

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Caracterização do perfil coagulotóxico de venenos de serpentes
Crotalus durissus terrificus e *Crotalus durissus collilineatus***

Luccas Daniel Padueli

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo

Orientadora:
Dra. Karen de Moraes-Zani

São Paulo

2024

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	32
7. REFERÊNCIAS.....	33

RESUMO

PADUELI, L. D. **Caracterização do perfil coagulotóxico de venenos de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Palavra-chave: cascavel, coagulação, soro antiofídico.

INTRODUÇÃO: A peçonha de animais peçonhentos é composta de uma vasta gama de enzimas, peptídeos biologicamente ativos e outras toxinas que apresentam um variado efeito tóxico no organismo, incluindo coagulação, fibrinólise e alteração nas funções de plaquetas. Em casos extremos pode até levar à falência de múltiplos órgãos e coagulação intravascular disseminada (CIVD), demonstrando, assim, uma necessidade de realizar pesquisas e de determinar quais são os mecanismos de ação de peçonhas assim como quais são suas toxinas atuantes e de caráter significativo para a indústria farmacológica e de saúde como um todo. A OMS (Organização Mundial de Saúde) calcula que ocorrem mais de 5.4 milhões de acidentes por serpentes ao ano, com cerca de 2.7 milhões de envenenamentos, ocasionando 81.000 a 138.000 óbitos ao ano e cerca de três vezes mais o número de amputações ou outras disabilidades permanentes causadas por envenenamentos de serpentes. Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil, ocorrem cerca de 19 mil a 22 mil acidentes ofídicos ao ano, sendo que acidentes crotálicos possuem uma ocorrência de cerca de 7,7% com uma letalidade aproximada de 1,9%, a maior em se tratando de serpentes brasileiras. A maneira mais efetiva e mais utilizada para o tratamento contra envenenamento por serpentes é a utilização do soro antiofídico, em que anticorpos são capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno e promovem uma rápida neutralização e bloqueio dos sítios catalíticos de seus componentes tóxicos. A variabilidade intraespecífica do veneno de serpentes da espécie *Crotalus durissus spp* também é um importante ponto a se detalhar para a produção de soros mais específicos e reativos. Levando em conta as características aqui expostas e a gravidade que acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Crotalus* demonstram no Brasil e no mundo, há uma necessidade de se determinar os perfis coagulotóxicos dos venenos de serpentes deste gênero de maneira que seja possível produzir antivenenos melhores e mais específicos.

OBJETIVO: O objetivo deste trabalho é analisar e caracterizar o perfil coagulotóxico de venenos de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*.

MATERIAL E MÉTODOS: Após a coleta de veneno e subsequente quantificação proteica, o perfil composicional de cada veneno

foi avaliado individualmente através de SDS-PAGE e HPLC. Foram também determinadas a atividade enzimática de serinoproteases e fosfolipases A2, bem como a dose mínima coagulante, o perfil de clivagem do fibrinogênio e a atividade trombina-símile na presença e ausência de soro antiveneno. As análises foram avaliadas estatisticamente pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. RESULTADOS: Neste projeto foram identificadas diferenças composticionais no perfil proteico das serpentes como a existência de uma banda a cerca de 14kDa no SDS-PAGE apenas em 3 venenos e foram observadas que foi-se necessário concentrações diferentes de soro antiveneno para inibir a atividade de coagulação dos venenos, sendo que para inibir esta atividade em serpentes Cdt, viu-se necessário uma concentração de soro maior do que das serpentes Cdc. CONCLUSÃO: Foram identificadas variações intraespecíficas nos perfis proteico e coagulotóxico no veneno de *C. durissus terrificus* e *C. d. collilineatus*. No entanto, o soro antiveneno foi capaz de inibir completamente ou parcialmente a ação dos venenos.

1. INTRODUÇÃO

A peçonha de animais peçonhentos é composta de uma vasta gama de enzimas, peptídeos biologicamente ativos e outras toxinas que apresentam um variado efeito tóxico no organismo, incluindo coagulação, fibrinólise e alteração nas funções de plaquetas. Em casos extremos, pode até levar à falência de múltiplos órgãos e coagulação intravascular disseminada (CIVD) (BASTOS et al, 2007), demonstrando, assim, uma necessidade de realizar pesquisas e de determinar quais são os mecanismos de ação de peçonhas assim como quais são suas toxinas atuantes e de caráter significativo para a indústria farmacológica e de saúde como um todo.

Os acidentes ofídicos representam um grave problema de saúde pública para países tropicais e subtropicais devido à abrangência das várias espécies de serpentes e a frequência com que ocorrem acidentes, havendo mais de 3000 espécies diferentes de serpentes, sendo 10 a 14% delas peçonhentas. (PINHO e PEREIRA, 2001)

A OMS (Organização Mundial de Saúde) calcula que ocorrem mais de 5.4 milhões de acidentes por serpentes ao ano, com cerca de 2.7 milhões de envenenamentos, ocasionando em 81.000 a 138.000 óbitos ao ano e cerca de três vezes mais o número de amputações ou outras disabilidades permanentes causadas por acidentes ofídicos. A maior parte dos afetados são agricultores e crianças, sendo que crianças são mais fortemente afetadas devido a sua baixa massa corporal. A grande maioria destes envenenamentos estão localizados em países da África, América Latina e Ásia. Segundo dados do Ministério da Saúde (1991), no Brasil, ocorrem cerca de 19 mil a 22 mil acidentes ofídicos ao ano, sendo que os acidentes crotálicos possuem uma ocorrência de cerca de 7,7% com uma letalidade aproximada de 1,9%, a maior em se tratando de serpentes brasileiras.

A maneira mais efetiva e mais utilizada para o tratamento contra o envenenamento por serpentes é a utilização do soro antiofídico, em que anticorpos são capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno e promovem uma rápida neutralização e bloqueio dos sítios catalíticos de seus componentes tóxicos (RANGEL-SANTOS et al, 2004).

No Brasil, as serpentes do gênero *Crotalus* são representadas apenas pela espécie *Crotalus durissus* distribuídas em cinco subespécies, até recentemente: *C.d. terrificus*, predominante nas regiões altas e secas do sul e sudeste; *C.d. collilineatus*, predominante nas

regiões secas da região centro-oeste, norte de São Paulo e Minas Gerais; *C.d. cascavella*, predominante nas áreas da caatinga do nordeste; *C.d. ruruima*, predominante na região norte do país; *C.d. marajoensis*, predominante na Ilha do Marajó (PINHO e PEREIRA, 2001). Vale-se notar que na época em que o projeto foi iniciado (2020) a espécie era representada por estas 5 subespécies, mas desde então, em 2023, houve uma revisão e *C. d. collilineatus* e *C.d. cascavella* foram consideradas subespécies sinônimas a *C. d. terrificus* (GUEDES et al, 2023), mas o projeto ainda irá considerar ambas como subespécies distintas.

Segundo o Ministério da Saúde (1998), essa espécie apresenta fosseta loreal, órgão termorreceptor situado entre os olhos e as narinas das serpentes assim como dentes inoculadores desenvolvidos e móveis localizado na porção anterior do maxilar, ambos são também presentes nas espécies de *Bothrops* e *Lachesis*. Essa espécie também se destaca por possuir um guizo na extremidade de sua cauda, o que anuncia sua presença.

O veneno das serpentes *Crotalus* do Brasil é notoriamente reconhecido por desacoplar as transmissões neuromusculares e por provocar sintomas miálgicos, causando paralisia progressiva. Seu veneno é composto de uma mistura de peptídeos biologicamente ativos e proteínas com atividades enzimáticas com destaque para a crotoxina, componente mais letal e neurotóxico do veneno e geralmente é contabilizada em 70% a 90% de todo o veneno desta espécie de serpente (BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010; RANGEL-SANTOS et al, 2004). É uma toxina que apresenta duas subunidades que agem de maneira sinérgica: subunidade básica, com atividade fosfolipásica A2 (PLA_2) e alta toxicidade, e a subunidade ácida, crotapotina, uma proteína que demonstra capacidade de potencializar as ações da PLA_2 (BASTOS et al, 2007). Além da crotoxina, o veneno de *Crotalus durissus spp.* também demonstra quantidades variáveis de crotamina, uma toxina mionecrótica com ação em canais voltagem-sensíveis de Na^+ (BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010). Além destas toxinas, o veneno crotálico possui ação fibrinolítica local e sistêmica extremamente importantes para a ação do veneno, que pode provocar agravos ainda mais severos em vítimas de acidentes crotálicos, tais como coagulopatias (AGUILAR et al, 2007).

É documentado que o veneno do gênero *Crotalus* possui alta variabilidade intraespecífica (ontogenética, individual e geográfica) sendo um exemplo comum no continente americano a diferença da atividade hemorrágica entre espécies na América do Sul, com atividade hemorrágica praticamente não existente, e de espécies na América do Norte, com alta atividade hemorrágica (AGUILAR et al, 2007 e BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010). Esta alta

variabilidade do veneno do gênero *Crotalus* e sua letalidade demonstram um problema evidente para o tratamento de acidentes crotálicos e a produção de novos soros anti-crotálicos.

Como observado por BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010 e CALVETE et al, 2011, foi observado um reconhecimento ineficiente de crotamina pelos anti venenos produzidos pela Costa Rica e pelo Instituto Butantan, indicando uma necessidade de se produzir antivenenos mais específicos. Em relação as subespécies que serão caracterizadas neste projeto, segundo estudos do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (TASIMA et al, 2020), já foi observado que as serpentes *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* possuem quantidades diferentes de crotamina, 70% em veneno de *C. d. collilineatus* e apenas 35% em *C. d. terrificus*, mostrando maior quantidade nas serpentes provenientes do nordeste de São Paulo, exemplificando diferenças de importância farmacológica para a produção de soros anti-crotálicos.

Uma das atividades enzimáticas apresentadas pelos venenos crotálicos envolvida na gênese de seus efeitos sistêmicos e que desempenha papel central na fisiopatologia do envenenamento é sua atividade coagulante, resultante, principalmente, da ação da giroxina, uma serinoprotease (GUTIÉRREZ, 2011).

Desde a década de 80, a maneira mais utilizada de avaliar a atividade coagulante dos venenos de serpentes é por meio da determinação de sua “Dose Mínima Coagulante” (DMC), definida por Theakston e Reid (1983) como a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de fibrinogênio ou plasma citratado em 60 segundos a 37 °C. Entretanto, uma desvantagem associada à DMC é que esse parâmetro, quando determinado utilizando-se *pool* de venenos, pode não refletir o perfil coagulante de uma determinada espécie, conforme demonstrado em uma publicação do nosso grupo (GALIZIO et al, 2018). Nesse contexto, os dados gerados por esse estudo ressaltam a importância de analisar amostras individuais em estudos envolvendo variabilidade intraespecífica de venenos e sua evolução.

Desta maneira, o presente projeto propõe a caracterização do perfil coagulotóxico de venenos individuais das subespécies *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* devido a sua importância para a produção de soros anti-crotálicos mais específicos e reativos.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é analisar e caracterizar o perfil coagulotóxico de venenos de serpentes *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Serpentes e venenos

Os venenos que foram utilizados para este projeto foram coletados de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus* provenientes de diferentes estados brasileiros e mantidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

As serpentes recém-chegadas ao Instituto Butantan passam por uma triagem em que se verifica a procedência do animal e a importância da localidade para manter a variabilidade no biotério. Após esta análise, o animal é clinicamente examinado, pesado, medido, e um manejo profilático que consta de um banho de imersão em triclorfon 0,2% (ectoparasiticida) e vermifugação contra diferentes nematódeos (ivermectina 2 mg kg⁻¹), trematódeos e cestódeos (praziquantel 8 mg kg⁻¹) é realizado. Após estes procedimentos, a serpente é encaminhada para a primeira quarentena, onde permanece por, no mínimo, 30 dias. A serpente é mantida em gaiola plástica, com papelão corrugado e água *ad libitum*. Neste período, o animal é diariamente observado, regularmente alimentado e, após 15 dias, recebe a segunda dosagem dos vermífugos. Como a primeira quarentena recebe novas serpentes semanalmente, houve a necessidade de implementar uma segunda quarentena, para onde os animais com mais de 30 dias em quarentena, que estejam se alimentando regularmente e aparentemente saudáveis, são transferidos em um sistema "*all in, all out*". Com este sistema o período total de quarentena é de, no mínimo, 60 dias e a mortalidade do plantel diminuiu sensivelmente. Ao sair da segunda quarentena para as salas de produção de venenos, as serpentes recebem um *microchip*, inserido no tecido subcutâneo na lateral do terço posterior esquerdo do corpo.

