

Wellington da Silva Santos

Análise proteômica dos efeitos cardiotoxicos da peçonha de
Crotalus durissus terrificus

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia
do Instituto Butantan para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Versão corrigida.

São Paulo

2021

Wellington da Silva Santos

Análise proteômica dos efeitos cardiotoxicos da peçonha de
Crotalus durissus terrificus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Leo Kei Iwai

Versão corrigida.

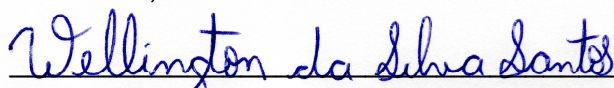
São Paulo

2021

Versão corrigida

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com anuência de seu orientador.

São Paulo, 13 de dezembro de 2021.



Wellington da Silva Santos



Leo Kei Iwai

Catlogação na publicação Instituto Butantan Dados inseridos pelo aluno

Santos, Wellington da Silva

Análise proteômica dos efeitos cardiotoxicos da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* / Wellington da Silva Santos ; orientador (a) Leo Kei Iwai – São Paulo, 2021.

115 p. : il.

Dissertação (Mestrado acadêmico) – Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Toxinas e sistemas biológicos.

Versão corrigida final.

1. Cascavel. 2. Coração. 3. Espectrometria de massas. 4. Toxinas e sistemas biológicos. I. Iwai, Leo Kei. II. Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação Ciências - Toxinologia. IV. Título.

CDD 615.9

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

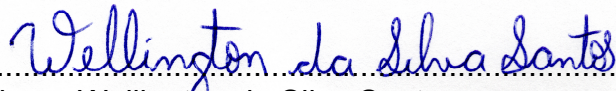
Eu, Wellington da Silva Santos, aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação após a data da defesa:


- () Imediato
(X) 06 meses
() 12 meses
() Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 30 de agosto de 2021


.....
Aluno: Wellington da Silva Santos

De acordo:
Orientador: Dr. Leo Kei Iwai



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN



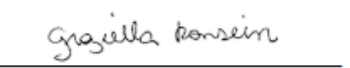
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO: WELLINGTON DA SILVA SANTOS

DATA DO EXAME: 22/10/2021

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Leo Kei Iwai (Presidente)		(X)	()
Daniel Carvalho Pimenta		(X)	()
Graziella Eliza Ronsein		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADO (X) REPROVADO ()

Comentários da Banca (opcional):

CERTIFIED

We certify that the Research "Proteomic analysis of the cardiotoxic effect of Crotalus durissus terrificus snake venom", protocol number CEUAX 2283181019, under the responsibility Leo Kei Iwai, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute, and was approved in the meeting of day November 27, 2019.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Análise proteômica dos efeitos cardiotoxícos da peçonha de Crotalus durissus terrificus ", protocolado sob o CEUAX nº 2283181019, sob a responsabilidade de Leo Kei Iwai, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, e foi aprovado na reunião de 27 de novembro de 2019.



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

São Paulo, 02 de dezembro de 2019
CEUax N [2283181019](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Leo Kei Iwai

Área: Lab. Especial De Toxicologia Aplicada

Equipe envolvida: Wellington Da Silva Santos - **executor** (instituto Butantan); Leo Kei Iwai (orientador)

Título do projeto: "Análise proteômica dos efeitos cardiotoxicos da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 27/11/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Aos meus pais Maria Benice e José Francisco, meus irmãos Wuelber e Widnei por todo incentivo fundamental para a minha formação.

Amo vocês e muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha base espiritual.

Aos meus pais e meus irmãos que mesmo não compreendendo dos assuntos a fundo aqui apresentados, sempre foram prestativos em me ouvir sobre os meus resultados e andamento do mestrado. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao meu orientador Dr. Leo Kei Iwai pelo apoio e suporte para o andamento e desenvolvimento deste trabalho. Além de ser uma pessoa compreensiva e de bom coração.

Aos meus amigos de laboratório Fabio Montoni, Carolina Kasaki (Carol), Stephanie Arcos (Ste) e Hamida Calacina (Hamy), por todo auxílio na realização de experimentos, ajuda nos momentos de desespero e pelos momentos de risadas e rolês após expediente na época de laboratório. À Kimberly Borges (Kim) que chegou nesses últimos meses ao laboratório e que também teve a sua contribuição neste trabalho na etapa final.

Às minhas cunhadas Mikaella Barbosa (Mika) e Viviane Estevan (Vivi), pelos momentos de descontração, conversas e sessão cinema em casa em família.

Aos professores da pós-graduação em Toxinologia pelos bons momentos de trocas de experiências e dicas que ajudaram na escrita e desenvolvimento deste trabalho. E por toda a motivação e dedicação na hora de ensinar e orientar, sem dúvida vocês fazem a diferença no Instituto Butantan.

À Dra. Solange Serrano e sua equipe composta por Carolina Brás (Carol), Débora Andrade (Debs), Daniela Cajado (Dani), Milene Menezes, Dilza Trevisan e demais pessoas por toda ajuda e por permitirem que eu utilizasse o laboratório para a realização de alguns experimentos. E pelas dicas e comentários pertinentes que ajudaram a desenrolar esse projeto, e pela companhia de alguns até tarde da noite no laboratório.

Aos técnicos de laboratório Ivan, Ismael, Nancy e Mariana por terem me ajudado a manipular equipamentos específicos e essenciais na realização de experimentos deste trabalho. E à dona Lídia pelo seu café que sempre me deixava acordado.

Às secretarias Leda, Leila e Sueli por toda ajuda na resolução de assuntos envolvendo as burocracias rotineiras do laboratório. Além das conversas que ajudaram a me distrair um pouco nos dias mais corridos.

Ao professor Hugo e pós-doutorandos por todas as dicas e conversas sobre ciência que foram pertinentes para a escrita deste documento.

Aos Doutores Milton Yutaka, Rosangela Aparecida dos Santos Eichler, Diana Zukas Andreotti e Valdemir Melechco Carvalho e os professores Emer Suavinho Ferro e Zhibin Chen por todo suporte e dicas para a realização de análises e discussão de dados envolvidos nesse trabalho e no manuscrito submetido para publicação.

À Magna Aparecida Maltauro Soares e ao Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves, ambos do Laboratório de Fisiopatologia por toda ajuda na confecção das lâminas para as análises histológicas.

Ao pessoal do Laboratório de química de proteínas, à equipe do Dr. Pedro por toda ajuda na realização de experimentos, conversas e momentos na pausa do café da tarde.

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação em Toxinologia, por todas as conversas jogadas fora e desabafos durante os intervalos das aulas presenciais em um momento anterior a essa pandemia.

À minhas tias Lurdes (Lulu) e Lindalva (tia Bah) por sempre se preocuparem comigo e por perguntarem sobre minha saúde física e mental. E por todas as vezes que me deixaram utilizar um espaçozinho para trabalhar quando eu não podia escrever em casa.

Aos meus primos Elaine (Nany), Dayane (Day), Kamyła (Mila), Mirella (Mila), Ronaldo (Naldo), Vinicius (Vini), Alessandro (Dario), Thais (Thata), Thayna (Thatinha), Edson, Ronaldo (padre), Ana Alice (Aninha) e aos demais familiares por todo o suporte emocional, as brincadeiras, as risadas e companheirismo.

Aos meus amigos de longa data da igreja Beatriz (Bia), Isabela (Isa), Nathália Gitti (Nathy), Sara Schützer (Sarinha), Andreia Alves (Déia), Gabriel Capobianco (Kapo), Bruno Gitti (Brunão), André (Andrezinho), Laisla Taiane (maninha), Luana Farias (Luh), Raquel Alves (Quel), Calebe (Kah) meu cooperador de jovens, Vanessa Carvalho (Van), Deus abençoe vocês, por todos os momentos de risadas, conversas, cantorias e os momentos de orações anteriores a pandemia, e que mesmo distantes vocês têm se mostrado presentes na minha vida.

Às minhas amigas Nahanna (Nah), Bruna (Bru) e Bianca (Bia) que me incentivaram a se aventurar nessa vida de pós-graduando e por sempre me perguntarem e se importarem com toda a minha trajetória no mestrado.

À minha docente de acompanhamento Dra. Juliana Mozer Sciani pelo suporte na análise dos relatórios e no andamento desta pesquisa.

Ao pessoal da biblioteca na hora de padronizar e organizar a estrutura deste trabalho, com vocês as normas da ABNT ficaram mais leve.

Ao pessoal da secretaria da pós-graduação em Toxinologia e a ESIB pelo acompanhamento de todas as etapas e cobranças durante todo meu desenvolvimento como aluno de mestrado.

À todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Este trabalho teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), número do processo [88882.442313/2019-01] e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), número dos processos [2013/07467-1], [2016/04000-3] e [2017/17943-6].

"A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído"

Confúcio

RESUMO

SANTOS, Wellington da Silva. **Análise proteômica dos efeitos cardiotoxicos da peçonha de *Crotalus durissus terrificus***. 2021. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2021.

Todo ano, aproximadamente 2,7 milhões de indivíduos são mordidos por serpentes peçonhentas em todo o mundo. Dentre eles, são reportados cerca de 490.000 amputações e 130.000 óbitos bem como outros problemas graves de saúde resultante da mordida por serpentes. No Brasil, a serpente *Crotalus durissus* popularmente conhecida como cascavel é a única espécie do gênero *Crotalus* representada em todo o território. Essa serpente é a mais letal e a segunda maior responsável pelos acidentes na população. A subespécie *Crotalus durissus terrificus* é encontrada predominantemente nas regiões Sul e Sudeste do país e possui uma peçonha conhecida por apresentar efeitos neurotóxicos, nefrotóxicos, miotóxicos, cardiotoxicos e por causar distúrbios hemolíticos e quadros de coagulopatias. Na literatura são encontrados muitos relatos que descrevem os aspectos patológicos, clínicos, toxicológicos, fisiológicos e bioquímicos dos efeitos do envenenamento em vários órgãos, contudo existem poucos registros descrevendo o efeito do envenenamento a nível molecular. Dessa forma, neste projeto foram avaliados os efeitos da peçonha da serpente *C. d. terrificus* no coração de camundongos de linhagem Swiss 1 h, 6 h, 12 h e 24 h após a aplicação de 0,5 DL50 da peçonha no músculo gastrocnêmio. O coração dos animais foi dissecado e lisado com tampão PTS. As proteínas cardíacas foram então extraídas, modificadas quimicamente (reduzidas e alquiladas), digeridas com tripsina e os peptídeos trípticos resultantes foram marcados com formaldeído leve (grupo controle) e pesado (grupo tratado com a peçonha) e submetidos à análise por espectrometria de massas de alta resolução. Foram identificadas mais de 1300 proteínas das quais várias delas apresentaram alterações no perfil quantitativo ao longo do tempo após o tratamento com a peçonha. A análise do perfil proteico mostrou os efeitos tóxicos da peçonha no coração do camundongo modulando várias proteínas associadas às mitocôndrias e relacionadas com cardiomiopatias hipertrófica e dilatada. As mudanças na abundância dessas proteínas sugerem como elas podem atuar sinergicamente sobre um quadro de envenenamento no tecido cardíaco por meio de distintos efeitos imunológicos e bioquímicos.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*. Camundongo. Coração. Espectrometria de massas. Proteômica.

