAQSQVVSGAK.Y R.IVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y	Inibidores de proteases
53	DDB1- e CUL4- associados ao fator tipo 13 (gb AFJ49848.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	6	856,5607 1314,7118 1314,7118 1712,8958 1712,8958 1750,8237	M.RVKVLSR.N R.HLPKMIYSQAK.E R.HLPKMIYSQAK.E K.VLSRNPDPHYVRETK.Q K.VLSRNPDPHYVRETK.Q R.FCGTSFFTVGDDKTVK.H	Fatores associados à DDB1 e CUL4
54	Tipo proteína 14 ligante de RNA (gb AFJ51199.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	7	1125,6367 1125,6367 1314,6680 1314,6680 1712,8628 1712,8628 1750,8863	R.TRLSPPRGSR.E R.TRLSPPRGSR.E R.HSPTKAQLDYR.R R.HSPTKAQLDYR.R K.IPTLENMQARNDGVR.S K.IPTLENMQARNDGVR.S R.RLSDSPHAYRHSPTK.A	Proteínas de sinalização intracelular
55	Superbina a (sp P59067.1 PA2_S_AUSSU)	<i>Austrelaps superbus</i>	4	1298,6084 1298,6084 1712,7320 1712,7320	K.NMIQCANHGRR.A K.NMIQCANHGRR.A R.CCKTHDDCYIEAGKK.G R.CCKTHDDCYIEAGKK.G	Fosfolipases A2
56	Precursor de cistatina (gb ACR83849.1)	<i>Micropechis ikaheka</i>	4	1314,7143 1314,7143 1712,9421 1712,9421	R.IVEAQSQVVSGAK.Y R.IVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y K.ELRIVEAQSQVVSGAK.Y	Inibidores de proteases
57	Fator de crescimento neural-β (gb ACC85834.1)	<i>Pareas hamptoni</i>	6	1126,6750 1340,7452 1340,7452 1734,8397 1928,0214 1927,9487	.ILIEIWAAAK.S R.VLFSTQPPPLSR.D R.VLFSTQPPPLSR.D R.NTNQNHPSPKKAEDR.E K.KAEDREIGSATSIIVDPK.L K.SEDNVPLGSPATSALSDIR.F	NGFs
58	Tipo proteína 14 ligante de RNA (gb AFJ51199.1)	<i>Crotalus adamanteus</i>	5	1314,6680 1314,6680 1712,8628 1712,8628 1750,8863	R.HSPTKAQLDYR.R R.HSPTKAQLDYR.R K.IPTLENMQARNDGVR.S K.IPTLENMQARNDGVR.S R.RLSDSPHAYRHSPTK.A	Proteínas de sinalização intracelular

A tabela 5 possibilitou caracterizar significativamente o proteoma da peçonha da serpente *L. m. rhombeata*. Segundo as técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, esta peçonha englobou 11 famílias proteicas: proteínas lin-7, proteínas *NipSnap*, componentes do complemento, proteínas de transdução de sinal, oxidorrredutases, fatores associados à DDB1 e CUL4, metaloproteases, NGFs, proteínas de sinalização intracelular, inibidores de proteases e, principalmente, fosfolipases A₂ (Figura 31).

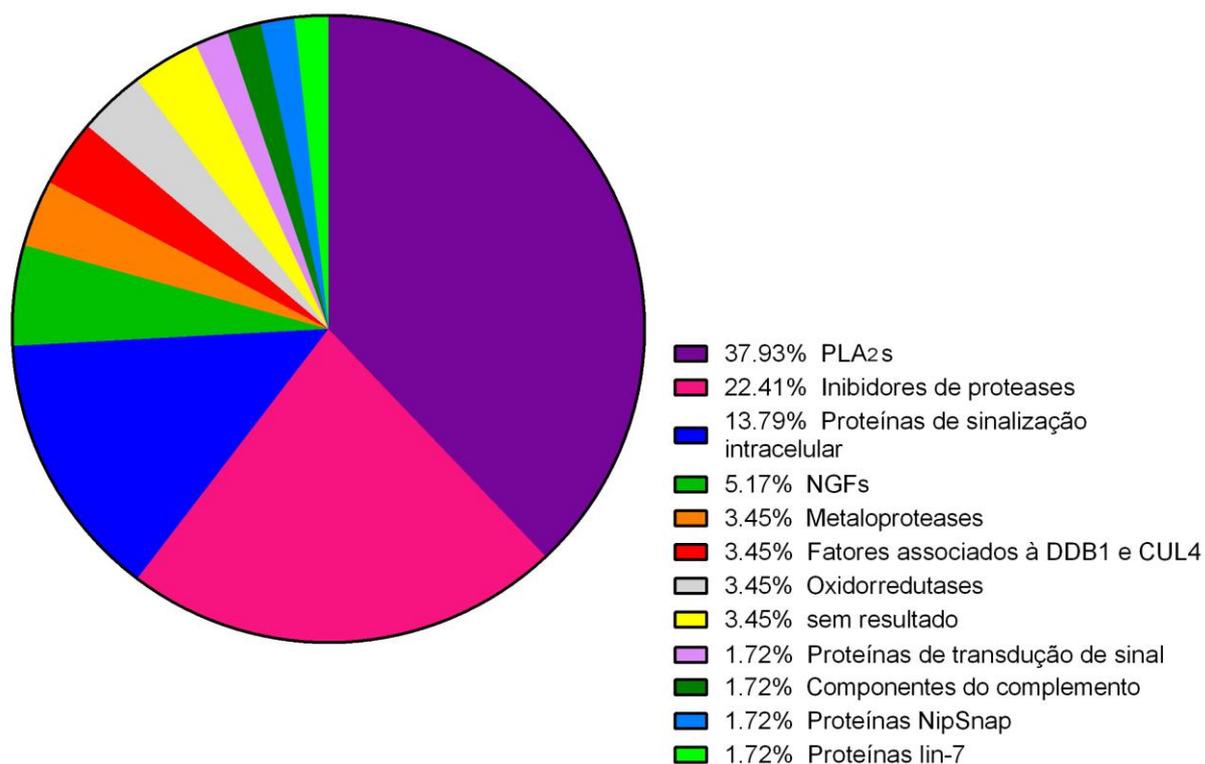


Figura 31. Principais famílias proteicas encontradas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. As fosfolipases A₂ são os principais componentes desta peçonha (37,93% do total).

Como relatado no subtópico 1.9.2, as fosfolipases A₂ estão principalmente envolvidas na paralisação e na digestão de presas, além de provocarem danos miotóxicos, inflamatórios e até mesmo necrose, influenciando negativamente a homeostase dessas presas por meio da inibição da agregação plaquetária. No proteoma analisado por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, as PLA₂s (representadas por svPLA₂ e superbina a) corresponderam a um total de 37,93% (Figura 31), indicando a grande importância dessa família proteica no caso da peçonha da subespécie *Lachesis muta rhombeata*.

Os dois únicos trabalhos apresentando caracterizações de proteomas do gênero *Lachesis* (MADRIGAL et al., 2012 e SANZ et al., 2008) utilizaram *pools* de peçonhas (com mais de um espécime), preocupando-se apenas com as variações ontogenéticas e geográficas entre as espécies, deixando de lado a importância da variação individual entre cada espécime dentro de uma espécie numa determinada região geográfica. Assim sendo, o presente trabalho é único neste quesito, tendo em consideração o gênero *Lachesis*, pois analisou o proteoma de somente um espécime.

No trabalho de Madrigal et al. (2012), as fosfolipases A₂ corresponderam a 13,4%, 14,1%, 2,3% e 8,7% dos proteomas de peçonhas em adultos de *L. melanocephala* (Costa Rica), *L. stenophrys* (Costa Rica), *L. acrochorda* (Colômbia) e *L. m. muta* (Bolívia), respectivamente. O resultado obtido aqui de 37,93% para a *L. m. rhombeata* foi uma surpresa, indicando que ou a serpente em estudo precisa de mais proteínas dessa família para auxiliar na captura e digestão de suas presas já que ela é uma serpente em cativeiro e teve toda uma modificação alimentar se comparada às serpentes que se alimentam livres na natureza, ou a técnica de eletroforese bidimensional ‘mostrou/capturou’ apenas o montante de fosfolipases A₂, sobrepondo-as em relação às outras famílias proteicas.