Nas salas de produção de venenos, as serpentes são também mantidas em gaiolas plásticas com papelão corrugado e água *ad libitum* e a extração de veneno é realizada mensalmente. Para aumentar a segurança do extrator, diminuir o estresse dos animais e reduzir o desperdício de veneno devido a botes desnecessários, as serpentes são submetidas, individualmente, a ambiente saturado de dióxido de carbono por, aproximadamente, 5 minutos. Esta metodologia é utilizada desde 1989 e é aprovada pela Comissão de Ética no Uso de

Animais do Instituto Butantan (CEUAIB). A extração de veneno é feita em um Becker de vidro, imerso em banho de gelo, com a boca recoberta por um plástico que é trocado a cada serpente para evitar a contaminação entre os animais. Após a extração, álcool iodado 2% é aplicado nas presas para evitar infecções. No entanto, para este projeto, a extração do veneno será realizada em microtubos, devido à necessidade de coleta de venenos individuais.

Na semana seguinte à extração de veneno, as serpentes são alimentadas com camundongos ou ratos criados no Biotério Central do Instituto Butantan. Não é oferecida à serpente uma quantidade maior do que 20% do seu peso para evitar a obesidade. Três semanas após a alimentação, o veneno é novamente extraído.

Foram analisadas 15 amostras de venenos individuais de cada subespécie. Os venenos foram obtidos através da extração manual conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Após a extração, os venenos foram centrifugados a 2000 g por 30 minutos a 4°C, liofilizados e armazenados a -20°C até o momento da análise.

3.2. Dosagem de proteínas

Um mg de veneno liofilizado foi ressuspensido em 1 mL de solução salina 0,9% e o conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, M.M., 1976), utilizando-se o reagente BioRad Protein Assay (BioRad). A determinação da concentração de proteínas foi realizada por meio de uma curva-padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) como padrão.

3.3. Determinação do perfil proteicos dos venenos

3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

O perfil proteico dos venenos foi analisado por meio de SDS-PAGE. As amostras dos venenos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, de acordo com Laemmli (LAEMMLI, U.K., 1970). Por canaleta, foram aplicados 20 µg de proteína. Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Coomassie G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

3.3.2. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

O perfil proteico dos venenos também foi analisado por meio de HPLC. Para o fracionamento das proteínas do veneno, foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase

reversa C₁₈ (Teknokroma Europa – 0,4 cm x 25 cm, partículas de 5 µm, e poros de 300 Å), em sistema Jasco. As proteínas e peptídeos foram separados por meio de um gradiente de TFA 0,1% em água (solução A) e de TFA 0,1% em acetonitrila (solução B), sendo 5% de solução B (5 mL), seguido por um gradiente linear de 5 a 15% de solução B (20 mL), outro gradiente linear de 15 a 45% de B (120 mL) e finalmente mais um gradiente linear de 45 a 70% de B (20 mL). Esse procedimento permite a recuperação tanto de proteínas com massa molecular entre 7 e 150 kDa quanto de pequenas proteínas e peptídeos com massa molecular entre 0,4 e 7 kDa (CALVETE et al, 2007).

3.4. Determinação da atividade enzimática de proteases e fosfolipases A₂

As principais famílias de toxinas envolvidas nos distúrbios hemostáticos causados pelo envenenamento por serpentes são as serinoproteases (*snake venom serine proteases* – SVSP) e fosfolipases A₂ (PLA₂) (YAMAZAKI e MORITA, 2007). Por essa razão, as atividades enzimáticas dessas famílias de toxinas foram determinadas, como descrito a seguir.

3.4.1. Determinação da atividade enzimática de proteases

A atividade proteolítica sobre a caseína foi determinada conforme descrito por MENEZES et al. (2006). A 490 µL de uma solução tampão (Tris-HCl 100 mM CaCl₂ 10 mM pH 8,8) foram adicionados 10 µL de solução de veneno 1 mg/mL e 500 µL de uma solução de N, N-caseína dimetilada 2% (Sigma), ambos solubilizados no mesmo tampão. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Em seguida, a amostra foi incubada em banho de gelo por 10 minutos, centrifugada a 14.000 g por 15 minutos a 4°C e a absorbância dos sobrenadantes foi mensurada em leitor de placas SpectraMax i3 (Molecular Devices) utilizando-se o comprimento de onda de 280 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg).

3.4.2. Determinação da atividade enzimática de fosfolipases A₂

A atividade fosfolipásica foi determinada de acordo com HOLZER e MACKESSY (1996). Em placas de microtitulação, 20 µg de veneno ressuspensiondo em solução salina 0,9% (20 µL) foram incubados com tampão Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0 (200 µL) e com o substrato NOBA (ácido 4-nitro-3-[octanoyloxy] benzoico 4,16 mM diluído em acetonitrila)

(20 µL) por 20 minutos a 37°C. A absorbância da reação foi mensurada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices) utilizando-se o comprimento de onda de 425 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de veneno que causa a liberação de 25,8 nM de cromóforo. É definido que o aumento de 0,1 unidade de absorbância corresponde a 25,8 nM de cromóforo liberado. A atividade específica foi expressa como unidades por miligrama de proteína por minuto (U/mg/min). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5. Determinação do perfil coagulotóxico

3.5.1. Determinação da dose mínima coagulante

A Dose Mínima Coagulante (DMC) é definida como a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de fibrinogênio ou plasma citratado em 60 segundos a 37 °C (THEAKSTON and REID, 1983). Os venenos foram diluídos em solução salina 0,9% em diferentes concentrações e foram incubados previamente com CaCl₂ por 2 min a 37 °C (50 µL de plasma e 50 µL de CaCl₂ 25 mM). O tempo de coagulação foi obtido adicionando-se 100 µL de cada solução de veneno e CaCl₂ às alíquotas de 100 µL de plasma humano (CAAE 43560620.0.0000.5493) ou fibrinogênio bovino (2 mg/mL), mantidas a 37 °C. O tempo de coagulação foi cronometrado após a adição da solução de veneno. Os ensaios foram realizados em triplicata. A DMC foi expressa como µg de veneno por mL.

3.5.2. Perfil de clivagem do fibrinogênio

A clivagem específica do fibrinogênio pelos venenos foi determinada conforme descrito por PEICHOTO et al. (2007), com algumas modificações. Duzentos microlitros de fibrinogênio bovino 2 mg/mL foram incubados com 10 µg de veneno a 37°C. Em diferentes intervalos de tempo, alíquotas foram retiradas dessa mistura e desnaturadas e reduzidas por meio de fervura por 7 minutos em tampão desnaturante para SDS-PAGE (SDS 4%, glicerol 20% e β-mercaptoethanol 20%). Em seguida, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 12% (item 3.3.1.) e os géis foram corados utilizando-se Coomassie G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). Os géis foram analisados utilizando-se o programa GelAnalyzer v19.1.

3.5.3. Atividade trombina-símile

A atividade amidolítica direta das amostras de veneno sobre o substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix), específico para trombina, foi avaliada de acordo com as recomendações do fabricante. Para este ensaio, 5 µL de veneno (1 mg/mL, em solução salina 0,9%) foram adicionados a 10 µL do substrato cromogênico S-2238 (H-D-Phe-PIP-Arg-pNA·2HCl) (5,6 mM) e 90 µL de tampão Tris 50 mM pH 7,4 e a reação foi monitorada a 405 nm por 5 minutos a 37°C.

3.6. Soroneutralização

O soro anticotálico é produzido com um *pool* de venenos de duas subespécies de *Crotalus durissus*, *C. d. collilineatus* (50%) e *C. d. terrificus* (50%), mesmo depois da sinonimização das duas subespécies. O antiveneno é composto por fragmentos solúveis de IgG F(ab')₂ e a potência determinada pelo fabricante é: 1 mL de soro anticotálico neutraliza pelo menos 1,5 mg do veneno crotálico de referência nacional. (INSTITUTO BUTANTAN, 2016)

Para os ensaios de soroneutralização, os venenos foram previamente incubados com os respectivos antivenenos na proporção adequada, de acordo com a potência dos soros determinada pelo fabricante, por 2 min a 37 °C (SOUZA et al, 2018). Após o período de incubação, a mistura (veneno + soro) foi utilizada para a realização dos testes de coagulotoxicidade descritos acima (itens 3.5.1 a 3.5.3), nas mesmas condições experimentais.

3.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa GraphPad Prism. Diferenças com p<0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

As serpentes foram escolhidas para a extração de maneira que se obtivesse dados suficientemente estatísticos de cada gênero (8 machos e 7 fêmeas) e de diversas regiões no país, de maneira mostrada na tabela 1 a seguir:

Indivíduo	Peso (g)	Tamanho (cm)	Sexo	Procedência
Cdc 1	2245	128~143	M	Cajuru-SP

Cdc 2	1245	124~133,5	M	Catalão-GO
Cdc 3	840	110~120	M	Catalão-GO
Cdc 4	2255	140~154,5	M	Palmas-TO
Cdc 5	420	87~96	M	Araxá-MG
Cdc 6	405	74,5~90	F	Riolândia-SP
Cdc 7	1850	127~139,5	M	Frutal-MG
Cdc 8	1295	140~155	M	Itumbiara-GO
Cdc 9	1590	120~127,5	F	Catalão-GO
Cdc 10	1190	113~121,5	F	Catalão-GO
Cdc 11	1885	119~127	F	Palmas-TO
Cdc 12	465	85~94	M	Araxá-MG
Cdc 13	1835	125~132	F	Uberlândia-MG
Cdc 14	1580	113~120	F	Mococa-MG
Cdc 15	1505	112~116	F	Uberlândia-MG
Cdt 1	1620	122~134	M	São José dos Campos-SP
Cdt 2	2480	122~135	M	Itupeva-SP
Cdt 3	1520	120~131	M	Andradas-MG
Cdt 4	2700	139~152	M	Jataí-GO
Cdt 5	2360	112~124	M	Caconde-SP
Cdt 6	1735	116~128	M	Itapira-SP

Cdt 7	2215	117~128	M	Araraquara-SP
Cdt 8	2095	124~132	M	São Pedro-SP
Cdt 9	2005	120~128	F	Nazaré Paulista-SP
Cdt 10	2290	125~133	F	Jacareí-SP
Cdt 11	4180	153~163	F	Jataí-GO
Cdt 12	2670	119~132	F	Espírito Santo do Pinhal-SP
Cdt 13	2900	135~144	F	Itú-SP
Cdt 14	1935	124~133	F	Resende-RJ
Cdt 15	455	85~90	F	Varginha-MG

Tabela 1. Lista das serpentes utilizadas no presente trabalho, seus pesos, tamanhos, sexos e procedências. O tamanho dos espécimes é dado em comprimento rostro-cloacal e comprimento rostro-caudal, respectivamente. (Cdc) *C. d. collilineatus*; (Cdt) *C. d. terrificus*.

Foi-se observado que, após liofilização dos venenos, a quantidade de proteínas encontradas nas serpentes *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc) foi de 1,18 a 1,27 mg de proteína/mg de veneno liofilizado, não sendo observadas quaisquer diferenças significativas entre machos (números 1 a 5 e 7, 8 e 12) e fêmeas (números 6, 9 a 11 e 13 a 15), enquanto serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) apresentaram 1,12 a 1,26 mg de proteína/mg de veneno liofilizado, resultados bem similares com Cdc e, igualmente, não apresentando diferenças significativas entre machos (números 1 a 8) e fêmeas (números 9 a 15) (figura 1).