ABSTRACT

SANTOS, Wellington da Silva. **Proteomic analysis of the cardiotoxic effects of the *Crotalus durissus terrificus* venom**. 2021. 115 p. Master's thesis (Master's degree in Sciences - Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2021.

Every year, approximately 2.7 million individuals are bitten by venomous snakes worldwide. Among them, about 490,000 amputations and 130,000 deaths are reported, as well as other serious health problems resulting from snake bites. In Brazil, *Crotalus durissus*, popularly known as rattlesnake is the only species of the *Crotalus* genus found in the entire country. This snake is the most lethal and the second most responsible for accidents in the population. *Crotalus durissus terrificus* is found predominantly in the South and Southeast of Brazil. Its venom is known for presenting neurotoxic, nephrotoxic, myotoxic and cardiotoxic effects and for causing hemolytic disorders and coagulopathies. Several reports in the literature describe the pathological, clinical, toxicological, physiological, and biochemical aspects of the effects of the envenomation in various organs, however there are few works describing the effect of the venom at the molecular level. In this project, we analyzed the effects of the *C. d. terrificus* snake venom in the heart of mice of the Swiss strain at 1 h, 6 h, 12 h and 24 h, after the application of 0.5 DL50 of the venom in the gastrocnemius muscle. The animals' hearts were dissected and lysed with PTS buffer. Cardiac proteins were extracted, chemically modified (reduced and alkylated), digested with trypsin and the resulting tryptic peptides were labeled with light (control group) and heavy (venom treated group) dimethyl reagent and subjected to high-resolution mass spectrometry analysis. More than 1300 proteins were identified, several of them showed changes in the quantitative profile over the time after the venom treatment. The venom modulated several proteins associated with mitochondria and related to hypertrophic and dilated cardiomyopathies. Changes in the protein abundance suggests how proteins act synergistically upon envenomation in cardiac tissue, through distinct immunological and biochemical effects.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*. Mouse. Heart. Mass spectrometry. Proteomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	27
Figura 2 - Anatomia do coração humano	30
Figura 3 - Abordagem experimental do projeto	40
Figura 4 - Identificação e comparação geral de proteínas obtidas das amostras tratadas com salina e com a peçonha.....	42
Figura 5 - Identificação geral de proteínas na condição tratado com a peçonha de <i>C. d. terrificus</i>	44
Figura 6 - Análise funcional semi-quantitativa para enriquecimento do fenótipo de mamíferos	47
Figura 7 - Agrupamento hierárquico dos níveis de quantificação de proteínas em 1 h, 6 h, 12 h e 24 h de tratamento com salina ou a peçonha de <i>C. d. terrificus</i>	48
Figura 8 - Análise de Componentes Principais.....	51
Figura 9 - Análise de vias de proteínas no STRING e Cytoscape	52
Figura 10 – Análise microscópica por hematoxilina-eosina do coração dos camundongos.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de notificações de acidentes segundo o tipo de serpente do Brasil	23
Tabela 2 - Número de óbitos notificados após o agravamento do acidente por serpentes peçonhentas brasileiras.....	23
Tabela 3 - Quantificação de proteínas extraídas dos corações tratados com salina e peçonha de <i>C. d. terrificus</i>	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Ofidismo no Brasil	21
1.2 A espécie <i>Crotalus durissus</i>	24
1.3 Coração	29
1.4 Análise proteômica baseada em espectrometria de massas	32
1.5 Estudos proteômicos voltados à toxicologia	35
2 OBJETIVOS	39
2.1 Geral	39
2.2 Específicos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Proteínas exclusivamente identificadas no tratamento com a peçonha de <i>C. d. terrificus</i>	41
4.2 Análise semi-quantitativa	45
4.3 Análise de PCA	49
4.4 Análise de vias	51
4.5 Análise histológica	53
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE	73
ANEXOS	113

1 INTRODUÇÃO

Podemos encontrar toxinas em diversas espécies de seres vivos que vão desde organismos simples unicelulares até os organismos mais complexos como pássaros, répteis, mamíferos, etc. (DART; RUSSELL, 1991; DUMBACHER; SPANDE; DALY, 2000). Ao longo do tempo, certas espécies de animais desenvolveram estruturas especializadas em inocular toxinas (substâncias também chamadas de peçonha) em suas presas, de forma que esses animais acabaram sendo denominados como animais peçonhentos. Assim, a toxina ou peçonha é produzida nessas glândulas dedicadas a essa função. Essa adaptação permite que as serpentes peçonhentas capturem presas, facilita a digestão do alimento e permite a defesa contra potenciais agressores (KARDONG, 1982; MEBS, 1999). Uma grande parcela das espécies de serpentes encontradas na natureza desenvolveu essas estruturas a fim de se adaptarem e sobreviverem no meio em que habitam (NOGUEIRA; SAKATE; BARROS, 2004).

A peçonha das serpentes é rica em diversas moléculas, principalmente de proteínas que favorecem uma atividade tóxica contra a homeostasia dos indivíduos afetados pelas suas toxinas. Para que isso seja possível, a peçonha causa diversos efeitos sobre a presa, tais como: imobilização, paralisação, morte e digestão tecidual (LYNCH, 2007). Alguns desses efeitos resultam em respostas farmacológicas que são de interesse no ponto de vista medicinal, sendo que determinadas proteínas presentes na peçonha possuem valor farmacêutico e biotecnológico, podendo ser usadas para o desenvolvimento de novas drogas e tratamentos para diversas doenças (FOX; SERRANO, 2007).

Porém, para a saúde pública global, os acidentes por serpentes peçonhentas são considerados como uma doença tropical negligenciada (DTN), sendo que as regiões mais afetadas com esse tipo de acidente são áreas rurais de países tropicais e subtropicais, principalmente em países em desenvolvimento. A mordida destas serpentes pode provocar no indivíduo afetado diversos distúrbios fisiológicos e, em casos mais graves, resulta na morte do indivíduo. Todo ano, aproximadamente 2,7 milhões de indivíduos são mordidos por serpentes peçonhentas em todo o mundo, onde são reportadas cerca de 490.000 amputações e até 138 mil óbitos por ano, fora os demais problemas graves de saúde decorrentes do acidente. Além disso, o valor econômico gasto por conta desses envenenamentos acaba sendo incontrolável na

maioria dos países, particularmente os que possuem comunidades pobres de baixa renda e os que não têm programas de seguro social (WHO, 2019).

1.1 Ofidismo no Brasil

No geral, as serpentes peçonhentas no geral, conseguem injetar as toxinas contidas em glândulas especializadas para esta finalidade em suas vítimas através da mordida por intermédio de suas presas funcionais. Esse fenômeno é possível por conta da evolução dos dentes, da cinética do crânio, e do desenvolvimento dessas glândulas através de estruturas salivares especializadas encontradas no lábio superior (MELGAREJO, 2009).

Na constituição da fauna brasileira, as serpentes estão representadas atualmente por 405 espécies classificadas em 10 famílias distintas (COSTA; BÉRNILS, 2018). Porém, as serpentes peçonhentas de importância médica e clínica no Brasil podem ser encontradas nas famílias Elapidae e Viperidae.

A família Elapidae é constituída por serpentes que possuem dentição do tipo proteróglifa (dentes inoculadores, imóveis curtos localizados na parte anterior da boca) e com ausência de fosseta loreal, que é um órgão termorreceptor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Essa família é representada majoritariamente pelo gênero *Micrurus* e conhecida popularmente como grupo das cobras corais-verdadeiras (MELGAREJO, 2009). Além disso, esse gênero é constituído por 30 espécies distribuídas pelo território brasileiro (COSTA; BÉRNILS, 2018). Sobre a peçonha, pode ser destacado que a composição do extrato sólido bruto dela contém cerca de 70% a 90% de fração proteica e de polipeptídeos com alto peso molecular, e os 10 – 30% restantes é constituído de moléculas de baixo peso molecular, como aminoácidos, carboidratos, amins, peptídeos pequenos, íons e compostos inorgânicos (SILVA JÚNIOR; BUCARETCHI, 2009). Dessa forma, os constituintes da peçonha podem provocar ação neurotóxica, miotóxica, hemorrágica e cardiovascular (BRAZIL, 1987; SILVA JÚNIOR; BUCARETCHI, 2009).

Por outro lado, a família Viperidae possui dentes bem desenvolvidos (dentição solenóglifa) e fosseta loreal localizada na região entre o olho e a narina (MELGAREJO, 2009; UNDERWOOD, 1967). Essa família pode ser subdividida em 3 subfamílias: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae (PYRON et al., 2011). Atualmente, no Brasil, a subfamília Crotalinae é representada por três gêneros: *Bothrops* (26 espécies), *Crotalus* (1 espécie) e *Lachesis* (1 espécie) (COSTA; BÉRNILS, 2018). De maneira

geral a composição da peçonha de serpentes da família Viperidae da qual a subfamília Crotalina está inserida, pode ser constituída de mais de 100 proteínas (SERRANO et al., 2005) em conjunto de outras moléculas como: carboidratos, lipídeos, peptídeos e outras moléculas pequenas (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; DOLEY; KINI, 2009; FOX; SERRANO, 2005; GUTIÉRREZ et al., 2010; TANJONI et al., 2005). Conseqüentemente, a ação conjunta das toxinas dessa família pode provocar efeitos sistêmicos hemotóxicos, citotóxicos, neurotóxicos e cardiotoxicos (JIN; VARNER, 2004; WHITE, 2005).

Os dados epidemiológicos sobre acidentes ofídicos no Brasil mostram que os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* em conjunto já chegaram representar 99% dos casos notificados (ARAÚJO; SANTALÚCIA; CABRAL, 2009; BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Esse acontecimento foi possível por conta da ampla distribuição geográfica das serpentes desses gêneros pelo país, o sistema de inoculação superiormente desenvolvido e pela produção de peçonha com elevada toxicidade (MELGAREJO, 2009; WARRELL, 2004).