Uma segunda surpresa obtida foi a da pequena quantidade de metaloproteases (3,45%, representadas pela atragina, uma SVMP inibidora da migração celular) na peçonha de *L. m. rhombeata* (Figura 31). Em Sanz et al. (2008), as SVMPs perfazem de 32-38% dos proteomas de *L. stenophrys* (Costa Rica) e *L. muta* (Bolívia e Peru), sendo responsáveis pela ativação de protrombina, de fator X e pela inibição da agregação plaquetária. Essa pequena quantidade de SVMPs na peçonha estudada também pode ter acontecido devido ao tipo de técnica empregada. Como pode ser visto nas figuras 25 e 26, a maioria dos *spots* se concentra na região mediana dos géis, entre ~25-60kDa, e de acordo com vários estudos proteômicos de peçonhas de viperídeos, a grande porcentagem de SVMPs corresponde aos integrantes da classe P-III (60-100kDa). Em Madrigal et al. (2012), 17,7% do proteoma de *L. acrochorda* foi composto por SVMPs da classe P-III, enquanto que só 5,5% englobou SVMPs de outras classes. No presente estudo, a eletroforese bidimensional não mostrou muitas proteínas de alta massa molar, o que pode ter influenciado na pequena porcentagem de metaloproteases obtida.

A terceira surpresa foi a grande quantidade de inibidores de proteases presente (22,41%) (Figura 31). Esses inibidores, representados pela cistatina na peçonha de *L. m. rhombeata*, inibem proteases, principalmente metaloproteases P-III que contêm cisteína, estando envolvidos na inibição do crescimento, da invasão e da metástase de células tumorais *in vitro* e *in vivo* (XIE et al., 2011).

Há um debate bastante significativo com relação a essa família proteica, pois ela pode ser considerada tanto uma família que engloba proteínas tóxicas, quanto proteínas regulatórias ou essenciais ‘housekeepings’. Richards et al. (2011) comentaram que as cistatinas de peçonhas de serpentes podem promover indiretamente uma toxicidade ao protegerem as proteínas da peçonha da própria serpente contra proteases da matriz extracelular de suas presas; porém, como as cistatinas são secretadas na saliva e as glândulas

veneníferas são glândulas salivares modificadas, esses inibidores também podem ter a função de manter a cavidade oral saudável. Pensando na função primária das cistatinas (conservada entre os mais diversos organismos) de inibição de proteases para proteção de danos teciduais devido à atividade proteolítica desregulada, o presente trabalho sugere que as cistatinas podem auxiliar as serpentes ao protegê-las de suas próprias proteases numa auto picada acidental durante uma captura falha de presas. Assim, essa família de inibidores de proteases seria de grande importância, não só inibindo proteases de presas, mas sim inibindo grandes quantidades prejudiciais de proteases do próprio organismo da serpente.

Outro resultado surpreendente foi a grande porcentagem de proteínas envolvidas com o metabolismo da peçonha de *L. m. rhombeata* e não com a toxicidade em si. A técnica proteômica utilizada influenciou mais uma vez no resultado encontrado: o emprego da eletroforese bidimensional seguido de espectrometria de massas dos *spots* selecionados pode ter de certa forma, contribuído para a maior identificação de proteínas de cunho metabólico e sistêmico.

Cerca de 13,79% do proteoma analisado foram representados por proteínas de sinalização intracelular (Figura 31) que regulam a atividade de fatores de transcrição e de processos celulares em resposta a sinais de receptores da superfície celular (MEDICAL SUBJECT HEADINGS, 2012). Os NGFs (fatores de crescimento neural) representaram 5,17% do proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* (Figura 31). Eles são responsáveis pela regulação da diferenciação neuronal, agindo como agonistas dos receptores de tirosina-quinase (LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009). Também induzem o crescimento de fibras em culturas celulares, a liberação de histaminas de células sanguíneas, e o mais importante: durante o envenenamento, os NGFs deixam a ‘região’ da picada mais suscetível a outros componentes da peçonha, distribuindo as substâncias que são difíceis de infiltrarem no tecido alvo (LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009). 3,45% do proteoma foram representados pelos fatores associados à DDB1 e CUL4 (Figura 31) que estão relacionados à ligação ao DNA, ao processamento de RNA e à regulação do ciclo celular (UNIPROT, 2012).

A família de oxidoredutases englobou 3,45% do proteoma de *L. m. rhombeata* (Figura 31) e está envolvida nos processos de transferência de elétrons e de oxidorredução (MEDICAL SUBJECT HEADINGS, 2012). As proteínas de transdução de sinal representaram 1,72% do proteoma analisado (Figura 31) e são importantes na angiogênese, na migração celular, sendo cruciais na sinalização e no desenvolvimento celular (BUSTELO, 2001). Os componentes do complemento (1,72% do proteoma da peçonha em estudo) (Figura 31) são ligantes de DNA que apresentam um *homeobox*, uma sequência

conservada entre os diversos organismos. Esses componentes também estão envolvidos em processos inflamatórios e de morte celular (UNIPROT, 2012).

1,72% do proteoma analisado englobou proteínas *NipSnap* (Figura 31) relacionadas ao transporte vesicular (MEDICAL SUBJECT HEADINGS, 2012), o que possibilita inferir que alguns componentes da peçonha podem ser transportados para a circulação sanguínea e para os tecidos da presa/vítima por meio de vesículas. Por último, tem-se as proteínas lin-7 (1,72% do proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata*) (Figura 31) envolvidas no transporte proteico, o que permite inferir o envolvimento dessas proteínas no transporte dos componentes tóxicos da peçonha aos tecidos da presa/vítima.

Tendo em mãos as principais famílias proteicas do proteoma da peçonha de um espécime de *L. m. rhombeata* segundo análise por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, a etapa seguinte deste trabalho foi verificar quais os principais processos biológicos produzidos e/ou afetados pela picada desta subespécie de acordo com esta primeira análise. Para tal objetivo, foram realizadas novas buscas na literatura sobre as proteínas encontradas enfatizando suas principais ações no organismo. A figura 32 mostra os resultados obtidos.

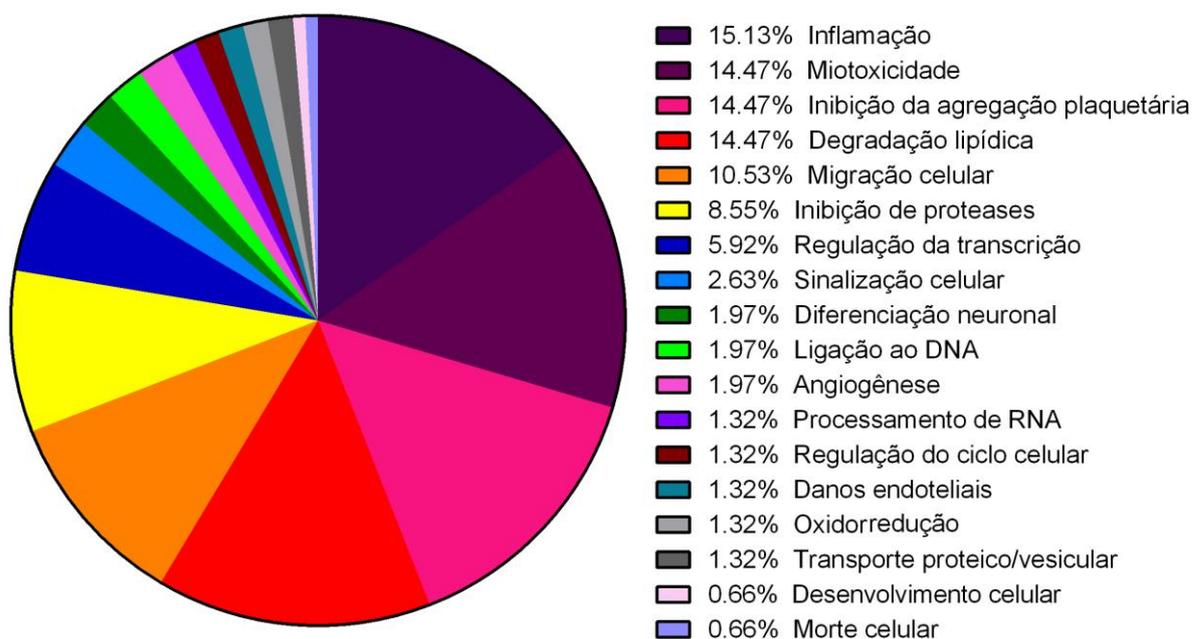


Figura 32. Principais processos biológicos ocasionados pelas famílias proteicas encontradas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. A inflamação (15,13%), a miotoxicidade e degradação lipídica dos tecidos e membranas de presas (14,47%) e a inibição da agregação plaquetária (14,47%), acarretando em hemorragia no organismo da presa, são os principais eventos provocados pela picada de uma serpente da subespécie em estudo.