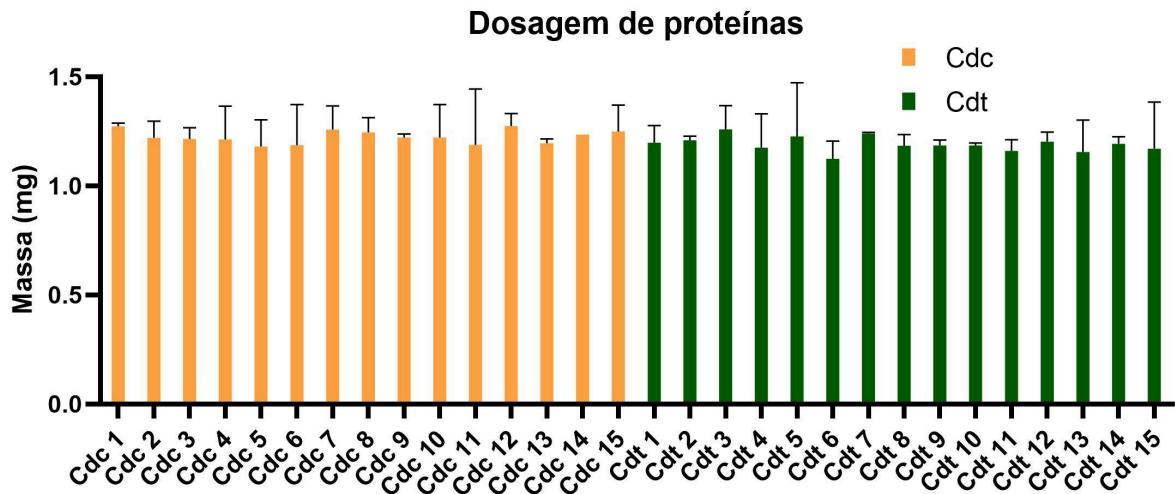


Figura 1. Dosagem de proteínas dos venenos liofilizados de serpentes *C. d. collilineatus* (Cdc) e *C. d. terrificus* (Cdt) provenientes de diversas regiões do Brasil.

O perfil proteico dos venenos foi avaliado por meio de SDS-PAGE e HPLC. Com relação ao perfil eletroforético, nos géis de serpentes Cdc (figura 2) é possível observar, em todos os venenos, as bandas de aproximadamente (i) 125 kDa, associada à presença de fosfodiesterases (RODRIGUES et al, 2022), (ii) 30 kDa, associada à presença de serinoproteinases, e (iii) 14 kDa, sendo esta última frequentemente associada com a presença de PLA2. É possível notar que as serpentes 4, 9 e 11 que, como será visto mais à frente, apresentam maior atividade fosfolipásica quando comparadas com as outras serpentes estudadas, provavelmente devido à presença da proteína que constitui a banda de aproximadamente 14 kDa. Outra banda proteica notável é a de aproximadamente 10 kDa presente na maioria dos venenos de machos e menos frequente nas serpentes fêmeas, que corresponde à crotamina, importante miotoxina no envenenamento de serpentes *Crotalus* (PONCE-SOTO et al, 2002). Outra banda marcante é a de aproximadamente 60 kDa, especialmente nas fêmeas, associada a presença de metaloproteinases tipo III e de L-aminoácido oxidases (LAAO) (CALVETE et al, 2010; SÁNCHEZ et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR, 2020). A atividade da LAAO de Cdt já foi observada pelo nosso grupo, identificando diferenças em relação à atividade de serpentes cativas por um longo período (maior atividade) e recém-chegadas da natureza (menor atividade) (de LIMA, 2021).

Nos géis das serpentes Cdt (figura 3), assim como nos géis anteriores, todas as

serpentes apresentam uma banda majoritária de aproximadamente 14 kDa, o que indica alta concentração de proteínas PLA₂, e bandas menos intensas com aproximadamente 125 kDa, associada à presença de fosfodiesterases (RODRIGUES et al, 2022), e 30 kDa, associada a presença de serinoproteases. Além disso, vale notar a presença de bandas a aproximadamente 10 kDa (serpentes 2, 3, 5, 7 e 10) que, como já comentado, é associada com a presença de crotamina (CALVETE et al, 2010; PONCE-SOTO et al, 2002). Outra presença marcante, assim como os géis anteriores, é a de bandas a aproximadamente 60 kDa que é associada a presença de metaloproteinases tipo III e de LAAO (CALVETE et al, 2010; SÁNCHEZ et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020). Diferentemente da subespécie Cdc, a banda a 60 kDa é observável na maioria dos indivíduos desta subespécie e esta diferença entre ambas as subespécies já foi observada pelo nosso grupo (da SILVA-JÚNIOR et al, 2020). Como já comentado, a atividade de LAAO destas serpentes já foi observada pelo nosso grupo, identificando diferenças em relação a sua atividade nos venenos de serpentes cativas por um longo período (maior atividade) e provenientes da natureza (menor atividade) (de LIMA, 2021).

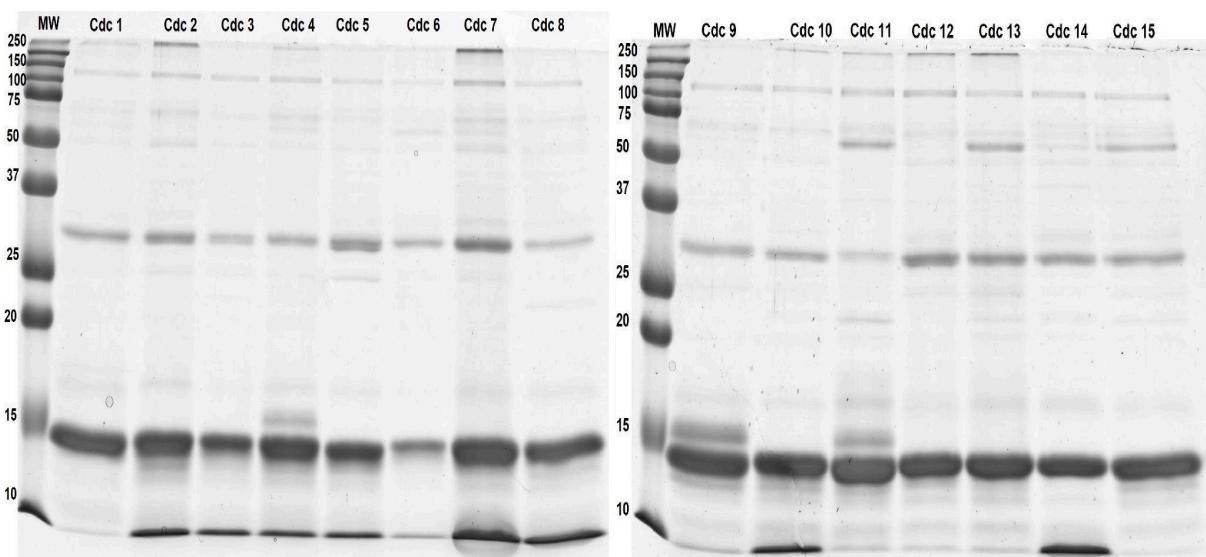


Figura 2. SDS-PAGE (15%) dos venenos de serpentes Cdc sob redução com 2-mercaptopetanol.

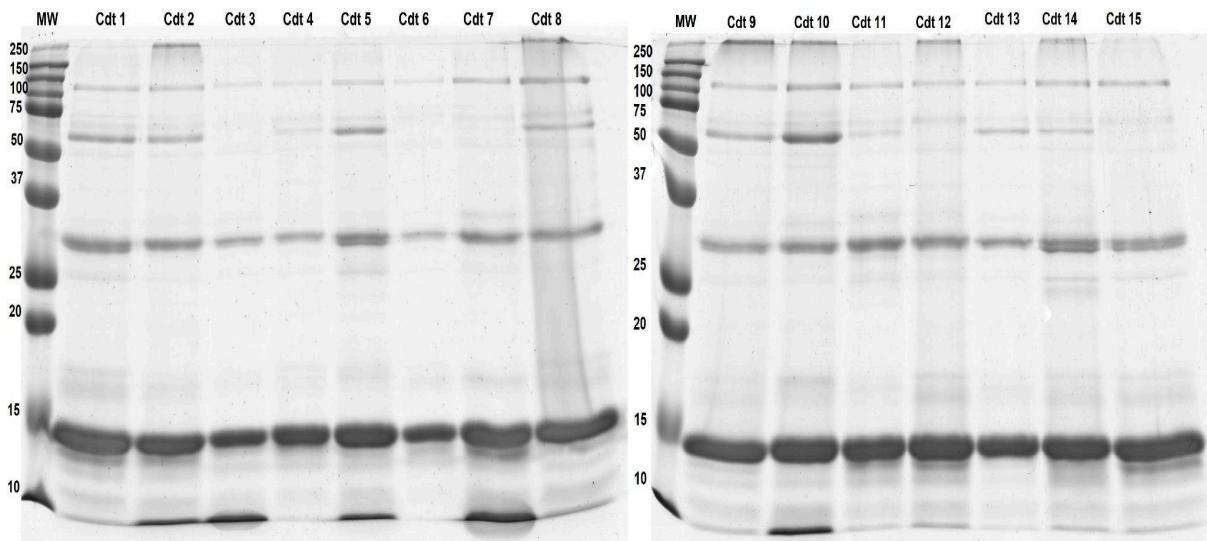
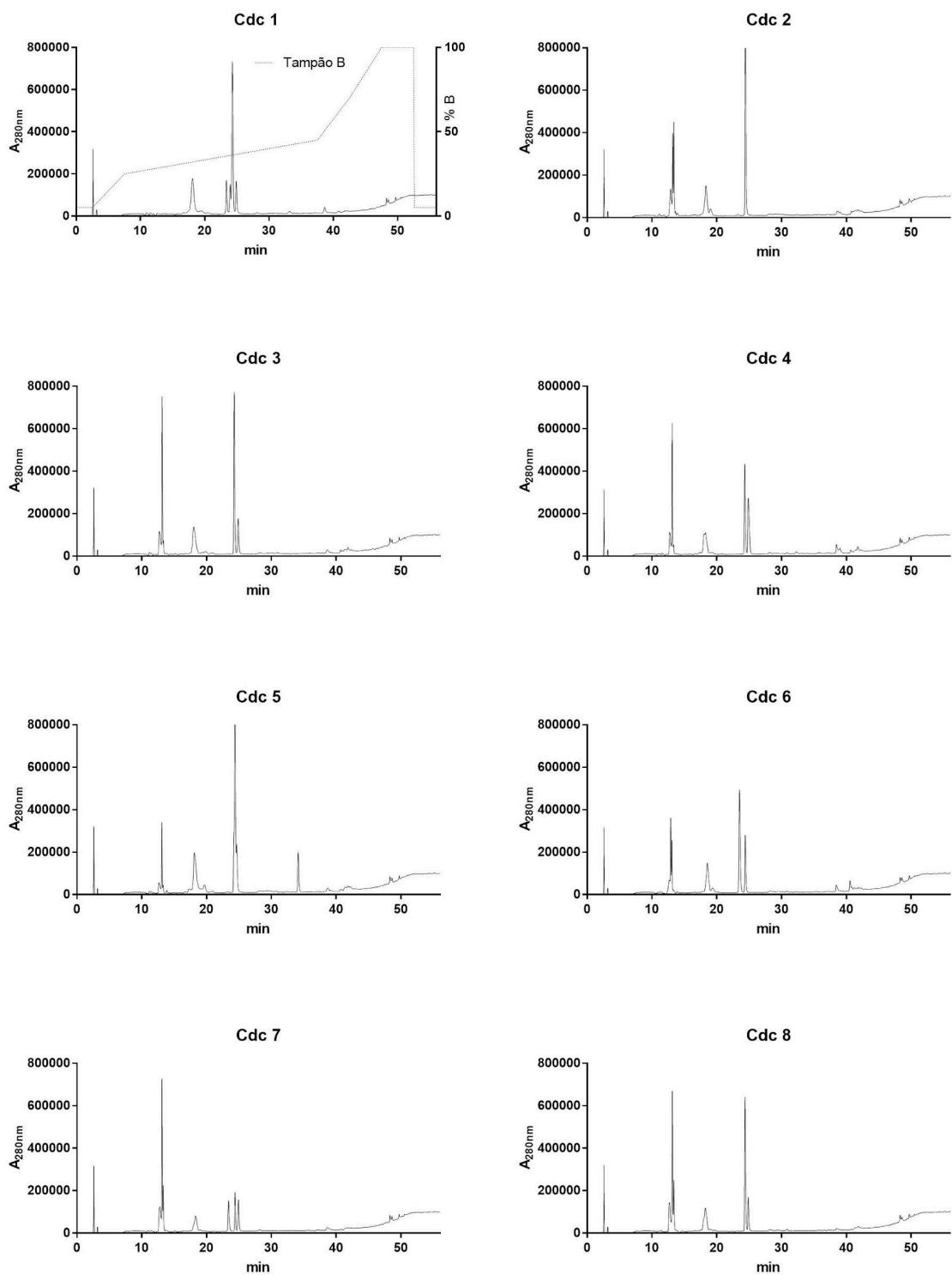


Figura 3. SDS-PAGE (15%) dos venenos de serpentes Cdt sob redução com 2-mercaptopetanol.