Além disso, os dados epidemiológicos mais recentes (considerando o intervalo dos anos 2015-2019), sobre número de notificações de acidentes segundo o tipo de serpente e fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (Tabela 1) mostram que o gênero *Bothrops* apresentou o maior número de notificações de acidentes, totalizando 99.552 casos durante esses cinco anos. O gênero *Crotalus*, no entanto, registrou um total de 11.825 acidentes e, portanto, é considerado como o segundo maior gênero de serpentes peçonhentas responsáveis por esse tipo de acidente no Brasil. Já os gêneros *Lachesis* e *Micrurus* tiveram um total de casos notificados de 2.882 e 1.327, respectivamente, acumulados durante esse período (Tabela 1). Também é importante destacar que ambos os gêneros *Bothrops* e principalmente *Crotalus* tiveram um aumento no número de notificações desde 2015 a 2019 (SINAN, 2020).

Tabela 1 - Número de notificações de acidentes segundo o tipo de serpente do Brasil

Tipo Serpente	2015	2016	2017	2018	2019	Total
<i>Bothrops</i>	19.560	18.802	20.297	19.966	20.897	99.522
<i>Crotalus</i>	1.972	2.182	2.506	2.555	2.610	11.825
<i>Lachesis</i>	716	517	478	551	620	2.882
<i>Micrurus</i>	209	244	284	264	326	1.327
Ign/Branco*	148.167	150.786	197.848	240.739	238.899	976.439
TOTAL	170.624	172.531	221.413	264.075	263.352	1.091.995

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net Período: 2015-2019. *(Ing = casos ignorados e em branco)

Na tabela é destacado o número de acidentes notificados dos principais gêneros de serpentes brasileiras. Em muitos casos, o gênero da serpente não pôde ser identificado no ato da notificação conforme mostrado em (Ign/Branco).

Por sua vez, além da notificação geral de acidentes ocasionados por serpentes peçonhentas brasileiras, é possível destacar na tabela 2 o número de notificações de óbitos de indivíduos que tiveram complicações no quadro clínico após o contato com esses animais. No intervalo entre 2015 a 2019, o gênero *Bothrops* teve 363 casos de óbitos registrados, sendo o maior responsável pelo número de mortes seguido do gênero *Crotalus*, em que foram registradas 107 notificações de óbitos. Os demais gêneros *Lachesis* e *Micrurus* tiveram um total de óbitos notificados de 29 e 2, respectivamente, durante esse mesmo período (SINAN, 2020).

Tabela 2 - Número de óbitos notificados após o agravamento do acidente por serpentes peçonhentas brasileiras

Tipo Serpente	2015	2016	2017	2018	2019	Total
<i>Bothrops</i>	58	75	65	70	95	363
<i>Crotalus</i>	22	16	18	22	29	107
<i>Lachesis</i>	8	4	6	7	4	29
<i>Micrurus</i>	-	1	-	-	1	2
Ign/Branco*	157	187	173	175	307	999
TOTAL	245	283	262	274	436	1500

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

Período: 2015-2019. *(Ign = casos ignorados e em branco)

Na tabela é destacado o número de óbitos notificados após o agravamento do acidente provocado pelos principais gêneros de serpentes brasileiras. Em muitos casos o gênero da serpente não pôde ser identificado no ato da notificação conforme mostrado em (Ign/Branco).

Apesar das informações epidemiológicas apresentadas pela Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde e representadas nas tabelas 1 e 2, deve-se ressaltar que dentre os dados relacionados ao campo ignorados/branco foram registrados 976.439 casos de acidentes onde não se conhecia o gênero e o tipo de serpente que provocou o acidente durante os cinco anos considerados na análise. Ocorreu um caso semelhante nos dados mostrados na tabela 2, em que houve 999 notificações de óbitos sem se ter o conhecimento do gênero da serpente que possa ter agravado o caso (SINAN, 2020). Portanto, essas informações reforçam a classificação dos acidentes provocados por ofídios pela OMS como uma DTN, pois muitas das informações acabam sendo ignoradas e poderiam ajudar a combater essa moléstia (WHO, 2019). Diante disso, é de suma importância o acidentado e a equipe de saúde tentarem identificar a serpente causadora do acidente. Isso possibilitaria a dispensa imediata dos pacientes mordidos por serpentes não peçonhentas, ou permitiria a aplicação específica de um soro antipeçonha em casos de acidentes envolvendo as serpentes peçonhentas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

É importante salientar que o quadro do envenenamento provocado pela mordida de serpentes peçonhentas pode variar de um indivíduo para outro, devido às diferenças na quantidade e composição da peçonha inoculada que variam de acordo com o tamanho da serpente, a região onde ela habita, a dieta, idade e o gênero. Essas diferenças na composição da peçonha têm sido amplamente estudadas e descritas, mostrando que mudanças ambientais e comportamentais podem alterar os mecanismos de regulação da síntese proteica que compõe a peçonha desses animais (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; FERREIRA et al., 1992; FILHO, 1997; LOURENÇO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019; WILLEMSE, 1978). Um exemplo disso é a peçonha da serpente *Crotalus durissus*, que será abordada mais especificamente neste trabalho.

1.2 A espécie *Crotalus durissus*

As *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) são serpentes terrícolas de hábitos frequentemente noturnos, mas podem ser também encontradas durante o dia. A dieta

dessa espécie pode incluir mamíferos e até mesmo aves (VANZOLINI; RAMOS-COSTA; VITT, 1980). Habita predominantemente vegetações do cerrado e caatinga, porém, estas serpentes conseguem se adaptar a áreas que foram antropizadas. A característica principal dessas serpentes é a presença de um “guizo” no fim de sua cauda que é uma estrutura composta de quitinina, que se especula ser utilizado para “avisar” quando ela se sente ameaçada (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Além disso, essa é a única espécie do gênero *Crotalus* representada no Brasil, sendo ainda subdividida em sete subespécies distribuídas pelo território brasileiro: *C. d. dryinas* (Amapá), *C. d. terrificus* (região sul - oriental e meridional, áreas secas e altas), *C. d. cascavella* (região nordeste - caatinga), *C. d. trigonicus* (Roraima), *C. d. ruruima* (região norte), *C. d. marajoensis* (Ilha de Marajó) e *C. d. collilineatus* (região centro-oeste, norte de Minas Gerais e São Paulo) (CAMPBELL; LAMAR, 1989; UETZ, et al. 2020; PINHO; PEREIRA, 2001; WARRELL, 2004)

A peçonha das serpentes do gênero *Crotalus* é composta por cinco componentes de maior presença, que são a crotoxina, crotamina (GONÇALVES, 1956), giroxina (BARRABIN et al., 1978; BARRIO, 1961), crotapotina (FORTES-DIAS et al., 1994) e convulxina (PRADO-FRANCESCHI; BRAZIL, 1981).

A crotoxina é classificada como uma neurotoxina e compõe cerca de 65% do peso seco da peçonha, sendo ela a principal molécula presente na peçonha das serpentes do gênero *Crotalus*. A crotoxina foi uma das primeiras proteínas isoladas e cristalizadas da peçonha (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938). Além disso, a composição dos possíveis aminoácidos constituintes dessa toxina foi determinada apresentando uma massa molecular de cerca de 30.000 Da (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938). A atividade da crotoxina é composta pela ação de duas subunidades: fosfolipase A2 (PLA2) subunidade básica que possui atividade inibitória na liberação de neurotransmissores na junção neuromuscular e efeito miotóxico; e crotapotina (Ctp) que é a subunidade ácida da crotoxina, funcionando como uma chaperona para potencializar a ação da PLA2 (FERNANDES et al., 2017; FORTES-DIAS et al., 1994). Por se tratar de uma neurotoxina pré-sináptica, ela provoca paralisias motoras e respiratórias nas vítimas por conta da inibição de transmissão do neurotransmissor acetilcolina entre as terminações nervosas motoras (LOMEO et al., 2014; WOLZ-RICHTER; ESSER; HESS, 2013). Como se não bastasse, o principal efeito neurotóxico (BRAZIL, 1966) da crotoxina pode estar envolvida nos quadros de

nefrotoxicidade (HADLER; BRAZIL, 1966), miotoxicidade (BREITHAUPT, 1976) e cardiotoxicidade (FERNANDES et al., 2017; FORTES-DIAS et al., 1994).

A crotamina foi isolada pela primeira vez em 1956 (GONÇALVES, 1956). Em 1980 sua estrutura molecular foi determinada e a sequência de nucleotídeos elucidada (RÁDIS-BAPTISTA et al., 1999). Sua principal atividade está diretamente relacionada aos efeitos de miotoxicidade (BIEBER; NEDELKOV, 1997) que juntamente com a crotoxina são capazes de produzir lesões aos tecidos musculares esqueléticos de forma sistêmica (BIEBER; NEDELKOV, 1997; OGUIURA; BONI-MITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005). Outros estudos apontam que a crotamina pode ser utilizada como marcador de células vivas, visto que ela tem a capacidade de penetrar a membrana plasmática (KERKIS et al., 2004).

A giroxina foi inicialmente descrita no começo da década de 1960 (BARRIO, 1961) e somente mais tarde, em 1978, ela foi isolada (BARRABIN et al., 1978). Em experimento com camundongos foi constatado que, quando a toxina foi injetada, ela pode provocar grave perda de equilíbrio e o animal fica girando constantemente sobre o próprio eixo, daí a origem do nome dessa toxina. Além disso, essa toxina ainda é capaz de ocasionar fortes contrações constantes e involuntárias nos músculos (KOZAKO et al., 2002).

A convulxina foi isolada pela primeira vez em 1981 por Prado-Franceschi. Nesse estudo foi relatado que essa toxina possui os mesmos efeitos provocados pela giroxina quando ela foi utilizada em testes com camundongos. Além disso, a aplicação da convulxina via intravenosa em cachorros anestesiados provocou um aumento na intensidade da respiração seguida de apneia, forte queda na pressão e, por fim, intensa hipertensão transiente (PRADO-FRANCESCHI; VITAL BRAZIL, 1981).

Em suma, a peçonha das serpentes da espécie *Crotalus durissus* é capaz de produzir efeitos neurotóxicos (BRAZIL, 1966; LOMEIO et al., 2014), miotóxicos (BIEBER; NEDELKOV, 1997; OGUIURA; BONI-MITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005), cardiotoxicos (PAOLA; ROSSI, 1993; SANTOS et al., 1990), de ação coagulante e hemolítica e nefrotóxica (HADLER; BRAZIL, 1966; TOKARNIA et al., 2014). A peçonha pode também ter ação coagulante por conta da presença de uma trombina semelhante à endógena, sendo capaz de prolongar o tempo de coagulação e, em muitos casos, tornar o sangue incoagulável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; THOMAZINI; BARRAVIERA, 1994; TOKARNIA et al., 2014).