A peçonha de *L. m. rhombeata* do espécime estudado apresentou proteínas relacionadas principalmente com processos inflamatórios (15,13%), danos miotóxicos (14,47%), degradação lipídica (14,47%) e inibição da agregação plaquetária (14,47%) levando a hemorragia nas presas/vítimas. Todos estes processos estão especialmente interligados: as proteínas responsáveis pela degradação lipídica estão relacionadas com a produção de uma miotoxicidade local e sistêmica que têm ação direta e específica sobre a musculatura esquelética, podendo levar a degeneração e morte celular (mionecrose) (CARREIRO; COGO; PRIANTI JR.; 2005). Por sua vez, essa lesão celular e tecidual pode desencadear respostas inflamatórias, levando ao aumento da permeabilidade vascular e da migração de neutrófilos, produzindo um abscesso na região da picada (UNICAMP, 2012). O interessante é que a inflamação também é causada por substâncias provenientes do plasma e de plaquetas e a inibição da agregação plaquetária por componentes da peçonha interfere na ação de mediadores inflamatórios, como o fator de ativação plaquetária que tem papel contrário ao ativar a agregação plaquetária (PORTAL EDUCAÇÃO, 2008).

Todas as famílias proteicas identificadas na peçonha de *L. m. rhombeata* auxiliam a serpente na captura e na digestão de suas presas e, como pode ser visto, inúmeros processos biológicos são desencadeados por essas proteínas, mostrando a complexidade dessa peçonha e a interconexão entre todos seus componentes, criando, assim, uma potente arma letal.

4.4 ANÁLISE DA PEÇONHA POR FPLC

Conforme descrito em detalhes no tópico 3.8, 1-5mg da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* foram aplicados em uma coluna de fase reversa (C18, 250 x 4,6mm, partículas de 5µm, Vydac) para separação de suas proteínas e posterior caracterização proteômica. Esse procedimento foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga da FCFRP-USP com a ajuda das alunas Francielle Almeida Cordeiro e Karla de Castro Figueiredo Bordon e a aplicação seguiu o protocolo de purificação proposto por Sanz et al. (2008).

Vinte e nove frações proteicas foram separadas e o perfil cromatográfico resultante pode ser visto na figura 33.

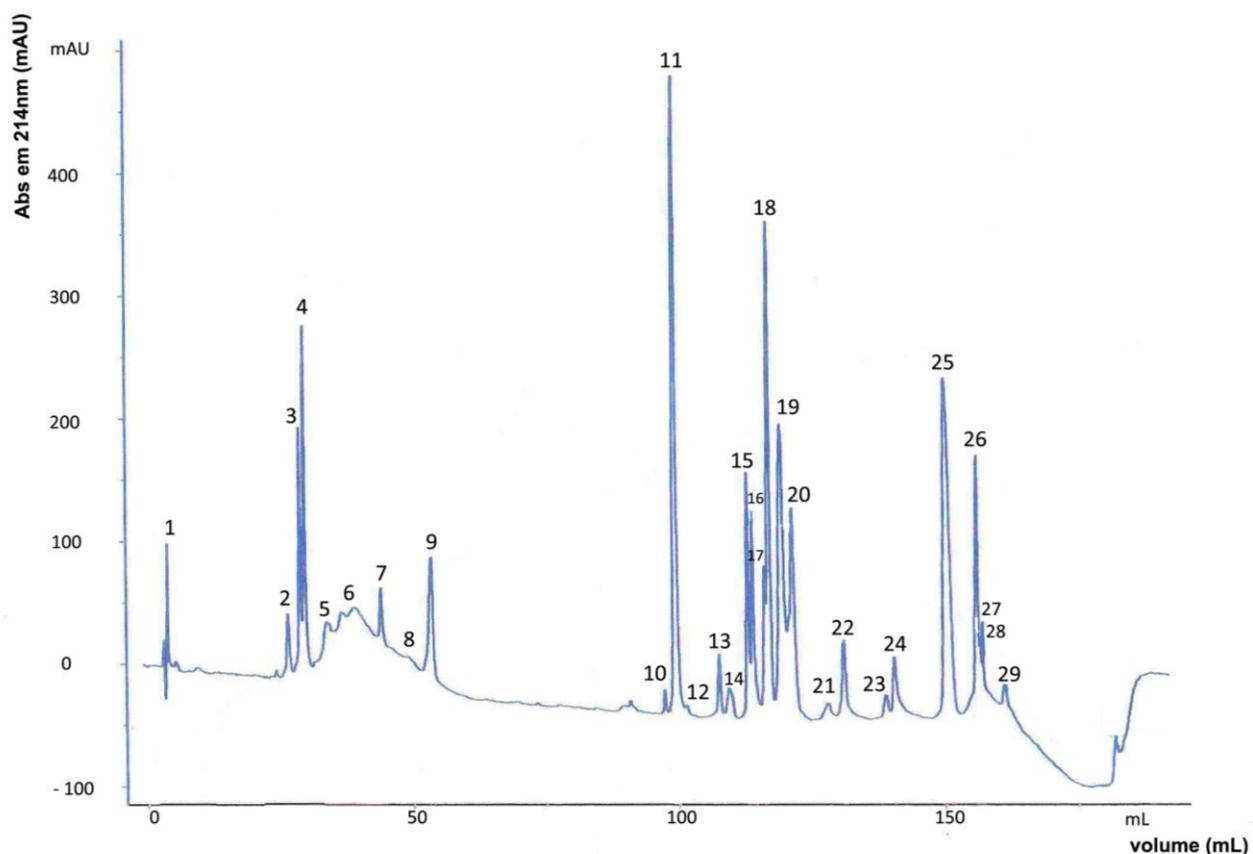


Figura 33. Perfil cromatográfico das proteínas da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* separadas por meio de FPLC. 1-5mg da peçonha foram aplicados em uma coluna Vydac C18 (250 x 4,6) 5 μ m seguindo o protocolo de purificação proposto por Sanz et al. (2008). As frações foram coletadas e identificadas por sequenciamento N-terminal.

Mesmo a peçonha tendo sido aplicada mais de uma vez na coluna cromatográfica, as frações de número 8, 10, 12, 13, 14 e 21 não foram coletadas (desconhecidos), pois a sensibilidade do aparelho não permitiu sua coleta (essas frações foram diretamente para o ‘waste’ do equipamento e após alterar os parâmetros de sensibilidade, elas não puderam ser coletadas; porém, elas foram computadas no cálculo de porcentagem total do proteoma).

As porcentagens das áreas de cada fração em relação à área total das frações eluídas foram calculadas pelo *software Unicorn 5.20* (GE Life Sciences) (Tabela 6). As 23 frações coletadas em todas as aplicações foram reunidas, liofilizadas e submetidas ao sequenciamento amino-terminal por degradação de Edman.

Tabela 6. Recuperação dos componentes cromatografados no processo de purificação da peçonha de *L. m. rhombeata*.

Fração	Recuperação proteica (%)
Peçonha	100
1	0,73
2	0,79
3	2,48
4	3,60
5	2,19
6	7,85
7	1,68
8	1,46
9	2,73
10	0,68
11	11,29
12	0,65
13	1,61
14	1,35
15	3,66
16	3,58
17	1,94
18	7,53
19	8,72
20	6,03
21	1,39
22	2,49
23	0,72
24	1,95
25	11,75
26	5,28
27	1,40
28	1,96
29	2,51

4.5 SEQUENCIAMENTO PROTEICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR FPLC

As 23 frações proteicas obtidas pelo fracionamento da peçonha de *L. m. rhombeata* em coluna de fase reversa C18 foram liofilizadas e ressuspensas em 45µL de água ultrapura (*Millipore*). Posteriormente, elas foram submetidas ao sequenciamento amino-terminal utilizando o Sequenciador PPSQ-33A (*Shimadzu*) no laboratório da Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga da FCFRP-USP, com a ajuda da aluna Karla de Castro Figueiredo Bordon, como descrito no tópico 3.9.

A análise obtida permitiu a construção de uma tabela (Tabela 7) fornecendo a sequência primária parcial do N-terminal de cada fração da peçonha de *L. m. rhombeata*, e sua subsequente classificação dentro de famílias proteicas.