Nos perfis cromatográficos obtidos por HPLC das serpentes Cdc (Figura 4), pode-se observar inicialmente quatro principais grupos de picos presentes na maioria das serpentes estudadas: um grupo de picos com tempo de retenção (TR) de cerca de 13 minutos relacionado à presença de crotamina (TOYAMA et al, 2000; FUSCO et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020), um grupo de picos com TR de 19 minutos relacionado à presença de crotapotina, uma sequência ácida de crotoxina (FUSCO et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020), um grupo de picos com TR de cerca de 25 minutos relacionado a presença de sequência básica de crotoxina (PLA_2) (FUSCO et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020) e um grupo de picos com TR de cerca de 40 minutos relacionado a presença de metaloproteases, serinoproteases e LAAOs (FUSCO et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020). Além disso, é possível observar picos eluídos em aproximadamente 35 minutos em algumas serpentes (Cdc 5, 9 e 11) relacionado a presença de serinoproteases (FUSCO et al, 2020). Também é possível observar que o pico de aproximadamente 13 minutos, quando existente, demonstra sempre dois picos agrupados, um maior atingindo de 300 a 800 mil de absorbância e outro menor que permanece próximo a 100 mil ou menos de absorbância.



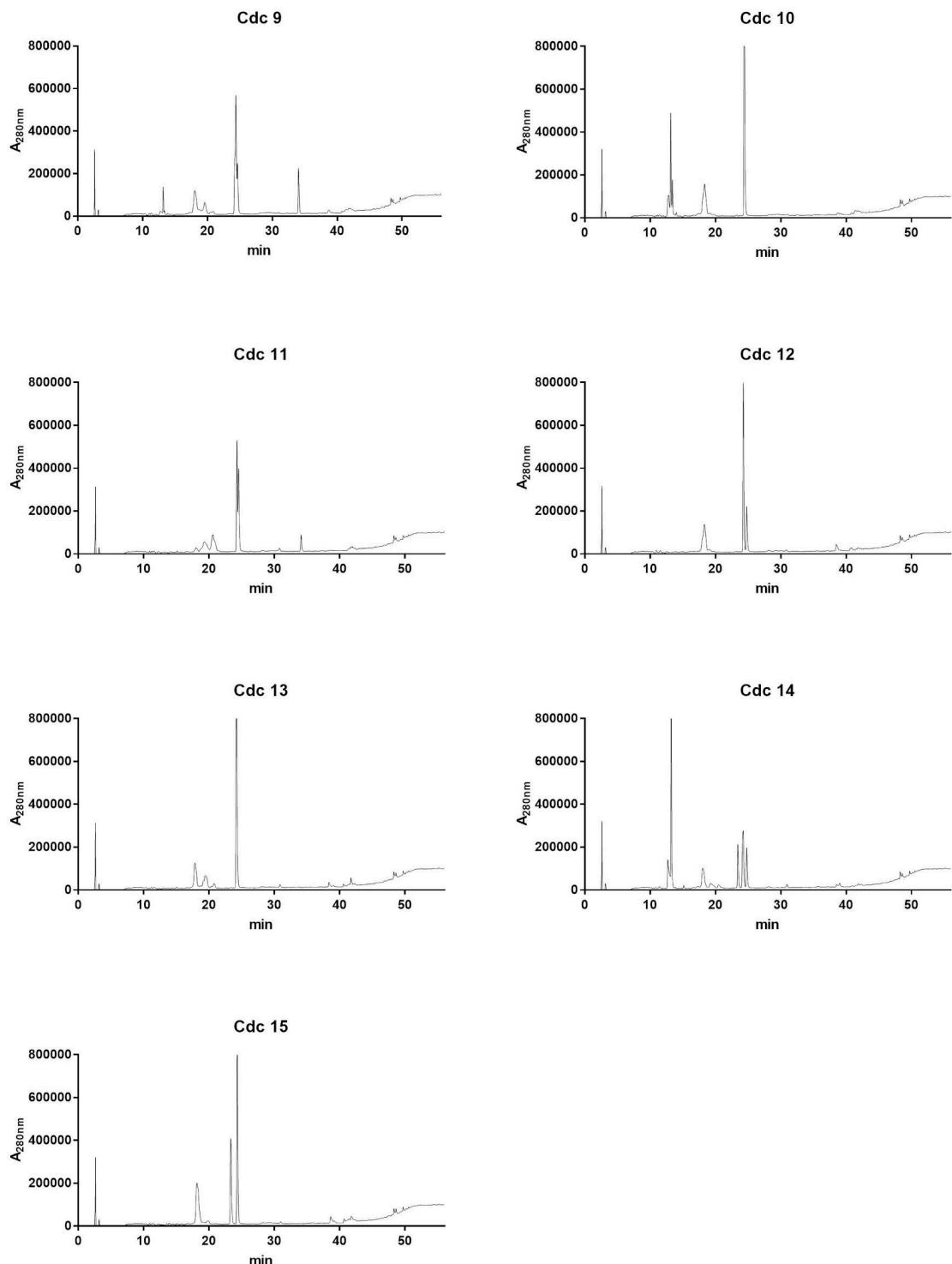
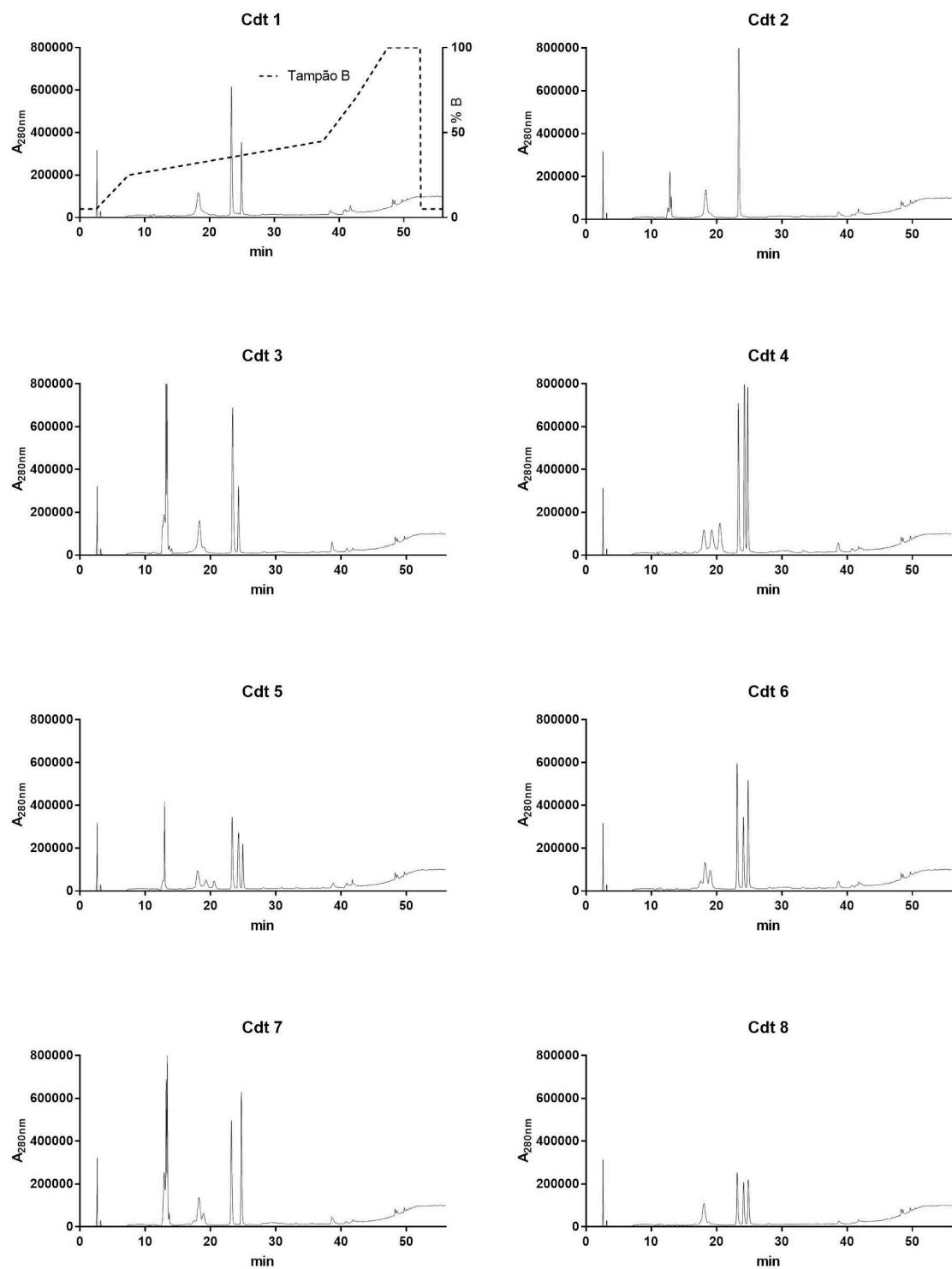


Figura 4. Perfil cromatográfico obtido por HPLC em coluna C18 do veneno das serpentes *C. d. collilineatus* (Cdc). O primeiro gráfico (Cdc 1) demonstra a variação da solução B no decorrer da corrida.

Assim como nas serpentes Cdc, os perfis cromatográficos obtidos por HPLC do veneno das serpentes Cdt (Figura 5) demonstram inicialmente quatro principais grupos de picos presentes na maioria das serpentes estudadas: um grupo de picos com TR de cerca de 13 minutos relacionado a presença de crotamina (TOYAMA et al, 2000; FUSCO et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020), um grupo de picos com TR de cerca de 19 minutos relacionado a presença de crotapotina (FUSCO et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020), um grupo de picos com TR de cerca de 25 minutos relacionado a presença de sequência básica de cadeia de crotoxina (FUSCO et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020) e um grupo de picos com TR de cerca de 40 minutos relacionado a presença de metaloproteases, serinoproteases e LAAOs (FUSCO et al, 2020; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020). Também é possível notar que, diferentemente das serpentes Cdc, não há nenhum pico eluído em aproximadamente 35 minutos.

É possível notar a diferença na quantidade de serpentes Cdt que demonstraram picos na região de 13 minutos, cinco serpentes Cdt (Cdt 2, 3, 5, 7 e 10, uma de MG e as outras quatro de SP) em comparação com dez serpentes Cdc (Cdc 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 14, cinco de GO, uma de TO, três de MG e uma de SP) o que indica uma diferença significante na presença de crotamina entre as duas subespécies, mas permitindo observar prevalência de presença de crotamina em serpentes Cdc provenientes de GO. Também é possível observar que de trinta serpentes, houveram duas (Cdc 1 e Cdt 13) que demonstraram quatro picos na região de 25 minutos, ambas provenientes de SP, e que houve discrepância entre as subespécies da quantidade de serpentes com três picos na região de 25 minutos: sete serpentes Cdt (Cdt 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 12, apenas uma de GO e o restante de SP) em comparação com três serpentes Cdc (Cdc 1, 7 e 14, uma de SP e duas de MG).