Quando a atividade miotóxica responsável pela peçonha é intensa, ela pode causar dolorosas lesões sistêmicas nas fibras musculares que podem, por consequência, liberar as enzimas Creatinoquinase (CK), desidrogenase láctica (DHL), aspartase aminotransferase (AST) e aldolase. Além disso, mioglobinas são liberadas para a corrente sanguínea que acabam sendo excretadas na urina, alterando a coloração dela para marrom avermelhado (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003; AZEVEDO MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, 2009).

Mais especificamente, tem-se descrito que a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (Figura 1) pode provocar extravasamento do conteúdo das células musculares alterando principalmente os níveis séricos de enzimas (CK, DHL, AST e aldolase) e mioglobinas, causando lesões musculares associadas a um quadro clínico de rabdomiólise e insuficiência renal aguda por conta da sobrecarga desses componentes no sistema urinário. Tais efeitos foram confirmados por autores que trataram pacientes adultos e crianças que foram atendidos em hospitais localizados na região sudeste do Brasil (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1988; JORGE et al., 1986; MAGALHÃES et al., 1986).

Figura 1 - Serpente *Crotalus durissus terrificus*



Fonte: Pedro H. Martin/Contagem - Minas Gerais, Brasil. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/phm22/6801797795>> Acesso em: 17 fev. 2020. Conhecida como cascavel. Pode ser encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil. É reconhecida por apresentar um guizo localizado na extremidade da cauda. O corpo dela possui fundo castanho-

claro e uma fileira de manchas dorsais em formato de losango de cores marrons e marginadas de branco ou amarelo.

Diversos trabalhos abordam o efeito do envenenamento provocado por serpentes no aspecto clínico e possíveis efeitos de toxicidade no coração, por conta da ação da peçonha de *C. d. terrificus*.

Um dos primeiros estudos clínicos envolvendo pacientes relacionados a um possível efeito da peçonha de *C. d. terrificus* no coração foi relatado por Cupo et al. (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1990), em que analisaram as dosagens das enzimas creatinoquinase (CK) total e creatinoquinase fração MB (CK-MB), desidrogenase láctica (DHL) e a isoforma DHL 1. Os autores verificaram que os níveis plasmáticos dessas enzimas foram semelhantes a um quadro clínico de infarto agudo do miocárdio (IAM), porém os exames de eletrocardiograma e ecocardiograma não mostraram qualquer tipo de anormalidade. Eles também descreveram que a possível mudança bioquímica no aumento dessas enzimas no soro seria por conta da preferência das toxinas presentes na peçonha de *C. d. terrificus* por fibras da musculatura esquelética do tipo I, cuja composição similar é encontrada em fibras do miocárdio. No entanto, como nenhuma biópsia do músculo cardíaco foi feita, não se pode excluir com certeza absoluta um envolvimento "silencioso" do miocárdio, mesmo havendo ausência de sinais clínicos e da presença de ECG e ecocardiografia normais, conforme as conclusões dadas pelos autores do estudo (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1990).

Em um relato de caso feito por Siqueira et al. (1990) foram encontradas lesões miocárdicas extensas e graves em um paciente que morreu devido a complicação do quadro clínico após um acidente provocado pela mordida da serpente *C. d. terrificus*. Essas lesões foram documentadas com evidências clínicas, eletrocardiográficas, enzimáticas e histológicas. As principais características patológicas foram representadas por vacúolos sarcoplasmáticos, miofibrilas densamente aglomeradas e massa acidofílica amorfa nas fibras cardíacas. Essas lesões foram idênticas às que já foram descritas no músculo esquelético após a mordida por essa serpente. Esse parece ser o primeiro relato de caso que mostra indiscutível lesão miocárdica por mordida de serpente peçonhenta com documentação anatomopatológica (SIQUEIRA et al., 1990).

Santos et al. (1990) apontaram em seus estudos para uma ação cardiopática provocada pela peçonha da *C. d. terrificus*, descrevendo mudanças no coração no

que diz respeito à diminuição notável da força contrátil, aumento da atividade de creatinoquinase nas fases finais do experimento e arritmias incomuns após o coração isolado de cobaias sofrerem infusão contendo crotoxina da peçonha dessa serpente. Além disso, uma injeção em bolus da crotoxina (11 ± 2 nmoles) também foi capaz de induzir uma diminuição na força contrátil sem redução da frequência cardíaca (SANTOS et al., 1990).

Em Paola e Rossi (1993) foi descrita a morfologia por microscopia óptica e eletrônica do miocárdio de rato em diferentes intervalos de tempo após a administração da peçonha de *C. d. terrificus* por via intraperitoneal. Os autores observaram que o tratamento com a peçonha crotálica produziu pequenos focos de necrose miocárdica espalhados pela base dos ventrículos, predominantemente perivasculares que estavam associadas ao edema intersticial leve a moderado, bem como infiltração de células mononucleares e de mastócitos. Além disso, eles observaram que as primeiras alterações apareceram 24 horas após o tratamento e atingiram a gravidade máxima após 4 dias. Os principais pontos a respeito desses achados são sua localização preferencial na base do coração e a associação dos focos de necrose miocitolítica com grande número de mastócitos (PAOLA; ROSSI, 1993). Esses estudos corroboram com o fato de que a peçonha de *C. d. terrificus* pode provocar alterações na fisiologia do coração desencadeando possíveis quadros clínicos de cardiotoxicidade provenientes do envenenamento por conta das toxinas presentes na peçonha.

1.3 Coração

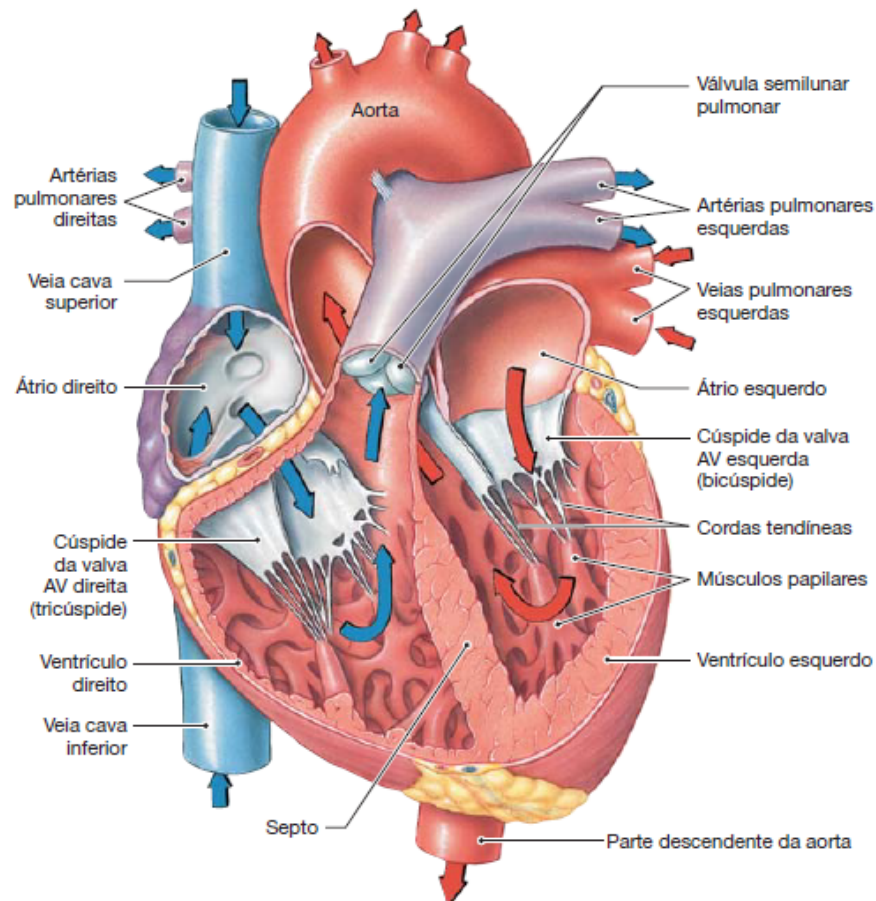
Neste contexto, o coração acaba sendo um órgão de extrema importância de estudo, pois é responsável por bombear sangue para todo o corpo através do sistema circulatório. Anatomicamente, a parede desse órgão é composta por três camadas cardíacas: o endocárdio (camada mais interna), o miocárdio (uma camada intermediária) e o epicárdio (camada mais externa). Além disso, é constituído de quatro câmaras, sendo duas câmaras superiores denominadas átrios (direito e esquerdo) e duas inferiores chamadas de ventrículos (direito e esquerdo) (APPLE; GOETZE; JAFFE, 2016; SILVERTHORN, 2017).

O coração humano (Figura 2) é constituído por quatro principais tipos de células. O primeiro tipo é denominado como fibroblasto cardíaco mesenquimal,

responsável por produzir componentes da matriz celular do coração e representando mais da metade de todas as células cardíacas (BERGMANN et al., 2015).

O segundo grupo de células cardíacas são os cardiomiócitos, que podem ser subdivididos em células marcapasso e cardiomiócitos ventriculares e atriais produtores de força que juntamente com o terceiro tipo celular (células endoteliais), desempenham papéis centrais tanto na remodelação quanto na regeneração cardíaca (TALMAN; KIVELÄ, 2018). E por último células do músculo liso, que são responsáveis por suportar o sistema vascular, válvulas cardíacas e vasos sanguíneos (DOLL et al., 2017; PINTO et al., 2016).

Figura 2 - Anatomia do coração humano



Fonte: SILVERTHORN, Dee Unglaub. Fisiologia cardiovascular. In: Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 7. ed. São Paulo: Artmed LTDA., 2017. p. 445

O coração é o principal órgão do sistema cardiovascular, composto pelo miocárdio. Além disso, pode ser dividido em quatro câmaras: átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo. Trabalhando juntamente com os vasos sanguíneos, as câmaras cardíacas formam uma única cavidade, fazendo com que o sangue circule continuamente pelo corpo.

Também, é descrito que esse órgão pode bater mais de dois bilhões de vezes em uma vida média, diariamente ele pode bater 100.000, bombeando cerca de 2000 galões de sangue. Para que o coração consiga realizar essa função, ele precisa ter um sistema de contração bastante controlado através das interações entre forças mecânicas, sinais elétricos e atividades moleculares (DOLL et al., 2017).