Tabela 7. Análise por sequenciamento N-terminal das frações proteicas obtidas pelo fracionamento da peçonha de *L. m. rhombeata* em coluna cromatográfica de fase reversa C18. As sequências obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados nr (*non-redundant protein sequences*) contido no site do NCBI, por meio de buscas utilizando os seguintes termos como organismos-chave: *Lachesis muta rhombeata* e *Lachesis*

Fração	Sequência obtida pelo sequenciamento N-terminal	Proteína obtida e código de acesso	Identidade com uma proteína encontrada em	Família proteica
1	QRTHRWWAAQGNQN	Proteína 1 tipo enzima conversora de endotelina (gb ACF09129.1)	<i>Lachesis stenophrys</i>	Metaloendopeptidases
2	TPPAGPDVGP	BPP (sp Q27J49.1 BNP_LA CMU)	<i>Lachesis muta muta</i>	BPPs
3	TPPAGPDVGP	BPP (sp Q27J49.1 BNP_LA CMU)	<i>Lachesis muta muta</i>	BPPs
4	TPPAGPDVGP	BPP (sp Q27J49.1 BNP_LA CMU)	<i>Lachesis muta muta</i>	BPPs
5	TPPRPQ	BPP (sp Q27J49.1 BNP_LA CMU)	<i>Lachesis muta muta</i>	BPPs
6	PPGHHI	BPP (sp Q27J49.1 BNP_LA CMU)	<i>Lachesis muta muta</i>	BPPs
7	HPCGH	LV-PA (sp Q27J47.1 VSPPA_L ACMU)	<i>Lachesis muta muta</i>	Serinoproteases
8	Desconhecido	-----	-----	-----
9	WPPRPQI	BPP (sp Q27J49.1 BNP_LA CMU)	<i>Lachesis muta muta</i>	BPPs
10	Desconhecido	-----	-----	-----
11	HLLQFGDLINKIARRNGILYYS FYGCYCGLGGRGRPQDATDR CCF	Lmr-PLA2 (sp B3EWP6.1 PA2_L ACMR)	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	PLA2s
12	Desconhecido	-----	-----	-----
13	Desconhecido	-----	-----	-----
14	Desconhecido	-----	-----	-----
15	HLLQFGDLINKIARRNGILYYS FYGC	Isoforma de Lmr-PLA2 (sp B3EWP6.1 PA2_L ACMR)	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	PLA2s
16	VIGGDECNINEHRFL Contaminante: ---PQDWLPMNGLCY	LMR-47 (sp Q9PRP4.1 VSPF_L ACMR) Mutina (sp Q9PSM4.1 LECG_LACST)	<i>Lachesis muta rhombeata</i> <i>Lachesis stenophrys</i>	Serinoproteases Lectinas tipo C

Tabela 7. Continuação.

Fração	Sequência obtida pelo sequenciamento N-terminal	Proteína obtida e código de acesso	Identidade com uma proteína encontrada em	Família proteica
17	NNCPQDWLPMNGLCYK Contaminante: --GGDECN	Mutina (sp Q9PSM4.1 LECG_LACST) LMR-47 (sp Q9PRP4.1 VSPF_LACMR)	<i>Lachesis stenophrys</i> <i>Lachesis muta rhombeata</i>	Lectinas tipo C Serinoproteases
18	IVGGDECNINEHRFLVALYDP DGFF	LMR-47 (sp Q9PRP4.1 VSPF_LACMR)	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	Serinoproteases
19	VIGGDECNINEHRFLVALYDGLGFL	LMR-47 (sp Q9PRP4.1 VSPF_LACMR)	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	Serinoproteases
20	VIGGDECNINEHRFLVALYDGLGFL	LMR-47 (sp Q9PRP4.1 VSPF_LACMR)	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	Serinoproteases
21	Desconhecido	-----	-----	-----
22	VFGCDECNIN	LV-PA (sp Q27J47.1 VSPPA_LACMU)	<i>Lachesis muta muta</i>	Serinoproteases
23	N-terminal bloqueado	-----	-----	Provável metaloprotease
24	N-terminal bloqueado	-----	-----	Provável metaloprotease
25	N-terminal bloqueado	-----	-----	Provável metaloprotease
26	N-terminal bloqueado	-----	-----	Provável metaloprotease
27	NFTSG-- -FTPYQ- --PSEE- ----GW-	L-amino ácido oxidase (gb AFP89360.1)	<i>Lachesis muta</i>	Fragmentos de LAO
28	N-terminal bloqueado	-----	-----	Provável metaloprotease
29	N-terminal bloqueado	-----	-----	Provável metaloprotease

De acordo com as técnicas de FPLC e sequenciamento N-terminal, a peçonha da serpente *Lachesis muta rhombeata* englobou 7 famílias proteicas: metaloendopeptidases, lectinas tipo C, LAOs, fosfolipases A₂, BPPs, serinoproteases e metaloproteases (Figura 34).

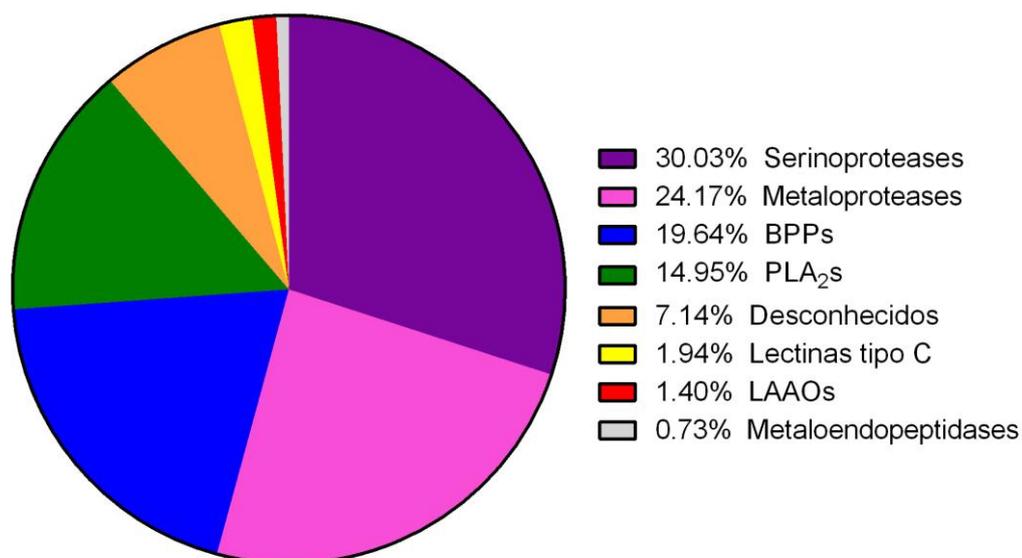


Figura 34. Principais famílias proteicas encontradas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo FPLC e sequenciamento N-terminal. Serinoproteases, BPPs, metaloproteases e fosfolipases A₂ são os principais componentes desta peçonha. Desconhecidos é referente às frações proteicas não coletadas durante o procedimento de FPLC.

Para a obtenção da porcentagem proteica total do proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata*, as porcentagens de volume de todas as frações foram calculadas de acordo com a tabela de recuperação fornecida pelo programa *Unicorn* 5.0 (Tabela 6), como citado anteriormente.

As lectinas tipo C, proteínas não-enzimáticas que interferem na agregação plaquetária e na atividade de hemaglutinação, descritas no subtópico 1.9.4, corresponderam a 1,94% do proteoma em estudo (Figura 34), e também estiveram presentes em baixas quantidades no proteoma da peçonha de *L. stenophrys* (4-8%) estudado por Sanz et al. (2008) e nos proteomas das peçonhas de *L. melanocephala* (7,5%), *L. stenophrys* (3,6%), *L. acrochorda* (6,9%) e *L. m. muta* (7,9%) estudados por Madrigal et al. (2012).

Uma novidade no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* foi a identificação de uma metaloendopeptidase (fração 1, correspondente à proteína 1 tipo enzima conversora de endotelina) (Tabela 7, Figura 34) relatada somente em um estudo filogenético envolvendo serpentes feito por Wiens et al. (2008). Nenhuma proteína desta família foi observada nos proteomas estudados por Sanz et al. (2008) e Madrigal et al. (2012). As metaloendopeptidases são proteases que participam dos processos de proteólise e na via biossintética das endotelinas, potentes peptídeos vasoconstritores, sendo importantes para a manutenção dos mecanismos de vasoconstrição do organismo (VALIANTE et al., 2005).

As LAAOs, flavoenzimas que interferem na agregação plaquetária e induzem apoptose celular e formação de edema, descritas no subtópico 1.9.3, corresponderam a 1,40% do proteoma em estudo (Figura 34), e estiveram presentes em baixas quantidades nos proteomas das peçonhas de *L. stenophrys* (5,3%) e *L. m. muta* (2,7%) estudados por Sanz et al. (2008) e nos proteomas das peçonhas de *L. melanocephala* (3,6%), *L. stenophrys* (2,7%), *L. acrochorda* (9,6%) e *L. m. muta* (2,7%) estudados por Madrigal et al. (2012).

PLA₂s (14,95%) e metaloproteases (24,17%) também foram identificadas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* por meio de FPLC e sequenciamento N-terminal (Figura 34). Essas famílias proteicas foram identificadas anteriormente neste mesmo trabalho por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, resultados discutidos no tópico 4.3 (Figura 31). Como pode ser visto, estas proteínas participam ativamente na interferência de processos hemostáticos no organismo de uma vítima acometida pela picada de serpente, sendo as PLA₂s também responsáveis pelos eventos de miotoxicidade, degradação lipídica e inflamação (CAMPOS et al., 2009; WARRELL, 2010), e as metaloproteases pelos eventos de inibição da migração celular e por danos endoteliais (AVILA et al., 2011). Em conjunto, as PLA₂s e as metaloproteases são os principais responsáveis pelas grandes hemorragias vistas em vítimas de acidentes ofídicos.

O proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* também englobou as famílias de serinoproteases (30,03%) e de BPPs (19,64%) (Figura 34). As serinoproteases, descritas no subtópico 1.9.1, agem no sistema hemostático de vítimas de acidentes ofídicos (VITORINO-CARDOSO, 2005), assim como as PLA₂s e as metaloproteases, promovendo a fibrinogenólise e interferindo na cascata de coagulação sanguínea e na agregação plaquetária (VILCA-QUISPE, 2010). No presente proteoma foram encontradas duas diferentes serinoproteases: a LMR-47 que possui atividades fibrinogenolítica e hidrolítica e foi purificada da peçonha de *L. m. rhombeata* por Aguiar et al. (1996), e a LV-PA, uma serinoprotease purificada da peçonha de *L. m. rhombeata* por Sanchez et al. (2006) que interfere na cascata de coagulação sanguínea e na função plaquetária, além de possuir efeito hipotensivo. Somente um tipo de BPP foi identificado no proteoma estudado: um precursor de BPP similar ao Q27J49.1 de *L. m. muta*. Esse BPP é um peptídeo hipotensivo e vasoativador (UNIPROT, 2012), responsável principalmente pela rápida difusão de toxinas no sistema circulatório da vítima, acarretando em choque hipotensivo, a maior causa de mortes por picadas do gênero *Lachesis* (RIPA, 2007).

Resultado interessante foi obtido ao se comparar a porcentagem de serinoproteases e de BPPs do proteoma da peçonha em estudo com a de proteomas de

peçonhas de outras espécies do gênero. Essa comparação mostrou que as serpentes *L.m. rhombeata* (em estudo, Brasil), *L. m. muta* (MADRIGAL et al., 2012, Bolívia) e *L. acrochorda* (MADRIGAL et al., 2012, Colômbia) possuem em sua peçonha uma maior porcentagem de serinoproteases se comparadas às das serpentes *L. melanocephala* (MADRIGAL et al., 2012, Costa Rica) e *L. stenophrys* (MADRIGAL et al., 2012, Costa Rica), que possuem uma maior porcentagem de BPPs. Este resultado vai de acordo com os estudos filogenéticos feitos por Zamudio e Greene (1997) que estimaram os tempos de divergência entre as espécies do gênero *Lachesis* e indicaram que as espécies da América do Sul são filogeneticamente mais próximas entre si (*L. acrochorda* e *L. muta*).

De modo geral, as espécies do gênero *Lachesis* apresentam muitas semelhanças entre os proteomas de suas peçonhas. Ao se comparar o resultado obtido por este estudo com os resultados encontrados na literatura (MADRIGAL et al., 2012; SANZ et al., 2008), ficou claro que o perfil cromatográfico do gênero é bem similar. Basicamente, em todos os cromatogramas e sequenciamentos analisados, incluindo o da serpente estudada aqui (*L. m. rhombeata*) (Figura 33, Tabela 7), as primeiras 10-12 frações proteicas obtidas correspondem a BPPs, seguidas de algumas frações referentes às PLA₂s. As serinoproteases são encontradas principalmente nas frações intermediárias (16-24) e as metaloproteases nas últimas frações.

O que diferencia um proteoma do outro é a presença de certas famílias proteicas. No presente estudo foi identificada uma metaloendopeptidase na fração 1, proteína esta que não foi observada nos proteomas das peçonhas das demais serpentes. Em contrapartida, nossa *L. m. rhombeata* não apresentou proteínas da família CRISP, presentes em *L. acrochorda* (MADRIGAL et al., 2012, Colômbia) e em *L. m. muta* (MADRIGAL et al., 2012, Bolívia e SANZ et al., 2008, Bolívia). NGFs foram encontrados somente em *L. m. muta* (SANZ et al., 2008, Bolívia), em *L. stenophrys* (SANZ et al., 2008, Costa Rica) e em *L. m. rhombeata* (presente estudo, Brasil, por meio da técnica de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas), enquanto que VEGFs foram vistos em *L. melanocephala* (MADRIGAL et al., 2012, Costa Rica), em *L. stenophrys* (MADRIGAL et al., 2012, Costa Rica) e em *L. acrochorda* (MADRIGAL et al., 2012, Colômbia).

Um gráfico (Figura 35) com os principais processos biológicos produzidos e/ou afetados pela picada de uma *L. m. rhombeata* também foi construído, tendo em vista desta vez a análise do proteoma da peçonha pelas técnicas de FPLC e sequenciamento N-terminal.

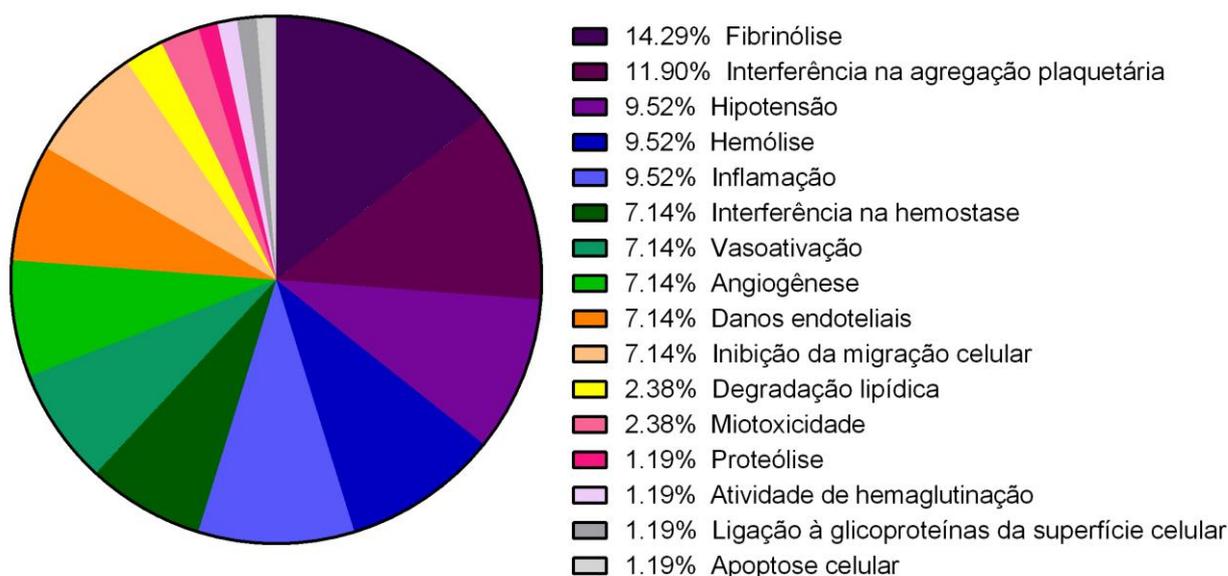


Figura 35. Principais processos biológicos ocasionados pelas famílias proteicas encontradas no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo FPLC e sequenciamento N-terminal. A fibrinólise (14,29%), a interferência na agregação plaquetária (11,90%), a hipotensão (9,52%), a hemólise (9,52%) e a inflamação (9,52%) são os principais eventos provocados pela picada de uma serpente da subespécie em estudo, provocando distúrbios sanguíneos e choque hipotensivo na vítima.

Proteínas que acarretam em distúrbios sanguíneos (interferência na agregação plaquetária, hemólise e fibrinólise), em processos inflamatórios e em hipotensão (Figura 35) correspondem à grande maioria das proteínas presentes no proteoma da peçonha de *L. m. rhombeata* segundo as técnicas de FPLC e sequenciamento N-terminal, um resultado semelhante ao obtido no tópico 4.3 por meio das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (Figura 32).

Os distúrbios sanguíneos provocados no organismo da vítima, geralmente ocasionam o comprometimento da coagulabilidade sanguínea, levando a um grave quadro hemorrágico. Como se não bastasse isso, o gênero *Lachesis* contém serpentes cujas peçonhas também possuem componentes hipotensivos e vasoativos (vistos no presente estudo e na literatura), que facilitam a difusão de toxinas na corrente sanguínea, comprometendo a função cardíaca, fazendo com que a vítima/presa entre em um choque hipotensivo, e consequentemente morra (RIPA, 2007). Como mencionado anteriormente, a peçonha é uma arma letal que engloba componentes dos mais variados e que proporcionarão à serpente, a captura e a digestão de suas presas de uma forma rápida e bem eficiente.