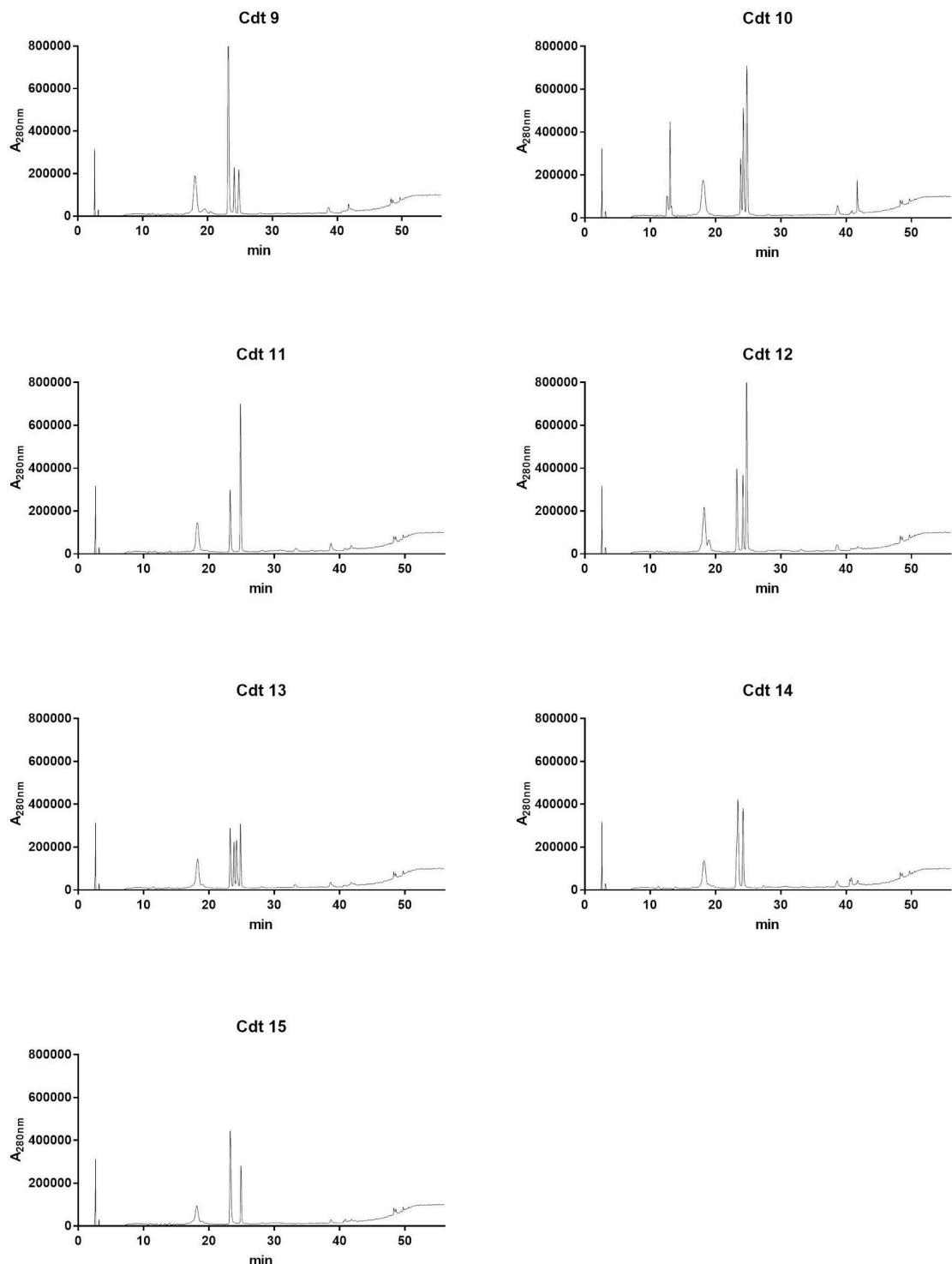


Figura 5. Perfil cromatográfico obtido por Gráficos de HPLC em coluna C18 do veneno das serpentes *C. d. terrificus* (Cdt). O primeiro gráfico (Cdt 1) demonstra a variação do tampão B no decorrer da corrida.

Deve-se notar que a crotamina é um polipeptídeo básico relevante no envenenamento por serpentes Cdc e Cdt, capaz de causar espasmos musculares que podem levar à paralisia espástica dos membros inferiores em ratos (BONI-MITAKE et al, 2006), sendo já realizado ensaios para a purificação e análise deste composto por outros pesquisadores (TOYAMA et al, 2000; KERKIS et al, 2004; CORONADO et al, 2013). Assim como a crotamina, a crotoxina também é de extrema importância para o envenenamento por serpentes Cdc e Cdt (RANGEL-SANTOS et al, 2004; FAURE et al, 1994; FAURE et al, 1987), composta por duas subunidades ligadas não-covalentemente, sendo uma ácida, sem atividade enzimática ou tóxica, e uma básica, com alta atividade enzimática (RANGEL-SANTOS et al, 2004; FAURE et al, 1994; FAURE et al, 1987), que também já foi amplamente estudada (RANGEL-SANTOS et al, 2004; FAURE et al, 1994; FAURE et al, 1987). Estes dois compostos são os principais constituintes do veneno de Cdc e Cdt.

Na análise da atividade enzimática de proteases (figura 6), foram observadas grandes variações entre os espécimes, em especial em relação ao sexo, sendo que todas as serpentes machos da subespécie Cdc apresentaram alta atividade enquanto a maioria das serpentes fêmeas apresentaram baixa atividade. O oposto foi observado para as serpentes Cdt, a maioria das fêmeas demonstrou alta atividade enquanto nenhum macho demonstrou alta atividade. Vale-se notar que tanto metaloproteases quanto serino proteases são capazes de degradar caseína, mas a concentração de metaloproteases em veneno crotálico é consideravelmente baixa, ou seja, a atividade vista é principalmente devido a serinoproteases.

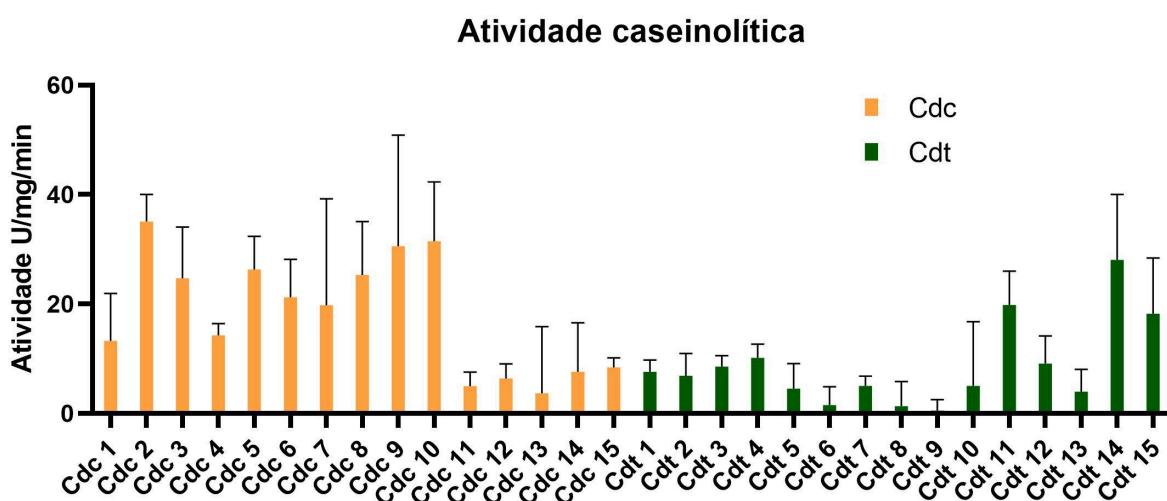


Figura 6. Gráfico da atividade caseinolítica dos venenos de serpentes *C. d. collilineatus*

(Cdc) e *C. d. terrificus* (Cdt). Não foi observada diferença estatisticamente significante ($p<0,005$) em nenhum veneno em comparação com o restante.

A atividade fosfolipásica das serpentes (Figura 7) Cdc apresentou baixa variação, apresentando 3 *outliers*, com maiores atividades. Os espécimes números 4, 9 e 11, que, como citado anteriormente, apresentam uma banda proteica visualizada por meio de SDS-PAGE que as outras serpentes estudadas não apresentam. Entretanto, essa diferença de atividade não possui correlação com seus tamanho, peso, sexo ou procedência, sendo que, assim como muitas outras serpentes também estudadas, possuem pesos de 1,8 a 2,2 kg e são provenientes de Tocantins (4 e 11) e de Goiás (9). As serpentes Cdt apresentaram menor variação entre si, permanecendo na faixa de 16,51 a 44,43 U/mg/min, sem nenhuma correlação com seu tamanho, peso, gênero e procedência.

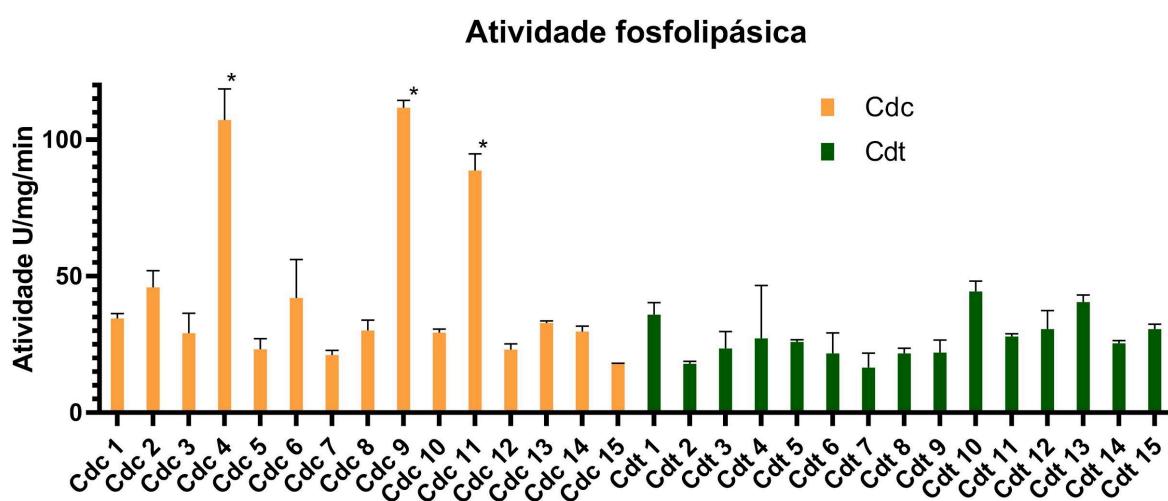


Figura 7. Gráfico da atividade fosfolipásica dos venenos de serpentes Cdc e Cdt. Os indivíduos demarcados com * (Cdc 4, Cdc 9 e Cdc 11) demonstram diferenças significativas ($p\text{-valor}<0,05$) em comparação com as demais serpentes de mesma espécie.

Neste procedimento, foram observadas atividades coagulantes variáveis entre os venenos Cdc e Cdt (Figura 8 e 9), sendo alguns mais coagulantes (Cdc 5, 11 e 12 e Cdt 2, 3 e 13), alguns intermediários e três menos coagulantes (Cdc 14 e Cdt 1 e 9) se comparados com os demais, sendo possível observar uma DMC média geral de aproximadamente 33 µg/mL e 42 µg/mL, para os venenos de Cdc e Cdt, respectivamente. Em relação a dose efetiva de soro

antiveneno (Figura 8 e 9), foram observados valores variáveis entre 0,5 e 2,0 μL , para o veneno de serpentes Cdc, e valores entre 1,1 e 2,9 μL , para o veneno de serpentes Cdt. Os maiores valores observados foram das serpentes Cdc 4 e 14, de Tocantins e de Minas Gerais, respectivamente, indicando que o soro reconheceu e inibiu com menor eficiência o veneno destas serpentes. Enquanto que os menores valores observados foram das serpentes Cdc 3 e 11, de Goiás e de Tocantins, respectivamente, indicando que o soro foi mais eficiente em reconhecer e inibir o veneno destas serpentes.