O coração e demais componentes do sistema circulatório podem ser acometidos de doenças, e acabaram se tornando os principais causadores de óbitos na população brasileira (MANSUR; FAVARATO, 2012). Dessa forma, a análise e estudo do coração a nível molecular é uma estratégia muito importante para investigar as doenças cardíacas, que mesmo com os grandes avanços acabam ainda sendo a principal causa de morte nos países desenvolvidos e aumentando rapidamente nos países emergentes (CELERMAJER et al., 2012).

Além disso, as doenças cardíacas podem ser provenientes de quadros de toxicidade no coração (cardiotoxicidade) por conta da ação de produtos químicos com ação cardiotoxica tais como álcoois alifáticos, aldeídos, glicóis, alcanos halogenados, metais pesados e biotoxinas, bem como agentes cardiovasculares e quimioterápicos. Sabe-se também que a cardiotoxicidade é altamente dependente da dose, magnitude da via e frequência e duração da exposição. Os produtos farmacêuticos com ação cardiotoxica incluem agentes antineoplásicos, anestésicos, psicotrópicos e antibióticos. De maneira geral os efeitos cardiotoxicos desses medicamentos podem ser observados apenas quando a dose excede a faixa terapêutica (BHARADWAJ, 2009).

Na natureza, as cardiotoxinas podem ser encontradas em peçonhas de serpentes da família Elapidae (WOLLBERG et al., 1988) que são consideradas como constituinte mais básico e abundante da peçonha dessa família de serpentes (chegando a 25% a 55% do peso seco) e que podem induzir automaticidade cardíaca, aumento da contração miocárdica e fibrilação ventricular ou parada sistólica em altas concentrações (LEE, 1972).

Visando desvendar biomarcadores de origem natural, tais como em peçonhas de serpentes que podem ter aplicações no diagnóstico, prognóstico, monitoramento terapêutico e estratificação de risco de lesão aguda, infarto agudo do miocárdio (IAM), doença crônica (insuficiência cardíaca) e cardiomiopatias, diferentes tecnologias como a espectrometria de massas podem ser utilizadas para descrever o comportamento proteômico nessas doenças e condições. Assim, é exequível

identificar possíveis efeitos cardiotoxícos desses componentes naturais que podem ter potencial farmacológico (LYNCH et al., 2016; STANLEY et al., 2004).

1.4 Análise proteômica baseada em espectrometria de massas

O termo proteômica está relacionado ao estudo do conjunto de proteínas que estão sendo expressas à nível celular ou tecidual e que são responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos (BARBOSA et al., 2012; EMIDIO et al., 2015). Assim, analisar o proteoma está relacionada ao estudo das proteínas e do comportamento delas a nível celular ou tecidual, permitindo verificar quais proteínas estão sendo expressas em uma determinada situação, comparar mudanças na resposta em um ambiente normal ou alterado, quantificá-las e analisar modificações pós-traducionais (EMIDIO et al., 2015; VALLEDOR; JORRÍN, 2011).

Além disso, técnicas analíticas como eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas e bioinformática são utilizadas na análise proteômica (BARBOSA et al., 2012; EMIDIO et al., 2015; HEIN et al., 2013; IMAI; KOSHIYAMA; NAKATA, 2011). As metodologias empregadas na análise proteômica baseada em espectrometria de massas incluem os métodos conhecidos como *bottom-up* ou *shotgun* e *top-down* (ZHANG et al., 2013). A metodologia proteômica *bottom-up* ou *shotgun* inclui etapas de digestão prévia das proteínas por uma enzima, geralmente tripsina, seguidas de separação por cromatografia líquida (LC) e depois analisadas por espectrometria de massas (MS) (AHRENS et al., 2010; BARBOSA et al., 2012). Por outro lado, a metodologia *top-down* é um processo no qual as proteínas não sofrem nenhum processo de digestão prévia e são submetidas intactas à análise por MS (ARMIROTTI; DAMONTE, 2010; BARBOSA et al., 2012).

Quando é utilizado um sistema cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas (LC-MS/MS), o cromatógrafo reduz a complexidade das amostras, bem como facilita a separação de proteínas e peptídeos, visto que no princípio da cromatografia líquida, o analito é dissolvido em uma fase líquida sem interagir quimicamente com ela, e percola em uma fase estacionária (normalmente polímeros C18) geralmente empacotada em uma coluna (MAY et al., 2011). Após a purificação ou fracionamento por cromatografia, os analitos isolados podem ser identificados utilizando espectrômetro de massas (CHEN, 2008).

O princípio de identificação utilizado na espectrometria de massas consiste basicamente em ionizar um composto e avaliar a razão massa/carga (m/z) dos íons gerados. O espectrômetro de massas geralmente é equipado por uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas e um detector. A fonte de ionização é utilizada para gerar íons peptídicos ou protéicos, geralmente pela transferência de prótons (H^+) para as moléculas sem modificar a estrutura química delas. Quando os íons são acelerados em um campo elétrico, eles são separados por m/z no analisador de massas, ou então podem ser selecionados de acordo com a m/z e fragmentados e analisados em MS2 ou MS/MS. Por fim, os íons são detectados no detector e as informações são analisadas (deconvoluídas) em um computador por programas específicos (MAY et al., 2011).

As duas técnicas de ionização principais utilizadas na análise proteômica são o MALDI (do inglês Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization ou ionização e dessorção a laser assistida por matriz) em que se emprega amostras em estado sólido, e ESI (do inglês Electrospray Ionization ou ionização por spray de elétrons) cujas amostras no estado líquido são aplicadas (BARBOSA et al., 2012; EMIDIO et al., 2015). No método MALDI, quando a amostra é “bombardeada” pelo laser, a matriz (um reagente químico que absorve a energia do laser e doa um próton como, por exemplo, ácido sinapínico, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e ácido 2,5 dihidroxibenzóico) sublima e os íons transferem a carga para os analitos, formando íons peptídicos (ZALUZEC; GAGE; WATSON, 1995). No ESI, uma solução aquosa com o analito atravessa uma agulha capilar submetida à alta voltagem. Logo, a solução é ejetada como um aerossol de gotas altamente carregadas que, após evaporação do solvente por um fluxo de gás inerte aquecido, gera formas ionizadas do analito (NGUYEN; FENN, 2007).

A respeito dos tipos mais comuns de analisadores podem ser citados os TOF (do inglês *Time Of Flight* ou medição por tempo de voo), o quadrupolo e o *ion trap* (MAY et al., 2011). Nos analisadores do tipo TOF, os íons resultantes da primeira fase sofrem aceleração por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional à sua massa. A fim de melhorar o desempenho, os analisadores TOF podem ser combinados com analisadores do tipo quadrupolos (Qs), que consistem em um conjunto de quatro eletrodos em bastão e acabam sendo filtros de massas. Além disso, esses eletrodos asseguram um campo elétrico que somente íons de uma razão m/z específica acabam seguindo ao detector

enquanto os demais são desviados (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001).

Os analisadores do tipo *ion trap* (IT) ou “armadilha de íons” são capazes de filtrar e aprisionar os íons de interesse em um campo elétrico tridimensional que são gradualmente liberados em ordem crescente de m/z (WANG; FRANZEN; WANCZEK, 1993). O *orbitrap* é um tipo de analisador IT cujo íons oscilam (orbitam) ao redor e ao longo de um eletrodo na forma de espiral. A frequência dessa oscilação é proporcional à raiz quadrada da razão massa/carga (HU et al., 2005; WALTHER; MANN, 2010). Essa tecnologia migrou para sistemas híbridos de dois espectrômetros de massas independentes que reúnem, por exemplo, um *ion trap* e um *orbitrap* ou um *ion trap* e um FT-ICR. Os FT-ICRs (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) são *ion traps* que possuem um campo magnético adicional, que tem por finalidade forçar os íons a exibirem um movimento circular com ciclos de alta frequência. O analisador consegue então determinar a razão m/z através da frequência do movimento ciclotrônico pela transformação de Fourier (MAY et al., 2011).

Quando um espectro é formado pela fragmentação de um precursor, existe a possibilidade de reconstrução do peptídeo fragmentado (sequenciamento de novo) utilizando de algoritmos diversos (EMIDIO et al., 2015; HEIN et al., 2013). Os softwares utilizados para identificar as proteínas e peptídeos oriundos dos espectros obtidos nos espectrômetros de massas realizam comparações entre o conjunto de dados obtidos da massa dos peptídeos e com os espectros adquiridos da fragmentação teórica de proteínas presentes em bancos de dados (EMIDIO et al., 2015; ZHANG et al., 2013).

Além do mais, o desenvolvimento de equipamentos com maiores níveis de sensibilidade possibilita analisar, identificar e quantificar proteomas complexos. Dessa forma, esses aparelhos acabaram permitindo que milhares de proteínas e fragmentos delas possam ser caracterizadas em uma mesma análise fazendo com que a análise proteômica baseada em espectrometria de massas avançasse muito nos últimos anos. Por exemplo, no trabalho realizado por Figueiredo et al. (2021), os autores identificaram que os fragmentos da glicoproteína topossomo presente nas gônadas masculinas e femininas de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* podem ser uma fonte de moléculas antimicrobianas, porém, para a realização desse estudo foi necessário o envolvimento da espectrometria de massas em conjunto de ensaios de purificação por HPLC e teste de atividade antimicrobiana (FIGUEIREDO et al., 2021).

Nesse contexto, a análise proteômica tem sido empregada para estudar a composição de venenos e ou peçonhas de organismos vivos (FOX; SERRANO, 2008). O estudo da composição de toxinas presentes em animais também pode ser chamado de venômica e tem sido bastante aplicada para descrever a peçonha de serpentes pertencentes a família Viperidae (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007).

1.5 Estudos proteômicos voltados à toxinologia

Na área da toxinologia, a tecnologia utilizada pela LC-MS/MS tem sido atrelada a caracterização proteica de peçonhas de diferentes espécies de serpentes visando objetivos distintos, como para estudos fenotípicos e variações interespecies (FOX; SERRANO, 2008). Gonçalves-Machado et al. (2016) realizaram análises combinadas da transcriptômica da glândula e da proteômica da peçonha de duas populações isoladas de *B. jararaca* distribuídas em regiões extremas da distribuição da espécie, nas regiões sudeste e sul da Mata Atlântica brasileira, para verificar semelhanças ou mudanças na composição de suas toxinas. Os autores também ressaltaram a importância de se estudar a composição das toxinas desses animais, pois caso houvesse mudanças muito significativas nas peçonhas, isso consequentemente mudaria toda a dinâmica na produção de soro antipeçonha cuja finalidade é neutralizar os componentes da peçonha dessas serpentes em uma pessoa acidentada (GONÇALVES-MACHADO et al., 2016).