Ao se comparar os resultados obtidos por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (Figura 31) aos obtidos por meio de FPLC e sequenciamento N-terminal (Figura 34), notamos que as duas primeiras técnicas ressaltaram a

presença de componentes proteicos relacionados ao metabolismo da peçonha de *L. m. rhombeata*, enquanto que as duas últimas, ressaltaram a presença dos componentes tóxicos. Essa união de informações é bastante relevante, pois possibilita ao pesquisador fazer uma análise mais geral da peçonha, não se retendo somente às características tóxicas que são as mais comumente observadas neste tipo de estudo. Assim sendo, podemos comprovar que as peçonhas de serpentes são definitivamente complexas, englobando diversos componentes tóxicos e não tóxicos, e que estes últimos estão envolvidos em diversos processos, inclusive aos relacionados ao transporte e/ou à facilitação da entrada dos componentes tóxicos nos organismos das vítimas/presas.

4.6 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE) DA PEÇONHA DE *LACHESIS MUTA RHOMBEATA*

Na figura 36 podemos observar o padrão de bandas proteicas da peçonha de *L. m. rhombeata* obtido por meio de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) preparada conforme o tópico 3.10.

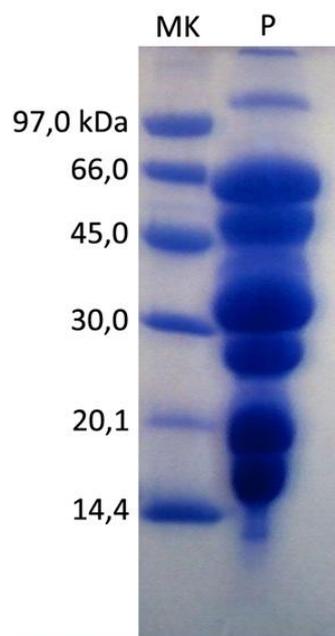


Figura 36. Perfil eletroforético da peçonha da serpente *L. m. rhombeata* (P) em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) sob condições redutoras. Foram aplicados 15 μ L de amostra (5 μ L de peçonha + 10 μ L de tampão contendo β -mercaptoetanol). MK = marcador de massa molar (97kDa = fosforilase b; 66kDa = albumina; 45kDa = ovalbumina; 30kDa = anidrase carbônica; 20,1kDa = inibidor de tripsina; 14,4kDa = lactalbumina- α).

Baseado em análises feitas por Ripa (2007) de peçonhas neonatas e juvenis de outras espécies/subespécies do gênero *Lachesis*, podemos considerar as bandas proteicas da peçonha de *L. m. rhombeata* como: (1) a acima de 97kDa igual a uma metaloprotease, (2) a de ~33-35kDa igual a uma serinoprotease, (3) a de ~26-29kDa igual a uma metaloprotease, e (4) a de ~15-17kDa igual a uma fosfolipase A₂ (Figura 36). O interessante é a presença da metaloprotease de ~26-29kDa, similar à descrita por Ripa (2007) como uma mutalisina II. Essa proteína hemorrágica, pertencente à classe P-I de SVMPs, tem uma alta atividade proteolítica contra dimetilcaseína, além de degradar a cadeia A α de fibrinogênio e interagir com glicoproteínas do plasma. Sua presença foi observada ocorrendo somente em serpentes adultas do gênero *Lachesis*, enquanto que em serpentes neonatas/juvenis ela está completamente ausente.

A ausência de mutalisina II ou uma metaloprotease similar, que é bastante hemorrágica e proteolítica, em serpentes neonatas/juvenis no gênero *Lachesis* apóia a hipótese de que elas utilizam-se do ‘choque hipotensivo’ para matar rapidamente suas presas independentemente do tipo de captura (ataque sem soltura ou ataque e soltura) (RIPA, 2007). Isso é bastante aceitável se pensarmos que essas serpentes são jovens e ‘inexperientes’ e precisam rapidamente de uma maneira mais eficiente para subjugar suas presas. As serpentes adultas do gênero *Lachesis* também causam ‘choque hipotensivo’, porém danos hemorrágicos e proteolíticos são mais evidentes em suas vítimas.

Serinoproteases liberadoras de bradicinina que acarretam em choque hipotensivo estão presentes em maiores quantidades em serpentes neonatas/juvenis, enquanto que metaloproteases, serinoproteases e fosfolipases A₂ hemorrágicas e proteolíticas estão em grande número em serpentes adultas. Dessa maneira, fica claro que o espécime de *L. m. rhombeata* utilizado neste estudo é um adulto.

5. CONCLUSÕES

Tanto a técnica de eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas, quanto a técnica de FPLC acoplada ao sequenciamento N-terminal, forneceram resultados significativos, proporcionando uma ampla análise do proteoma da peçonha da serpente *L. m. rhombeata*. As duas primeiras técnicas ressaltaram a importância dos componentes metabólicos e sistêmicos não tóxicos da peçonha que, na maioria das vezes, facilitam a difusão e/ou a entrada dos componentes tóxicos ao organismo, principalmente ao sistema circulatório das vítimas/presas. Já as duas últimas técnicas, mostraram que a toxicidade desta peçonha deve-se à presença de poucas famílias proteicas, como metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂, BPPs e lectinas tipo-C, que, em conjunto, são responsáveis pelos diferentes distúrbios sanguíneos e pelo quadro de choque hipotensivo característico do envenenamento por serpentes do gênero *Lachesis*.

No presente estudo foi visto que os proteomas das peçonhas das espécies contidas no gênero *Lachesis* são bastante similares. Porém, a presença de algumas proteínas diferenciais possibilita a manutenção dessas serpentes nas diferentes espécies existentes.

Somados aos estudos filogenéticos, moleculares e ontogenéticos, os estudos proteômicos auxiliam na classificação de indivíduos dentro da taxonomia proposta. A subespécie *L. m. rhombeata*, distribuída exclusivamente na Mata Atlântica brasileira, teve seu proteoma venenífero diferenciado no presente estudo. A presença de proteínas CRISPs e svVEGFs, na peçonha da subespécie *L. m. muta* (MADRIGAL et al., 2012, Bolívia e SANZ et al., 2008, Bolívia), e sua ausência na peçonha da subespécie *L. m. rhombeata*, pode ser considerado um indício para a manutenção destas serpentes em diferentes subespécies. A presença de metaloendopeptidases somente no proteoma da peçonha em estudo também auxilia na comprovação deste fato. Cabe ressaltar que não foi encontrado na literatura qualquer estudo proteômico (geral) da peçonha de indivíduos brasileiros de *L. m. muta*.

Estudos proteômicos promovidos por este trabalho também observaram que o indivíduo em estudo é um adulto. A análise da peçonha de *L. m. rhombeata* por meio de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) mostrou a presença de um similar da proteína hemorrágica e proteolítica mutalisina II, presente somente em serpentes adultas.

Assim, temos que a Proteômica fornece informações importantes para outras áreas de estudo, e que o presente trabalho é inédito, e fornece uma complementação aos estudos feitos com as demais serpentes do gênero (*L. m. muta*, *L. acrochorda*, *L. stenophrys* e

L. melanocephala), possibilitando o aprofundamento em questões pertinentes à taxonomia de *Lachesis*, além de providenciar informações importantes (1) para o melhor preparo de um soro antiofídico ‘contra’ o envenenamento por *L. m. rhombeata*, e (2) para a produção de novos fármacos no combate de diversos males, principalmente o câncer.

REFERÊNCIAS⁷

AGUIAR, A. S. et al. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. **Toxicon**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 555-565, 1996.

ALVES, R. R. N. et al. A review on human attitudes towards reptiles in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 184, p. 6877-6901, 2012.

ANTONIOU, S. A. et al. The rod and the serpent: history's ultimate healing symbol. **World Journal of Surgery**, New York, v. 35, p. 217-221, 2011.

AVILA, R. A. M. et al. Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, New York, v. 32, p. 1640-1646, 2011.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 81, n. 1, p. 55-63, 2011.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Metalloproteinases from snake-venoms (reprolysins), structure, function and relationship to mammalian reproductive proteins. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, Supplement. v. 18D, p. 151-151, 1994.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 7-16, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Boletim Eletrônico Epidemiológico, n.2, abr. 2010, p. 1-24, 2010a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf. Acesso em: 05 mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Acidentes por animais peçonhentos. *Guia de vigilância epidemiológica*, cad. 14, p. 1-24, 2010b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_ed_web_atual_aap.pdf. Acesso em: 28 maio 2010.

⁷ Normatizado de acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023*: informação e documentação: referências-elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde [2012]. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Acidentes por serpentes**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarTexto&codConteudo=5817&codModuloArea=783&chamada=acidentes-por-serpentes>. Acesso em: 05 mar. 2013.