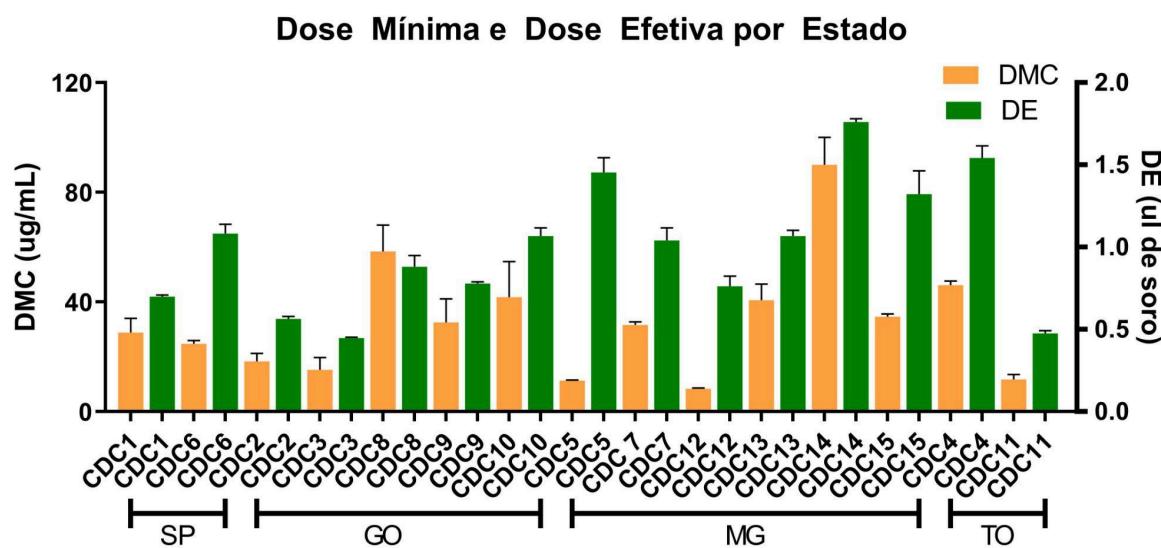


Figura 8. Gráfico da dose mínima coagulante e da dose efetiva de soro para atividade coagulante por estado dos venenos de serpentes Cdc. A dose mínima coagulante (DMC) foi determinada pela quantidade de veneno necessário para coagular plasma humano citratado em 60 segundos. A dose efetiva (DE) foi determinada pela quantidade de soro necessário para triplicar o tempo de coagulação do dobro da DMC do veneno. São Paulo (SP), Goiás (GO), Minas Gerais (MG) e Tocantins (TO).

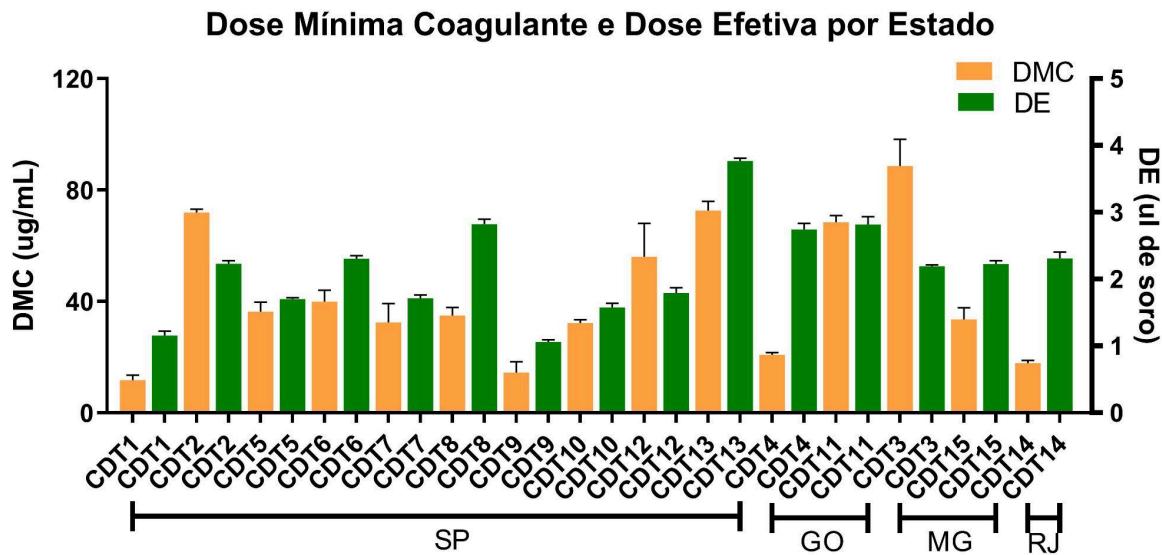


Figura 9. Gráfico da dose mínima coagulante e da dose efetiva de soro para atividade coagulante por estado dos venenos de serpentes Cdt. A dose mínima coagulante (DMC) foi determinada pela quantidade de veneno necessário para coagular plasma humano citratado em 60 segundos. A dose efetiva (DE) foi determinada pela quantidade de soro necessário para triplicar o tempo de coagulação do dobro da DMC do veneno. São Paulo (SP), Goiás (GO), Minas Gerais (MG) e Rio de Janeiro (RJ).

Com relação à atividade fibrinogenolítica dos venenos, nas serpentes Cdc (Figura 10) não foi possível observar nenhuma clivagem total de nenhuma das três cadeias que compõem o fibrinogênio, A alfa (banda superior), B beta (banda mediana) e gama (banda inferior). No entanto, foi possível observar que o veneno das serpentes Cdc 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 demonstraram uma diminuição da intensidade da cadeia alfa conforme o tempo de incubação aumenta, indicando que há de fato quebra do fibrinogênio nesta cadeia e que, caso o tempo de incubação aumentasse, a concentração de veneno aumentasse ou a concentração de fibrinogênio diminuísse, seria possível observar uma clivagem total desta banda. Também foi possível observar clivagem da cadeia B beta tempo-dependente nas serpentes Cdc 2, 5, 6, 12, 13, 14 e 15, demonstrando seletividade primariamente para a cadeia A alfa e secundariamente para a cadeia B beta já que apenas o veneno das serpentes que foram capazes de clivar a cadeia A alfa afetaram a cadeia B beta. Vale-se notar que há um maior número de fêmeas que clivam a cadeia A alfa do que machos (7 fêmeas > 5 machos) e essa variação decorrente do sexo também é observado na clivagem da cadeia B beta (4 fêmeas > 3

machos). Também foi observado que, dentre as 6 serpentes de MG, todas apresentaram esta atividade na cadeia A alfa e apenas uma (serpente Cdc 7) não apresentou atividade na cadeia B beta. Não foi possível observar quaisquer relações em relação à massa ou tamanho da serpente. Em todos os casos, a prévia incubação com soro demonstrou neutralização total da clivagem do fibrinogênio, demonstrando que o tratamento com soro inibe adequadamente a clivagem de fibrinogênio produzida pelo veneno.

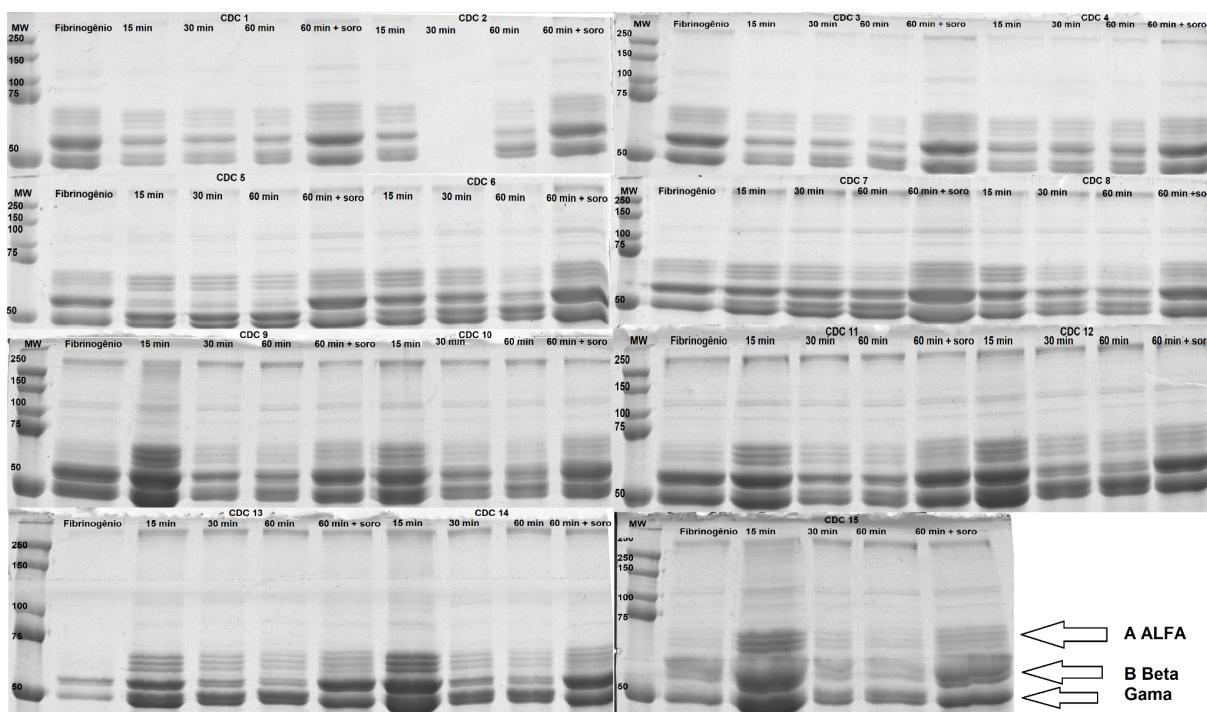


Figura 10. SDS-PAGE 12% demonstrando o perfil de clivagem de fibrinogênio pelo veneno das serpentes da espécie *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc).

Nas serpentes Cdt (Figura 11), também não foi possível observar nenhuma clivagem total de nenhuma das três cadeias A alfa (banda superior), B beta (banda mediana) e gama (banda inferior), mas foi possível observar que o veneno das serpentes Cdt 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11 e 14 demonstraram uma diminuição da intensidade da cadeia alfa conforme o tempo de incubação aumenta. Clivagem na cadeia B beta também foi observada no veneno das serpentes Cdt 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10 e 14, demonstrando diferenciação no resultado das serpentes Cdc, com um número maior de machos apresentando esta atividade (5 machos > 3 fêmeas). Também foi possível observar que ambas as serpentes de GO demonstraram esta atividade, assim como a única serpente de RJ. Além disso, das serpentes de SP, 5 demonstraram atividade e outras 5 não demonstraram esta atividade, indicando não haver relevância em relação à proveniência

de SP. Novamente, as duas serpentes com maior massa estudadas neste projeto (serpente Cdt 4 e 11) demonstraram esta atividade fibrinogenolítica sobre a cadeia A alfa. Assim como com as serpentes Cdc, o tratamento com o soro provou-se adequado para inibir esta atividade de clivagem em todos os venenos testados.

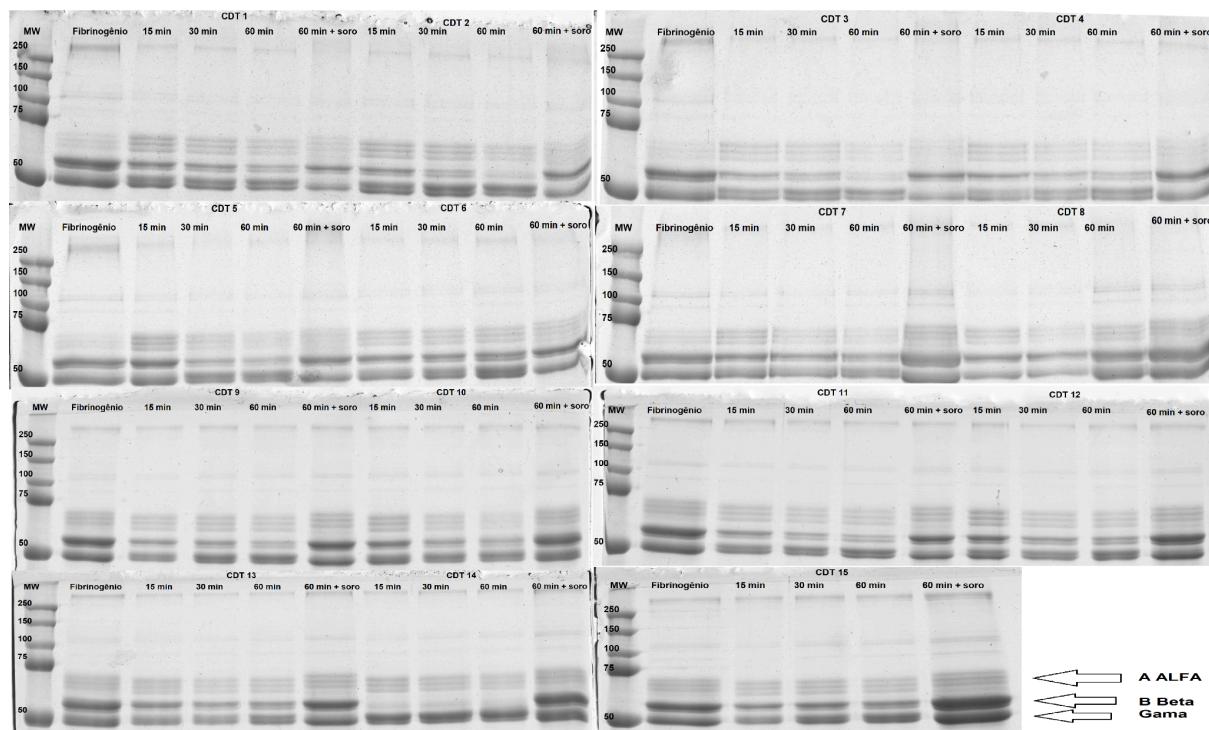


Figura 11. SDS-PAGE 12% demonstrando o perfil de clivagem de fibrinogênio pelo veneno das serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* (Cdt).