Em outro estudo envolvendo a peçonha de *B. jararaca* de autoria de Nicolau et al. (2017), as toxinas de *B. jararaca* foram fracionadas por OFFGEL seguido de cromatografia, gerando as frações peptídica e proteica que foi submetida à digestão com tripsina. Ambas as frações foram analisadas separadamente por nanocromatografia de fase reversa acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. Os resultados dessa estratégia permitiram a caracterização mais profunda e conjunta do peptidoma e do proteoma (proteo-peptidoma) dessa peçonha. Foram identificadas 46 classes de proteínas (com várias proteínas designadas exclusivamente por classe) compreendendo oito classes de alta abundância componentes da peçonha e 38 classes adicionais em quantidades menores. Essa última categoria incluiu proteínas da peçonha de *B. jararaca* previamente descritas, constituintes comuns da peçonha de Elapidae (fator de peçonha de serpente e toxina de três dedos) e proteínas tipicamente encontradas em lisossomas, membranas celulares e plasma sanguíneo. Além disso, conter uma população de criptídeos, cujas

atividades biológicas poderiam levar ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (NICOLAU et al., 2017).

Reeks et al. (2016) investigaram por análises transcriptômicas e proteômicas componentes presentes na peçonha das glândulas especializadas das serpentes marrons ocidentais da Austrália, *Pseudonaja aspidorhyncha* e *Pseudonaja nuchalis*, e compararam os resultados com os dados existentes de *Pseudonaja textilis*. Os autores identificaram 5716 transcritos de 20 famílias de toxinas diferentes com variação interespecífica entre as espécies observadas em oito das famílias menos abundantes. A integração de cada proteoma das peçonhas e as leituras anotadas correspondentes permitiu a identificação de 65 isoformas de seis famílias de toxinas. Ademais, a cobertura de alta sequência destacou diferenças sutis entre as sequências e a variação intra e interespecífica entre as espécies estudadas por eles. Além disso, os dados de MS/MS de alta qualidade identificaram glicofomas incomuns com peptídeos natriuréticos nas espécies de *P. aspidorhyncha* e *P. nuchalis*, contendo trissacarídeos ligados em O (oxigênio) com alta homologia com a região glicosilada de TNPc. Os autores concluíram que os avanços tecnológicos na análise de transcriptoma usando plataformas de sequenciamento de próxima geração e análise de proteoma por espectrometria de massas altamente sensível em tandem permitiram uma análise mais abrangente de três peçonhas de serpente marrom (*Pseudonaja*) pouco investigados, revelando muitas novas sequências de peptídeos que são exclusivas dessas espécies intimamente relacionadas com destaque a algumas diferenças sutis entre suas toxinas (REEKS et al., 2016).

Oliveira et al. (2019) realizaram análises proteômicas e funcionais da peçonha de 22 serpentes da subespécie *C. d. Collineatus* e verificaram a ocorrência de variações qualitativas e quantitativas entre as toxinas das serpentes. Além disso, as peçonhas avaliadas causaram envenenamentos com diferentes alterações nos parâmetros bioquímicos e imunológicos estudados. A partir desses dados, os autores confirmaram a necessidade de utilizar um *pool* de peçonhas com a maior variabilidade possível na preparação da anti-peçonha, a fim de melhorar a sua eficácia. Esse estudo também foi capaz de identificar pela primeira vez 8 proteínas diferentes na peçonha desta subespécie, aumentando o conhecimento sobre sua composição e mostrando que se trata de uma fonte de proteínas com possíveis aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA et al., 2019).

Portanto, como podemos observar na literatura, várias pesquisas utilizam as análises proteômicas, transcriptômicas, imunológicas e bioquímicas para estudar a composição e efeito das toxinas presentes nesses tipos de serpentes e realizando comparações entre o perfil dessas moléculas em cada subespécie, com o intuito de melhorar a produção de soros antiofídicos e também identificar possíveis moléculas com potenciais terapêuticas (FOX; SERRANO, 2007), como foi o caso do medicamento Captopril, cujo componente ativo foi derivado da peçonha de *B. jararaca* e que é utilizado no combate à hipertensão e insuficiência cardíaca (CAMARGO et al., 2012).

No entanto, poucos trabalhos descrevem o efeito proteômico da peçonha bruta a nível molecular sobre algum tecido específico ou células. Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou dois trabalhos sobre essa temática. O primeiro trabalho abordou o efeito da peçonha de *C. d. terrificus* no proteoma do cerebelo de camundongos, em que foi verificado que a peçonha foi capaz de modular proteínas relacionadas à inibição sináptica e dano a esse tecido (MONTONI et al., 2020). O segundo trabalho descreveu as mudanças quantitativas no proteoma das linhagens celulares de tumor de mama MCF7 e MDA-MB-231 após tratamento com doses subtóxicas da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, em que mostrou expressão diferencial de várias proteínas relacionadas ao metabolismo das células cancerosas, resposta imune e inflamação (KISAKI et al., 2021).

Dessa forma, acreditamos que é oportuna a realização de um estudo da caracterização molecular por espectrometria de massas visando mapear a variação proteômica cardíaca de camundongos nos intervalos de tempo 1 h, 6 h, 12 h e 24 h após tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus* e dessa forma comparar com o proteoma de coração de camundongos controle (tratados com salina), de modo a verificar os possíveis efeitos da peçonha sobre este tecido.

Além disso, a escolha dos horários a serem utilizados nesse estudo foram baseados nos experimentos realizados anteriormente por Montoni et al. (2020). Esses intervalos de tempo foram bastante destacados no estudo epidemiológico feito por Jorge e Ribeiro (1992), que descreve os aspectos clínicos do envenenamento provocado por serpentes da espécie *Crotalus durissus* e destacando o tempo que foi gasto pelas vítimas até a chegada ao hospital à procura de atendimento médico após terem sido mordidos por esses animais (JORGE; RIBEIRO, 1992).

Este presente trabalho identificou mudanças no perfil proteômico do coração dos camundongos tratados com a peçonha da *C. d. terrificus*, principalmente de proteínas relacionadas com as mitocôndrias e as cardiopatias hipertrófica e dilatada. Os resultados deste projeto também contribuíram para a elaboração de um manuscrito intitulado "*Proteomic analysis reveals rattlesnake venom modulation of proteins associated with mitochondrial, hypertrophic and dilated cardiomyopathy in mouse Hearts*" que foi submetido para publicação na revista *Journal of Proteomics* (SANTOS et al., no prelo) e que pode ser encontrado no apêndice deste documento.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar e caracterizar o perfil proteômico do efeito da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* no coração de camundongos da linhagem Swiss, visando ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de ação e alvos moleculares dos componentes da peçonha.

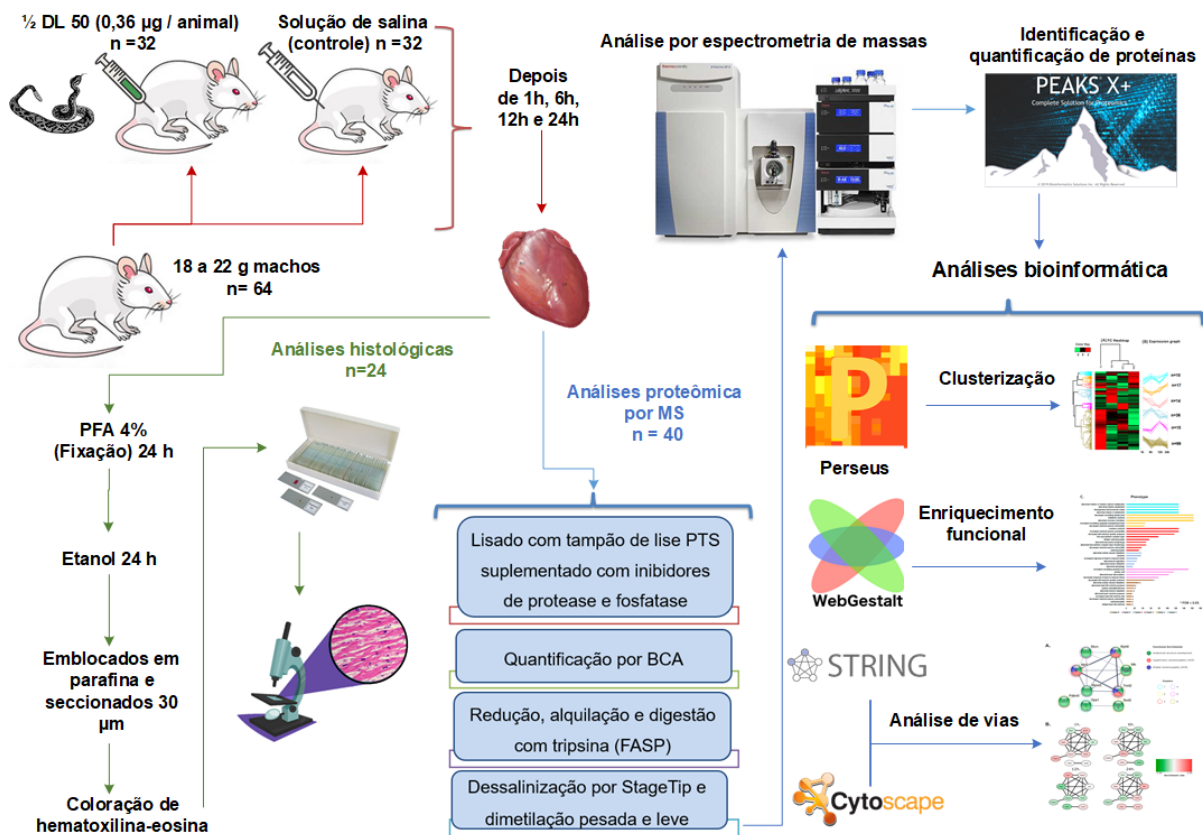
2.2 Específicos

- Analisar o perfil proteômico do coração dos camundongos nos horários 1 h, 6 h, 12 h e 24 h posteriores à injeção da 0,5 DL da peçonha de *C. d. terrificus*.
- Analisar a abundância das proteínas do coração identificadas por espectrometria de massas comparando o grupo tratado com peçonha *versus* controle (salina) utilizando dimetilação leve e pesada e analisando com o software Peaks.
- Avaliar as mudanças no perfil da abundância proteica, função e categorias de ontologia gênica (GO) e interação proteína-proteína em diferentes tempos com o auxílio de diferentes ferramentas bioinformáticas: Perseus, Webgestalt, String e Cytoscape.
- Analisar os cortes histológicos das diferentes áreas do coração dos camundongos inoculados com a salina ou peçonha de *C. d. terrificus* nos diferentes tempos, correlacionando com as mudanças observadas no perfil proteômico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A visão global da metodologia e material utilizados neste trabalho encontram-se descritos na seção do apêndice dedicado ao manuscrito submetido para publicação em periódico científico (Figura 3). Mais especificamente, esse material está localizado no item **2 Experimental section** páginas 81-85.