BREGGE-SILVA, C. **Caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido oxidase isolada de peçonha de *Lachesis muta* (Serpentes, Viperidae)**. 2011. 80f. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

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

BULFINCH, T. **O livro de ouro da mitologia. História de deuses e heróis**. Ediouro Publicações S.A., Rio de Janeiro, 2005.

BUSTELO, X. R. Vav proteins, adaptors and cell signaling. **Oncogene**, Basingstoke, v. 20, p. 6372-6381, 2001.

BUTANTAN. **Animais peçonhentos: serpentes**. Série Didática – Número 5. Disponível em www.butantan.gov.br. Acesso em: 28 maio 2010.

CALVETE, J. J. Proteomics in venom research: a focus on PLA₂ molecules. **Acta Chimica Slovenica**, Ljubljana, v. 58, p. 629-637, 2011a.

CALVETE, J. J. Snake venomomics, antivenomics and venom phenotyping: the ménage à trois of proteomic tools at understanding the biodiversity of venoms. In: **Toxins and hemostasis: from bench to bedside**. Springer, Amsterdam, p. 45-72, 2011b.

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

CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**, London, v. 372, p. 725-734, 2003.

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

CAMPOS, V. R. et al. Synthesis, biological, and theoretical evaluations of new 1,2,3-triazoles against the hemolytic profile of the *Lachesis muta* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, p. 7429-7434, 2009.

CARREIRO, R. S.; COGO, J. C.; PRIANTI JR., A. C. G. **Estudo da miotoxicidade induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*: análise quantitativa de fibras lesadas.** Trabalho apresentado no IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, p. 1208-1211, 2005.

CELEDON, P. A. F. et al. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 7, p. 2258-2274, 2007.

CHACÓN, D. et al. Maintaining coral snakes (*Micrurus nigrocinctus*, Serpentes: Elapidae) for venom production on an alternative fish-based diet. **Toxicon**, Oxford, v.60, p. 249-253, 2012.

CHACUR, M. **Efeito nociceptivo induzido por fosfolipases A₂ (variantes Lys49 e Asp49) isoladas do veneno de serpentes *Bothrops asper*: caracterização dos mecanismos centrais e determinantes moleculares.** 2004. 142f. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.

CISCOTTO, P. H. C. et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v.74, p. 1810-1825, 2011.

COMINETTI, M. R. et al. Alternagin-C, a Disintegrin-like Protein, Induces Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF) Expression and Endothelial Cell Proliferation *in Vitro*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 18, p. 18247-18255, 2004.

CREER, S. et al. Genetic and ecological correlates of intraspecific variation in pitviper venom composition detected using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and isoelectric focusing. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 56, p. 317-329, 2003.

CRESCENTI, E. J. et al. Enhanced tolerance to high cytostatic doses by means of oligoelements Mn, Se, and Zn plus *Lachesis muta* venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**. v. 16, p. 39-53, 2003.

CRESCENTI, J. V. et al. Radioprotection of sensitive rat tissues by oligoelements Se, Zn, Mn plus *Lachesis muta* venom. **Journal of Radiation Research**, Tokyo, v. 52, p. 557-567, 2011.

CUNHA, K. C. S.; FULY, A. L.; ARAUJO, E. G. A phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. **Toxicon**, Oxford, v. 57, p. 580-585, 2011.

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

DA ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 22, n. 2, 2005.

DAMICO, D. C. S. et al. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. **Toxicon**, Oxford, v. 46, p. 222-229, 2005.

DAMICO, D. C. S. et al. LmrTX, a basic PLA₂ (D49) purified from *Lachesis muta rhombeata* snake venom with enzymatic-related antithrombotic and anticoagulant activity. **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 773-781, 2012.

DA SILVA, I. R. F. et al. BJ-PI2, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1820, p. 1809-1821, 2012.

DAUDIN, F. M. Histoire naturelle générale et particulière des reptiles. v. 8. Dufart, Paris, France, 1803.

DE CARVALHO, D. D. **Purificação e caracterização de BJcuL, uma lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu***. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

DE LIMA, D. C. et al. Snake venom: any clue for antibiotics and CAM? *In Snake venom for antibiotic prototypes. Evidence-based complementary and alternative medicine*, Oxford, v. 2, p. 39-47, 2005.

DE MORAIS, I. C. O. et al. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. *Toxicon*, Oxford, v. 61, p. 38-46, 2013.

DE PAULA, R. C. M. F. **Perfil epidemiológico dos casos de acidentes ofídicos atendidos no Hospital de Doenças Tropicais de Araguaína-TO (triênio 2007-2009)**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G. M. Venomics: unraveling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, Chichester, v. 43, p. 279-295, 2008.

FELICORI, L. F. et al. Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. *Protein Expression and Purification*, San Diego, v. 30, p. 32-42, 2003.

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

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

FERNANDEZ, J. H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A. C. M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 3, p. 554-563, 2004.

FERREIRA, T. et al. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. *Toxicon*, Oxford, v. 53, p. 69-77, 2009.

FONSECA, F. V. et al. Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, supl. 1, p. 26-29, 2004.

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

FOX, J. W. et al. Perspectives in molecular toxinology. In: **Perspectives in molecular toxinology**. John Wiley & Sons, p. 97-108, 2002.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, p. 909-920, 2008a.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, Oxford, v. 275, p. 3016-3030, 2008b.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Botropic accident. In: **Venomous animals in Brazil: biology, clinical and therapeutic of accidentes**. Sarvier, São Paulo, p. 72-86, 2003.

FRY, B. G. et al. The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Toxicon**, Oxford, v. 60, p. 434-448, 2012.

FUJI, Y. et al. Crystal structure of trimestatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 332, p. 1115-1122, 2003.

GIOVANNI-DE-SIMONE, S. et al. Purification, properties and N-terminal amino acid sequence of a kallikrein-like enzyme from the venom of *Lachesis muta rhombeata* (bushmaster). **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 16, p. 809-818, 1997.

GONZÁLEZ-RIVERA, A. et al. Epidemiologia de las mordeduras por serpiente. Su simbolismo. **Acta Pediátrica de México**, México, v. 30, n. 3, p. 182-191, 2009.

GOULD, R. J. et al. Disintegrins - a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 195, n. 2, p. 168-171, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: una visión integral de carácter regional. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, Maracay, v. 51, p. 1-16, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. **Toxicon**, Oxford, v. 28, p. 1127-1129, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 3, p. 0001-0005, 2006.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. The crotoxin complex – an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, Oxford, v. 16, n.1, p. 19-30, 1978.

HART, G. D. The earliest medical use of the caduceus. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 107, p. 1107-1110, 1972.

HEYBORNE, W.; MACKESSY, S. P. Cysteine-rich secretory proteins in reptile venoms. In: **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Taylor & Francis Group, LLC, Florence, cap. 16, p. 325-336, 2010.

HUANG, T-F. et al. Trigamin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, p. 16157-16163, 1987.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM (ITIS). Disponível em: <http://www.itis.gov/>. Acesso em: 22 nov. 2012.

JORGE, M. T. et al. Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: case report and review of the literature. **Toxicon**, Oxford, v. 35, p. 545-554, 1996.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. et al. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. **Genetics**, Austin, v. 173, n. 2, p. 877-889, 2006.

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **Federation of European Biochemical Societies journal**, Oxford, v. 278, p. 4544-4576, 2011.

KARDONG, K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids & elapids. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 46, p. 105-118, 1982.

KARDONG, K. V.; WEINSTEIN, S. A.; SMITH, T. L. Reptile venom glands: form, function and future. In: **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Taylor & Francis Group, LLC, Florence, p. 65-91, 2009.

KASSAN, B. H. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina do veneno da serpente *Bothrops moojeni***. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 5, p. 1591-1604, 2008.

KAUSKOT, A. et al. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 13, p. 6604-6016, 2008.

KLEIN, A. G. **Pit Vipers**. ABDO Publishing Company, Minnesota, 2006.

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

KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, New York, v. 29, n.8, p. 1293-1304, 2008.

LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. **BMC Genomics**, London, v.10, p. 1-14. 2009.

LEMOS, J.C. et al. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 12, p. 50-59, 2009.

LI, S. et al. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. **Biochemical Journal**, London, n. 384, p. 119-127, 2004.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford, v. 3, p. 1791-1799, 2005.

LUGIRA, A. M. **African traditional religion**. New York: Chelsea, 2009.

MACKESSY, S. P. Morphology and ultrastructure of the venom glands of the northern Pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 208, p. 109-128, 1991.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: the venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger.**, v. 245, p.147-159, 2006.

MADRIGAL, M. et al. Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 77, p. 280-297, 2012.