Avaliando-se a atividade trombina-símile do veneno das serpentes Cdc (Figura 12), é possível observar que apenas o veneno de duas serpentes (Cdc 5 e 12) são capazes de atingir valores maiores do que aqueles apresentados pela trombina (controle positivo) enquanto o restante permanece abaixo. Vale-se notar que essas serpentes são as únicas provenientes de Araxá (MG), além disso elas apresentam massas de 420 e 465 g, estando entre as serpentes com menores massas estudadas neste projeto. Para os venenos previamente incubados com soro, é possível observar que, inicialmente, todos apresentam valores maiores do que a trombina mas, após a faixa de 4 minutos, não há mais nenhum veneno com valores acima da trombina, indicando que o tratamento com o soro anti-crotálico é adequado para esta atividade. Também vale-se notar que a serpente que previamente demonstrou a maior atividade (serpente Cdc 5) apresenta valores ligeiramente abaixo do controle, acima dos outros venenos.

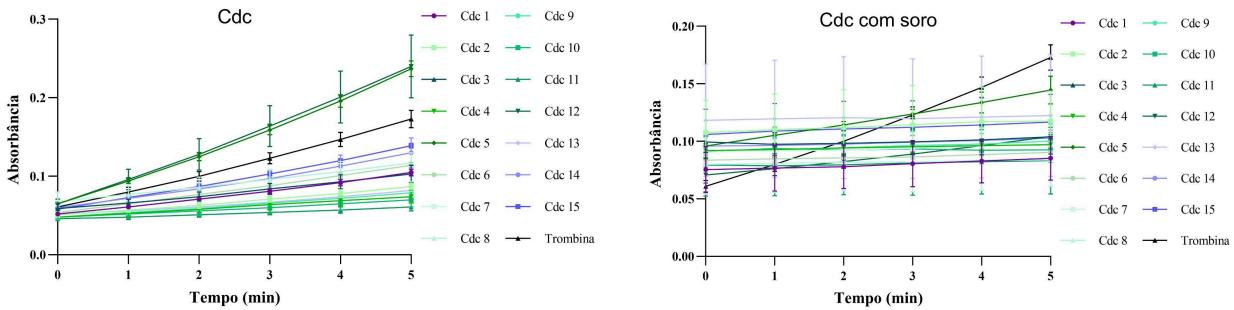


Figura 12. Gráficos de cinética de atividade trombina-símile do veneno das serpentes *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc).

Nos gráficos de cinética de atividade trombina-símile do veneno das serpentes Cdt (Figura 13), é possível observar que o veneno de 4 serpentes (Cdt 1, 9, 11,14) apresentaram valores acima daqueles apresentados pela trombina, sendo duas destas serpentes provenientes de SP, uma de GO e a última do RJ, notando-se que, destas, 3 serpentes são fêmeas. No caso dos venenos previamente incubados com soro, novamente foi possível observar eficácia no tratamento com soro, visto que apenas o veneno de uma serpente (Cdt 14) conseguiu se manter acima do valor do controle.

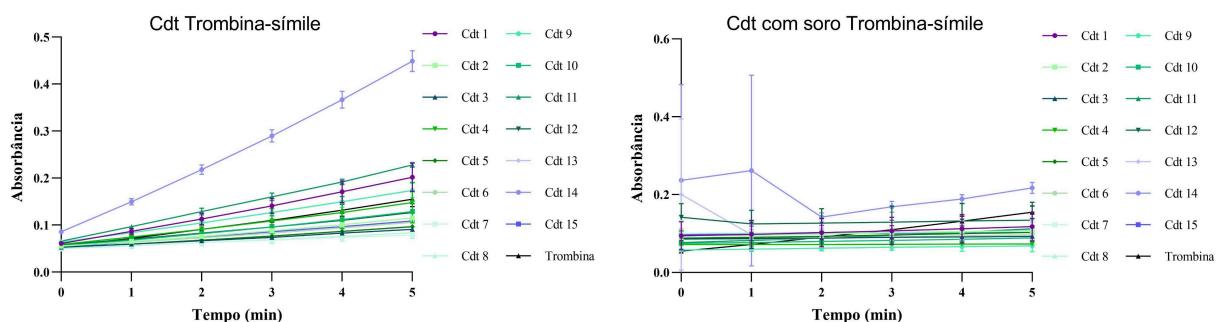


Figura 13. Gráficos de cinética de atividade trombina-símile do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt).

De acordo com os gráficos de cinética, os gráficos de *endpoint* (Figuras 14 e 15) demonstram que os venenos apresentaram baixos valores para todas as serpentes, exceto as serpentes Cdc 5 e 12 e Cdt 1, 4, 9, 11 e 14. Enquanto que, com a incubação com o soro anti-crotálico, foi observada uma significativa diminuição na atividade dos venenos de todas as serpentes estudadas, com poucos demonstrando alguma atividade, indicando que o

tratamento com o soro é adequado para inibir esta atividade.

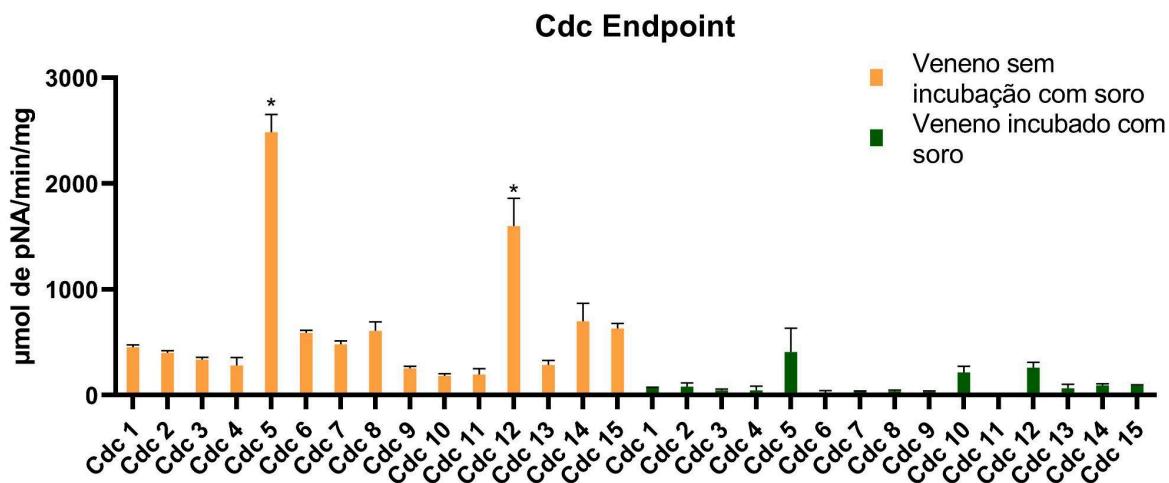


Figura 14. Gráficos de *endpoint* de atividade trombina-símile do veneno das serpentes *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc). Foi determinado que um aumento de 0.009 de absorbância equivale a liberação de 1 μmol de pNA (ZAQUEO et al, 2016). Os venenos demarcados com * demonstram diferenças significativas ($p\text{-valor}<0,05$) em comparação com os demais venenos.

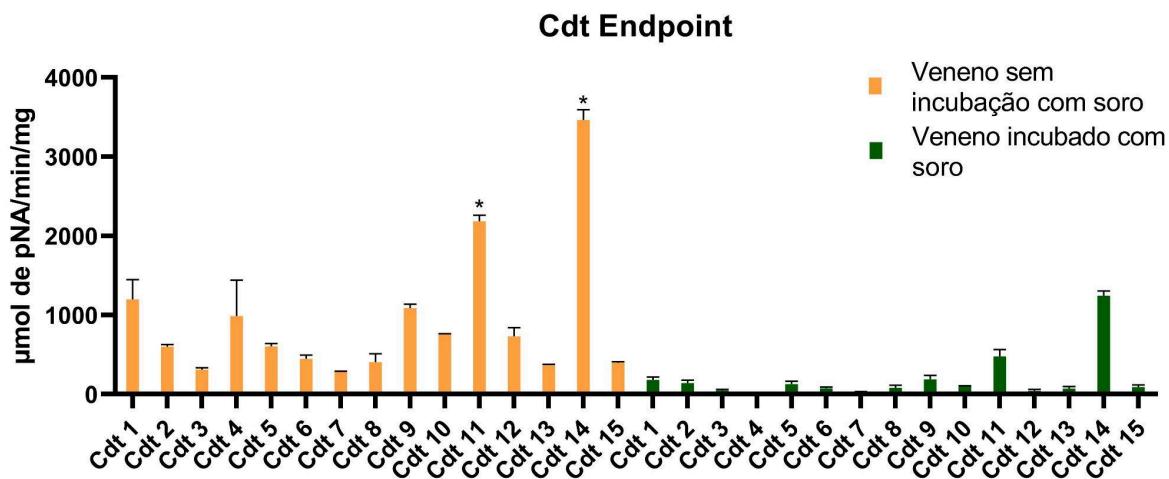


Figura 15. Gráficos de *endpoint* de atividade trombina-símile do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt). Foi determinado que um aumento de 0.009 de absorbância equivale a liberação de 1 μmol de pNA (ZAQUEO et al, 2016). Os venenos demarcados com * demonstram diferenças significativas ($p\text{-valor}<0,05$) em comparação com os demais venenos.

os demais venenos.

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil coagulotóxico de duas subespécies de *Crotalus durissus*, espécie que apresenta a maior taxa de letalidade por acidente ofídico no território brasileiro. Apesar de já existirem soros antivenenos eficazes, é reconhecido que a variação genética de serpentes da mesma espécie levam a uma menor eficiência neste tratamento (Sunagar et al, 2014). Desta maneira, vê-se necessário a constante atualização do perfil composicional e funcional individual do veneno de serpentes.

Os resultados apresentados da dose mínima coagulante (DMC) estão de acordo com aqueles observados por Santoro et al, 1999 que observou um valor de 21,9 µg/mL. Notando-se que Santoro et al utilizou *pools* de venenos, não sendo possível observar variações individuais como aquelas observadas neste projeto, que produziram uma média de 33 µg/mL e 42 µg/mL, para os venenos de serpentes Cdc e Cdt, respectivamente.

Não foi possível obter dados em outros projetos que relacionem a dose efetiva de soro para estas espécies. Foi possível observar que em diversos venenos de Cdc, quanto maior a atividade coagulante do veneno (menor o valor de DMC) mais soro seria necessário, sendo as exceções o veneno das serpentes Cdc 8 e 14, de Goiás e de Minas Gerais, respectivamente, que possuem baixa atividade coagulante mas ainda assim, necessitam de uma quantidade considerável de soro para inibir esta atividade. Este fator não é observado nos venenos das serpentes Cdt, não sendo possível observar correlações entre a DMC e a DE.

Os resultados observados no presente estudo estão de acordo com aqueles descritos por De Oliveira, 2009 que observou que o veneno das subespécies Cdc e Cdt degradam as cadeias A alfa e B beta do fibrinogênio de maneira tempo-dependente e degradando primariamente a cadeia A alfa e secundariamente a cadeia B beta, não possuindo atividade na cadeia gama.