Figura 3 - Abordagem experimental do projeto



Fonte: Próprio autor, 2021.

Fluxo do trabalho do projeto de pesquisa de forma resumida. Ao todo foram utilizados 64 camundongos machos da linhagem Swiss, sendo que 40 animais foram utilizados para as análises proteômicas e 24 camundongos para os experimentos de histologia. Foi aplicado salina (controle) ou 0,5 DL da peçonha da serpente *C. d. terrificus* no músculo gastrocnêmio dos camundongos. Após 1 h, 6 h, 12 h e 24 h do tratamento, a dissecação dos corações desses camundongos foi realizada para análise proteômica (n=40) e para análise histológica (n=24). Para as análises histológicas, esses órgãos foram embebidos em formaldeído, embebidos em parafina, e armazenados para a confecção das lâminas. Para análises por espectrometria de massas, os corações foram lisados com tampão de lise PTS suplementada com inibidores de proteases e fosfatases. Após a quantificação de proteínas, modificações químicas (redução com DTT e alquilação com IAA), digestão com tripsina e dessalinização, as amostras foram marcadas por dimetilação usando formaldeído leve e pesado para os grupos controle e tratado com peçonha, respectivamente. As amostras foram analisadas no espectrômetro QExactive HF e os dados brutos (raw files) foram processados e analisados usando os softwares PEAKS Studio X plus contra o banco de Swissprot de *Mus musculus* e analisados utilizando as ferramentas Perseus, Webgestalt, String e Cytoscape.

4 RESULTADOS

4.1 Proteínas exclusivamente identificadas no tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus*

Os corações dos camundongos foram dissecados, lisados e as proteínas totais foram quantificadas, apresentando uma quantidade média entre 5,72 e 8,18 mg (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação de proteínas extraídas dos corações tratados com salina e peçonha de *C. d. terrificus*

Condição	Réplica					Média	DP*
	1	2	3	4	5		
1 h CTRL	5,08	6,11	7,71	7,14	5,96	6,40	0,93
1 h peçonha	5,46	5,71	9,01	6,26	6,63	6,61	1,27
6 h CTRL	12,53	9,29	6,02	7,50	5,58	8,18	2,53
6 h peçonha	10,06	7,60	6,19	7,51	6,53	7,58	1,36
12 h CTRL	6,62	4,96	5,64	6,54	6,10	5,97	0,62
12 h peçonha	5,93	6,05	6,90	5,52	5,74	6,03	0,47
24 h CTRL	5,76	6,28	5,32	5,24	5,99	5,72	0,36
24 h peçonha	6,72	5,71	5,40	6,31	6,02	6,03	0,46

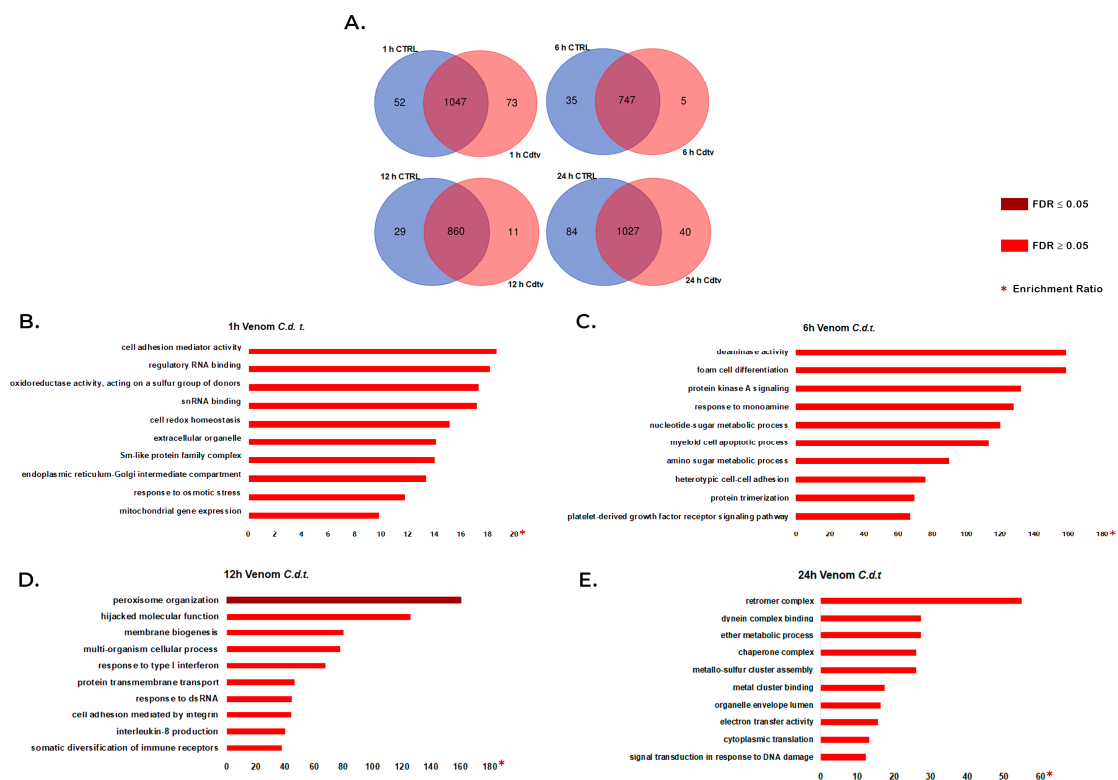
Fonte: próprio autor, disponível no manuscrito submetido para publicação em periódico científico (apêndice) como *Supplemental Table 1*.

Quantificação de proteína (mg) dos corações dos camundongos tratados com solução salina (CTRL) ou peçonha de *C. d. terrificus* por 1 h, 6 h, 12 h e 24 h. *Desvio padrão.

A análise por espectrometria de massas das amostras de coração tratadas com solução salina ou com a peçonha de *C. d. terrificus* por 1h, 6h, 12h e 24h permitiu identificar 20.146 espectros correspondentes a 9.767 peptídeos e um total 1.341 proteínas distintas (Tabela Suplementar 2). A fim de selecionar as proteínas presentes exclusivamente na condição do quadro de tratamento com a peçonha, foram comparadas as condições controle (salina) vs. tratada (com a peçonha) em cada intervalo de tempo.

Foram identificadas 1047 (1 h), 747 (6 h), 860 (12 h) e 1027 (24 h) proteínas em comum em ambos os tratamentos com solução salina e peçonha (Figura 4A e Tabela 3 suplementar). Além disso, 73 (1 h), 5 (6 h), 11 (12 h) e 40 (24 h) proteínas foram identificadas exclusivamente em corações de animais tratados com a peçonha de *C. d. terrificus* ao analisar cada tempo individualmente (Figura 4A e Tabela 3 suplementar).

Figura 4 - Identificação e comparação geral de proteínas obtidas das amostras tratadas com salina e com a peçonha



Fonte: próprio autor, disponível no manuscrito submetido para publicação em periódico científico (apêndice) como “*Supplemental Figure 1*”.

Identificação geral de proteínas. **A.** Diagrama de Venn representando a comparação das proteínas identificadas no tratamento com peçonha e salina (controle) em cada tempo de tratamento. **B-E.** Análise de enriquecimento para categorias de ontologia gênica de processo biológico, função molecular e componente celular dos tratamentos com a peçonha de 1 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.

A análise de enriquecimento funcional de proteínas diferencialmente abundantes em cada intervalo de tempo revelou que após 1 h de tratamento com a peçonha, os processos biológicos referentes a "atividade mediadora de adesão celular" e "expressão do gene mitocondrial" mostraram, respectivamente, as taxas de enriquecimento mais alta e mais baixa (Figura 4B). Após 6 horas do tratamento com a peçonha, o cenário mudou em relação à abundância diferencial de proteínas, mostrando que os processos de "atividade de desaminase" e "diferenciação de células espumosas" tiveram a maior taxa de enriquecimento e "via de sinalização do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas" apresentando a menor taxa de enriquecimento (Figura 4C).

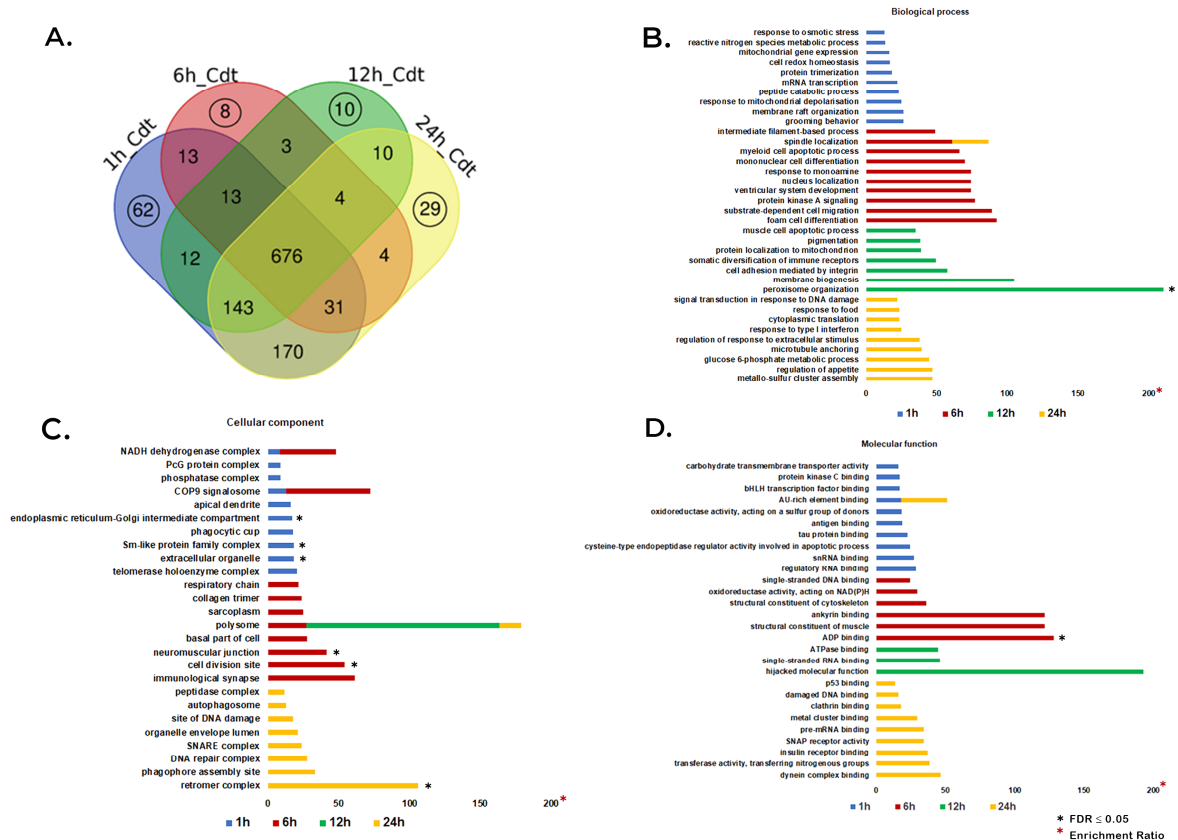
No tempo de 12 horas após o tratamento com a peçonha, a categoria GO "organização de peroxissomos" mostrou um $FDR \leq 0,05$ com a taxa de enriquecimento mais alta, enquanto a "diversificação somática de receptores imunológicos" mostrou a taxa de enriquecimento mais baixa (Figura 4D). Enquanto isso, 24 horas após o tratamento com a peçonha, a função GO do "complexo de retrômero" apresentou a maior taxa de enriquecimento, enquanto a "transdução de sinal em resposta ao dano ao DNA" apresentou a menor taxa de enriquecimento (Figura 4E).