MAHIMKAR, R. M. et al. The disintegrin domain of ADAM9: a ligand for multiple b1 renal integrins. **Biochemical Journal**, London, v. 385, p. 461-468, 2005.

MARKLAND JR, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, Oxford, v.62, p. 3-18, 2013.

MCCLEARY, R. J.R.; KINI, R. M. Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. **Toxicon**, Oxford, v. 62, p. 56-74, 2013.

MEHRTENS, J. M. **Living snakes of the world in color**. Sterling Publishers, New York, 1987.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO et al. (Orgs.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, p. 3-61, 2003.

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

MERTENS, R. *Lanthanotus*: an important lizard in evolution. **Sarawak Museum Journal**, Kuching, v. 10 p. 320-322, 1961.

MEDICAL SUBJECT HEADINGS (MESH) - NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/mesh/2013/mesh_browser/MBrowser.html. Acesso em: 27 dez. 2012.

MULLIN, S. J.; SEIGEL, R. A. **Snakes ecology and conservation**. Cornell University Press, New York, 2009.

NASCIMENTO, C. N. G.; RAMOS, M. O.; LICHTENSTEIN, A. Símbolo da medicina. **Revista Médica**, São Paulo, v. 85, n. 2, p. 66-70, 2006.

NAWARAK, J. et al. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 24, p. 2838-2854, 2003.

NUNES, S. F. **Dieta e biologia reprodutiva da cruzeira, *Bothrops alternatus* (Serpentes – Viperidae), na região sul do Brasil**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

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

O'SHEA, M. **Venomous snakes of the world**. New Holland Publishers, 2008.

OTERO, R. et al. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. **Toxicon**, Oxford, v. 36, p. 2021-2027, 1998.

PARDAL, P. P. O. et al. Envenomation by *Micrurus* coral snakes in the Brazilian Amazon region: report of two cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.52, p. 333-337, 2010.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PIZZATTO, L. O fascinante mundo das serpentes. **Ciência Hoje**, v. 33, n. 197, p. 71-73, 2003.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpents brasileiras. **Herpetologia no Brasil**, p. 201-221, 2006.

PORTAL EDUCAÇÃO. **Inflamação**. Disponível em: <http://www.portaleducacao.com.br/enfermagem/artigos/1251/inflamacao>. Acesso em: 28 dez. 2012.

POUGH et al. **Herpetology**. Pearson Prentice Hall, 2002.

PRADO, A. H. **A simbologia da farmácia: mitos e lendas que adornam os signos dessa milenar profissão**. Disponível em: http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/atualidades_simbolos_farmacia.html. Acesso em: 07 jan. 2013.

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

PYRON, R. A. et al. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 58, p. 329-342, 2011.

RAMOS, O. H. **Desintegrinas de *Bothrops alternatus*: biologia molecular, estudos *in vitro*, *in vivo* e bioinformática estrutural**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

RAMOS, O. H. P. et al. A novel alpha (v) beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, London, v. 19, 2008.

RIBEIRO JR., W. A. *Górgonas, Gréias e Equidna*. Portal Graecia Antiqua, São Carlos. Disponível em www.greciantiga.org/arquivo.asp?num=0080. Acesso em: 22 nov. 2012.

RICHARDS, R. et al. Cloning and characterization of novel cystatins from elapid snake venom glands. **Biochimie**, Paris, v. 93, p. 659-668, 2011.

RIPA, D. Ontogeny of the shock death in human beings. In: **The bushmasters (genus *Lachesis* Daudin, 1803) morphology in evolution and behavior**. Electronic book. Cape Fear Serpentarium. Wilmington, 2007.

ROSENTHAL, R. et al. Intestinal ischemia after bushmaster (*Lachesis muta*) snakebite – a case report. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 217-220, 2002.

RUCAVADO, A. et al. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 1297-1312, 1999.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 57, p. 627-645, 2011.

SANCHEZ, A. *Diapsids III: snakes*. Father Sanchez's web site of West Indian Natural History. Caderno 14. Disponível em: <http://www.kingsnake.com/westindian/metazoa12.html>. Acesso em: 22 nov. 2012.

SANCHEZ, E. F. et al. Resolution of isoforms of mutalysin-II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 41, p. 1021-1031, 2003.

SANCHEZ E. F. et al. Biochemical characterization and molecular cloning of a plasminogen activator proteinase (LV-PA) from bushmaster snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 12, p. 1762-1771, 2006.

SANZ, L. et al. Snake venomomics of the South and Central American bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 71, p. 46-60, 2008.

SHINE, R. **Australian snakes. A natural history**. REED BOOKS, 1991.

SINGAPORE ZOOLOGICAL GARDENS DOCENTS. *Are snakes slimy?* Disponível em: <http://www.szgdocent.org/resource/rr/c-slimy.htm>. Acesso em: 22 nov. 2012.

SOUZA, D. H. et al. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 384, p. 341-350, 2000.

STEPHANO, M. A. et al. The improvement of the therapeutic anti-*Lachesis muta* serum production in horses. **Toxicon**, Oxford, v. 45, p. 467-473. 2005.

SUNAGAR, K. et al. Evolution of CRISPs associated with Toxicoforan-Reptilian venom and mammalian reproduction. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 29, p. 1807-1822, 2012.

SUTO, K. et al. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, p. 2126-2131, 2005.

SWAROOP, S.; GRAB, B. Snakebite mortality in the world. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v.10, p. 35-76, 1954.

TAKAHASHI, H. et al. 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**, Baltimore, v. 279, p. 46304-46314, 2004.

TAN, N-H.; PONNUDURAI, G. The biological properties of venoms of some American coral snakes (genus *Micrurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 101B, p. 471-474, 1992.

TANAKA, G. D. et al. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 1-12, 2010.

TUCKER, A. S.; MILETICH, I. **Salivary glands. Development, adaptations and disease.** Karger AG, 2010.

TURNER, E.; CARMICHAEL, R.; SOUZA, R. Dialogues on the Tao of *Lachesis*. **Bulletin of the Chicago Herpetological Society**, Chicago, v. 43, p. 157-164, 2008.

UNICAMP. Inflamação aguda. Patologia Geral – Áreas de Seminologia e Patologia da UNICAMP. Disponível em: <http://www.scribd.com/doc/86817732/Inflamacao-Unicamp>. Acesso em: 28 dez. 2012.

UNIPROT. *UniProt. Protein Knowledgebase (UniProtKB)*. Disponível em: <http://www.uniprot.org/>. Acesso em: 27 dez. 2012

VALIANTE, S. et al. Histochemical distribution of endothelin-converting enzyme subtypes in *Podarcis sicula* (Squamata, Lacertidae) tissues. **Journal of Anatomy**, London, v. 204, p. 391-397, out. 2005.

VILCA-QUISPE, A et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, Oxford, v. 55, p. 745-753, 2010.

VITORINO-CARDOSO, A. F. **Estudos biológicos e estruturais da BthaTL, uma serinopeptidase recombinante da peçonha de *Bothrops alternatus* (Viperidae, Crotalinae)**. 2005. 169f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

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

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

WEINBERG, M. L. D. et al. Biochemical properties of a bushmaster snake venom serine proteinase (LV-Ka), and its kinin releasing activity evaluated in rat mesenteric arterial rings. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, v. 96, p. 333-342, 2004.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Ion separation. In: **Proteomics in Practice: a laboratory manual of proteome analysis**. Wiley-VCH Verlag GmbH, p. 45-72, 2002.

WIENS, J. J. et al. Branch lengths, support, and congruence: testing the phylogenomic approach with 20 nuclear loci in snakes. **Systematic Biology**, Basingstoke, v. 57, p. 420-431, 2008.

WIENS, J. J. et al. Resolving the phylogeny of lizards and snakes (Squamata) with extensive sampling of genes and species. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, p. 1-4, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Snake antivenoms**. Fact Sheet n. 337. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/> em 2010. Acesso em: 24 nov. 2012.

XIE, Q., et al. Recombinant snake venom cystatin inhibits the growth, invasion and metastasis of B16F10 cells and MHCC97H cells in vitro and in vivo. **Toxicon**, Oxford, v. 57, p. 704-711, 2011.

YAMAZAKI, Y.; BROWN, R. L.; MORITA, T. Purification and cloning of toxins from elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels. **Biochemistry**, Washington, v.41, n. 38, p. 11331-11337, 2002.

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

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

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, p. 51985-51998, 2003.

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

ZAMUDIO, K. L.; GREENE, H. W. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 62, p. 421-442, 1997.

ZHOU, M. et al. MDC-9 (ADAM-9/meltrin gamma) functions as an adhesion molecule by binding the alpha (v) beta (5) integrin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 280, p. 574-580, 2001.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. 2nd. Academic Press, San Diego, California. cap. 21, p. 503-532, 2001.