A atividade trombina-símile encontrada é principalmente devido a serinoproteases, algumas já sendo isoladas e caracterizadas como a giroxina por Alexander et al, 1988, a enzima trombina-símile isolada por Raw et al, 1986 e a proteína giroxina-símile e trombina-símile encontrada por Boldrini-França et al, 2009. Os resultados apresentados estão de acordo com aqueles observados por diversos grupos (SANTORO et al, 1999;

SANO-MARTINS, 2001; FURTADO et al, 2003), apresentando atividade trombina-símile mas não maior do que a atividade apresentada por outras espécies de serpentes (SOUSA et al, 2018).

Atualmente o soro anticrotálico no Brasil é produzido utilizando-se um pool de venenos de serpentes crotálicas (50% *Crotalus durissus terrificus* e 50% *Crotalus durissus collilineatus*) e é reconhecido por ser o único tratamento aprovado e eficaz para acidentes ofídicos. Mas apresenta alguns problemas:

- é altamente dependente do perfil do veneno utilizado que pode variar muito dentro de uma mesma espécie devido a idade, habitat, dieta, sazonalidade e variação genética (AGUILAR et al, 2007; BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010; da SILVA-JÚNIOR et al, 2020; de LIMA et al, 2021);
- são altamente imunogênicos e causam diversos efeitos adversos no paciente;
- possuem uma baixa quantidade de anticorpos que vão agir ativamente nas moléculas do veneno (LAUSTSEN et al, 2015), sendo muito custoso para a indústria adicionar mais um passo na fabricação do soro que iria filtrar anticorpos de veneno de anticorpos não específicos do animal doador (HABIB et al, 2018).

Recentemente, pesquisas foram realizadas com o intuito de melhorar ou criar um tratamento mais efetivo de acidentes ofídicos. Como: soros produzidos a partir de proteínas específicas através de separação por HPLC (KUNIYOSHI et al, 2019 e CARDONA-RUDA et al, 2022) ou por tecnologias recombinantes (LIU et al, 2021 e ALOMRAN et al, 2022), adição de inibidores sintéticos no soro antiofídico (GUTIÉRREZ et al, 2021), purificação dos anticorpos provenientes do animal doador (LAUSTSEN et al, 2017), etc.

Neste projeto, foi possível observar que o soro antiveneno continua sendo efetivo, para as atividades analisadas, para o tratamento do acidente ofídico pelas serpentes *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus* mas vale-se notar que não foram feitos testes com as outras subespécies de *Crotalus* presentes no Brasil e que não foram avaliados o efeito deste tratamento após um longo período de tempo para se observar sequelas causadas pelo acidente ofídico e respectivo tratamento, como efeito anti-inflamatório visto horas ou dias após o acidente (NUNES et al, 2010).

6. CONCLUSÕES

O presente estudo destacou a importância da análise individual de venenos ofídicos devidos a sua alta variação composicional e funcional. Um soro antiofídico produzido principalmente a partir do veneno de serpentes de uma única região não necessariamente será tão efetivo para acidentes causados por serpentes, mesmo que sejam da mesma espécie, de outra região. Apontado este fato, o soro ainda se mostrou eficaz em completamente inibir ou diminuir a atividade coagulotóxica dos venenos. Mas ainda vê-se necessário que novos estudos em relação ao melhoramento do atual tratamento antiofídico sejam realizados.

7. REFERÊNCIAS

- AGUILAR, I., GUERRERO, B., MARIA SALAZAR, A., GIRÓN, M. E., PÉREZ, J. C., SÁNCHEZ, E. E., & RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*, 50(2), 214–224, 2007.
- ALEXANDER, Guillermo, et al. "Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme." *Toxicon* 26.10 (1988): 953-960.
- ALOMRAN, Nessrin et al. Exploring the utility of recombinant snake venom serine protease toxins as immunogens for generating experimental snakebite antivenoms. *Toxins*, v. 14, n. 7, p. 443, 2022.
- BASTOS, C. M. A.; VUADEN, F. C.; BONAN, C. D.; SPENCER, PATRICK J.; CASARE, M.; MAGRISSO, A.; CABERLON, E.; ALVES, M. L. M.; DE ARAUJO, M. L.; MUNHOZ, T.; DE OLIVEIRA, J. R. Determinação das alterações causadas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a atividade das E-NTPDases na capacidade de agregação de plaquetas humanas. 2007. Disponível em: <<http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/291/1/390935.pdf>>. Acesso em 06 de maio de 2020.
- BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C. SILVA, M.M.S.; RODRIGUES, R.S.; DE LA TORRE, P.; PÉREZ, A.; SOARES, A.M., ZINGALI, R.B.; NOGUEIRA, R.A.; RODRIGUES, V.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of Proteomics*. v. 73, n. 9, p. 1758-1776, Agosto, 2010.
- BOLDRINI-FRANÇA, Johara, et al. "Crotalus durissus collilineatus venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile." *Biochimie* 91.5 (2009): 586-595.
- BONI-MITAKE, M., et al. "Distribution of 125I-labeled crotamine in mice tissues." *Toxicon* 48.5 (2006): 550-555.
- BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- Brasil. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, 1998
- Brasil. Ministério da Saúde. Ofidismo: Análise Epidemiológica. Brasília, 1991.
- CALVETE, J. J., SANZ, L., CID, P., de la TORRE, P., FLORES-DIAZ, M., DOS SANTOS, M. C., ... GUTIÉRREZ, J. M. (2010). Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 528–544.
- CALVETE, J. J.; JU, P.; SANZ, L. Snake venomics . Strategy and applications, no. July, pp. 1405–1414, 2007.

- CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES A.; VARGAS A. M.; LOMONTE, B. et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics*. 74(4):510–527, 2011.
- CARDONA-RUDA, Ana; REY-SUÁREZ, Paola; NÚÑEZ, Vitelbina. Anti-neurotoxins from *Micrurus mipartitus* in the development of coral Snake antivenoms. *Toxins*, v. 14, n. 4, p. 265, 2022.
- CORONADO, MONIKA A., et al. "Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69.10 (2013): 1958-1964.
- da SILVA-JÚNIOR, L. N., ABREU, L. S., RODRIGUES, C. F. B., et al. Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020;26:e20200016. Published 2020 Aug 26.
- de LIMA, E. O. V., TASIMA, L. J. HATAKEYAMA, D. M., et al. Snake venom color and L-amino acid oxidase: An evidence of long-term captive *Crotalus durissus terrificus* venom plasticity. *Toxicon*, 2021.
- DE OLIVEIRA, Daniela GL, et al. "Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*." *Acta Biochim Biophys Sin* 41.1 (2009): 21-29.
- FAURE, GRAZYNA, and CASSIAN BON. "Several isoforms of crototoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*." *Toxicon* 25.2 (1987): 229-234.
- FAURE, GRAZYNA, et al. "The origin of the diversity of crototoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*." *European Journal of Biochemistry* 223.1 (1994): 161-164.
- FURTADO MFD, Santos MC, Kamiguti AS. Age-related biological activity of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2003;9:186–201.
- FUSCO, LUCIANO S., et al. "Fast venomic analysis of *Crotalus durissus terrificus* from northeastern Argentina." *Toxicon: X* 7 (2020): 100047.
- GALIZIO N. D. C. et al., "Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes," *J Proteomics*, vol. 186, pp. 56–70, 2018.
- GUEDES, Thaís B.; ENTIAUSPE-NETO, Omar M.; COSTA, Henrique Caldeira. Lista de répteis do Brasil: atualização de 2022. *Herpetologia Brasileira*, v. 12, n. 1, p. 56-161, 2023.
- 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*. 2011, 1-16.
- GUTIÉRREZ, José María et al. The search for natural and synthetic inhibitors that would complement antivenoms as therapeutics for snakebite envenoming. *Toxins*, v. 13, n. 7, p. 451, 2021.
- HABIB, Abdulrazaq G.; BROWN, Nicholas I. The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon*, v. 150, p. 115-123, 2018.
- HOLZER M. and MACKESSY S. P., An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2., *Toxicon*, vol. 34, no. 10, pp. 1149–55, Oct. 1996.
- Instituto Butantan, "Website," 2016. [Online]. Available: <http://www.butantan.gov.br/>.
- KERKIS, ALEXANDRE, et al. "Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*." *The FASEB journal* 18.12 (2004): 1407-1409.
- KUNIYOSHI, Alexandre Kazuo et al. Experimental antivenom against serine proteases from the *Bothrops jararaca* venom obtained in mice, and its comparison with the anticoagulant serum from the Butantan Institute. *Toxicon*, v. 169, p. 59-67, 2019.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970.
- LAUSTSEN, Andreas Hougaard et al. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. *Toxicon*, v. 104, p. 43-45, 2015.

- LAUSTSEN, Andreas H. et al. Recombinant snakebite antivenoms: A cost-competitive solution to a neglected tropical disease?. PLoS neglected tropical diseases, v. 11, n. 2, p. e0005361, 2017.
- LIU, Bing-Sin et al. Development of a broad-spectrum antiserum against cobra venoms using recombinant three-finger toxins. Toxins, v. 13, n. 8, p. 556, 2021.
- MENEZES, Milene C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. Toxicon, v. 47, n. 3, p. 304-312, 2006.
- Organizaçāo Mundial de Saúde (OMS). Snakebite envenoming. Organizaçāo Mundial, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>>. Acesso em: 06 de maio de 2020.
- NUNES, F. P. B. et al. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. Toxicon, v. 55, n. 6, p. 1100-1106, 2010.
- PEICHOTO M. E. et al., Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing alpha-fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom, Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj., vol. 1770, no. 5, pp. 810–819, 2007.
- PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. Rev. Assoc. Med. Brás., São Paulo , v. 47, n. 1, p. 24-29, Mar. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302001000100026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 de maio de 2020.
- RANGEL-SANTOS, A., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M., & CARDOSO, D. F. (2004). Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon, v. 44, n. 6, p. 609–616, Novembro, 2004
- RAW, I., et al. "Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*." Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas 19.3 (1986): 333-338.
- RODRIGUES, Carolina Rego et al. Biological and proteomic characterization of the venom from Peruvian Andes rattlesnake *Crotalus durissus*. Toxicon, v. 207, p. 31-42, 2022.
- SÁNCHEZ, M., SOLANO, G., VARGAS, M., RETA-MARES, F., NERI-CASTRO, É., ALAGÓN, A., ... SEGURA, Á. (2020). Toxicological profile of medically relevant *Crotalus* species from Mexico and their neutralization by a *Crotalus basiliscus/Bothrops asper* antivenom. Toxicon.
- SANO-MARTINS, I. S., et al. "Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil." Qjm 94.10 (2001): 551-559.
- SANTORO, M. L., Sousa-e-Silva, M. C. C., Gonçalves, L. R. C., Almeida-Santos, S. M., Cardoso, D. F., Laporta-Ferreira, I. L., ... Sano-Martins, I. S. (1999). Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 122(1), 61–73. doi:10.1016/s0742-8413(98)10079-8
- SILVA-JÚNIOR, LEANDRO NORBERTO da, et al. "Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes." Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases 26 (2020).
- SOUSA L. F. et al., Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation, Toxins (Basel)., vol. 10, no. 10, 2018.
- SUNAGAR, Kartik et al. Intraspecific venom variation in the medically significant Southern Pacific Rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): biodiscovery, clinical and evolutionary implications. Journal of proteomics, v. 99, p. 68-83, 2014.
- TASIMA, L. J.; SERINO-SILVA, C.; HATAKEYAMA, D. M.; NISHIDUKA, E. S.; TASHIMA, A. K.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; DE MORAIS-ZANI, K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Crotamine in *Crotalus durissus*: distribution according to subspecies and geographic origin, in captivity or nature, Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7187639/#B36>> . Acesso em 14 de Maio de 2020.
- THEAKSTON R. D. G. and REID H. A., Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake

venoms, Bull. World Health Organ., vol. 61, no. 6, p. 949, 1983.

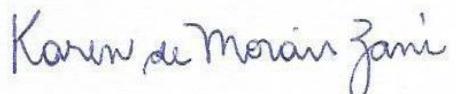
TOYAMA, MARCOS H., et al. "Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1474.1 (2000): 56-60.

YAMAZAKI, Y. and MORITA, T. Snake Venom Components Affecting Blood Coagulation and the Vascular System: Structural Similarities and Marked Diversity, Curr. Pharm. Des., 2007.

ZAQUEO, Kayena D. et al. BbrzSP-32, the first serine protease isolated from Bothrops brazili venom: Purification and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 195, p. 15-25, 2016.



Luccas Daniel Padueli



Dra. Karen de Morais-Zani