Paralelamente, a análise das proteínas identificadas nas condições tratadas com a peçonha em todos os intervalos de tempos, permitiu identificar 676 proteínas, das quais foram identificadas 62 (1 h), 8 (6 h), 10 (12 h) e 29 (24 h) proteínas exclusivamente em cada tempo (Figura 5A e Tabela Suplementar 4). A análise de classificação de enriquecimento funcional usando a ferramenta Webgestalt permitiu traçar o perfil dessas proteínas exclusivas com base no processo biológico (Figura 5B), componente celular (Figura 5C) e função molecular (Figura 5D) em cada intervalo de tempo.

Quanto ao processo biológico, 36 categorias de GO foram identificadas e enriquecidas. Muitos dos quais eram exclusivos em um determinado intervalo de tempo, no entanto, a "localização do fuso" foi enriquecida em 6 h e 24 h após o tratamento com a peçonha. Além disso, em 12 h após o tratamento com a peçonha,

“organização de peroxissoma” foi a categoria GO com a maior taxa de enriquecimento com o $FDR \leq 0,05$ (Figura 5B).

Figura 5 - Identificação geral de proteínas na condição tratado com a peçonha de *C. d. terrificus*



Fonte: próprio autor, disponível no manuscrito submetido para publicação em periódico científico (apêndice) como “Figure 1”.

Identificação geral de proteínas na condição de tratamento com a peçonha. **A.** Diagrama de Venn comparando proteínas encontradas exclusivamente na condição tratado com a peçonha para cada tempo representado por círculos pretos e que foram submetidos às análises funcionais adicionais. **B.** Enriquecimento para o processo biológico. **C.** Enriquecimento para o componente celular. **D.** Enriquecimento para função molecular.

A análise da categoria “componente celular” mostrou 26 categorias enriquecidas, onde “retículo endoplasmático-compartimento intermediário de Golgi”, “complexo da família de proteínas semelhantes a Sm” e “organela extracelular” mostraram um enriquecimento com $FDR \leq 0,05$ em 1 h após o tratamento com a peçonha. Após 6 horas do tratamento com a peçonha, “junção neuromuscular” e “local de divisão celular” também mostraram um enriquecimento com $FDR \leq 0,05$. Após o

tempo de 24 h, a categoria "complexo retromérico" apresentou a maior taxa de enriquecimento quando comparada às outras categorias no mesmo tempo e com FDR $\leq 0,05$. Além disso, a categoria "polissomo" apareceu com taxas de enriquecimento nos tempos de 6 h, 12 h e 24 h após o tratamento com a peçonha, enquanto "complexo NADH desidrogenase" e "sinalossomo COP9" foram enriquecidos em 1 h e 6 h e posteriores ao tratamento com peçonha de *C. d. terrificus* (Figura 5C).

Dentre as 28 categorias enriquecidas e identificadas na análise de função molecular, a "ligação de ADP" foi a única categoria que apresentou taxa de enriquecimento com FDR $\leq 0,05$ no tempo de 6 h após o tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus*. No entanto, a "ligação do elemento rico em AU" também foi enriquecida em 1 hora e 24 horas após o tratamento com a peçonha. Além disso, a "função molecular sequestrada" foi observada com a maior taxa de enriquecimento em comparação com as outras categorias em 12 h após o tratamento com a peçonha (Figura 5D).

4.2 Análise semi-quantitativa

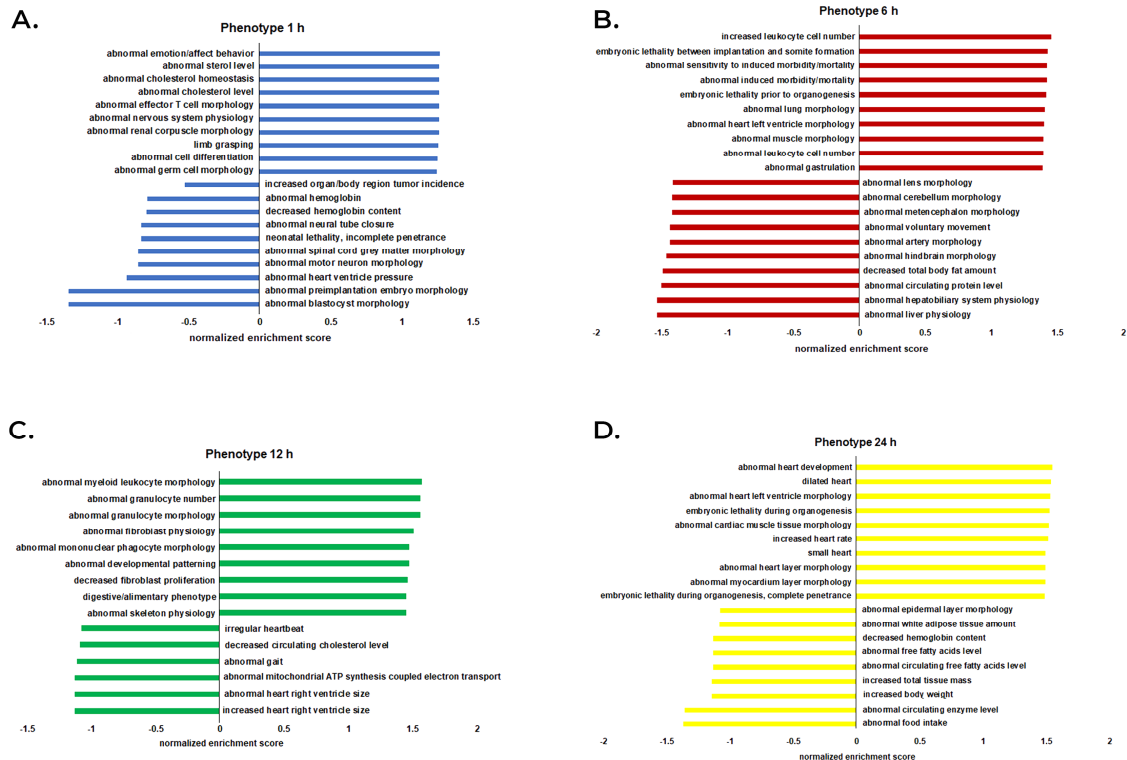
A análise semi-quantitativa dos dados proteômicos levando em consideração a razão das intensidades dos picos entre as amostras tratadas com peçonha/salina (dimetilação pesada/dimetilação leve) permitiu a identificação de um total de 1108 proteínas (Tabela Suplementar 5). A análise de enriquecimento quantitativo do conjunto de genes (GSEA) foi realizada usando a ferramenta Webgestalt (Figura 6). Após 1 h do tratamento, o grupo tratado com a peçonha mostrou o enriquecimento de várias categorias de GO, incluindo "homeostase anormal do colesterol", "nível anormal de colesterol", "fisiologia anormal do sistema nervoso" e "diferenciação celular anormal" e uma diminuição na categoria "morfologia anormal do neurônio motor" e "pressão anormal do ventrículo cardíaco" (Figura 6A). Após 6 horas, o grupo tratado com a peçonha mostrou enriquecimento para "sensibilidade anormal à morbidade / mortalidade induzida", "morbidade / mortalidade induzida anormal", "morfologia anormal do ventrículo esquerdo do coração", "morfologia muscular anormal" e "número anormal de células leucocitárias". Por outro lado, houve uma diminuição no enriquecimento para "morfologia arterial anormal", "diminuição da quantidade de gordura corporal total" e "nível de proteína circulante anormal" (Figura 6B).

Também foi observado Enriquecimento diferenciado após 12 h do tratamento com a peçonha, mostrando um aumento no enriquecimento para as categorias de GO

relacionadas a "fisiologia anormal do fibroblasto", "padrão de desenvolvimento anormal", "proliferação diminuída de fibroblastos" e "fenótipo digestivo / alimentar". Por outro lado, foi observada uma diminuição no enriquecimento de "batimento cardíaco irregular", "diminuição do nível de colesterol circulante", "síntese anormal de ATP mitocondrial acoplado ao transporte de elétrons", "tamanho anormal do ventrículo direito do coração" e "aumento do tamanho do ventrículo direito do coração" (Figura 6C).

Após 24 horas do tratamento com a peçonha, foi destacado o aumento nas categorias "desenvolvimento anormal do coração", "coração dilatado", "morfologia anormal do ventrículo esquerdo do coração", "morfologia anormal do tecido muscular cardíaco", "aumento da frequência cardíaca", "coração pequeno", "morfologia anormal da camada do coração" e "morfologia anormal da camada do miocárdio". Além disso, destacamos a diminuição na "quantidade anormal de tecido adiposo branco", "nível anormal de ácidos graxos livres circulantes", "aumento da massa total do tecido", "aumento do peso corporal", "nível anormal de enzima circulante" e "ingestão alimentar anormal" (Figura 6D).

Figura 6 - Análise funcional semi-quantitativa para enriquecimento do fenótipo de mamíferos

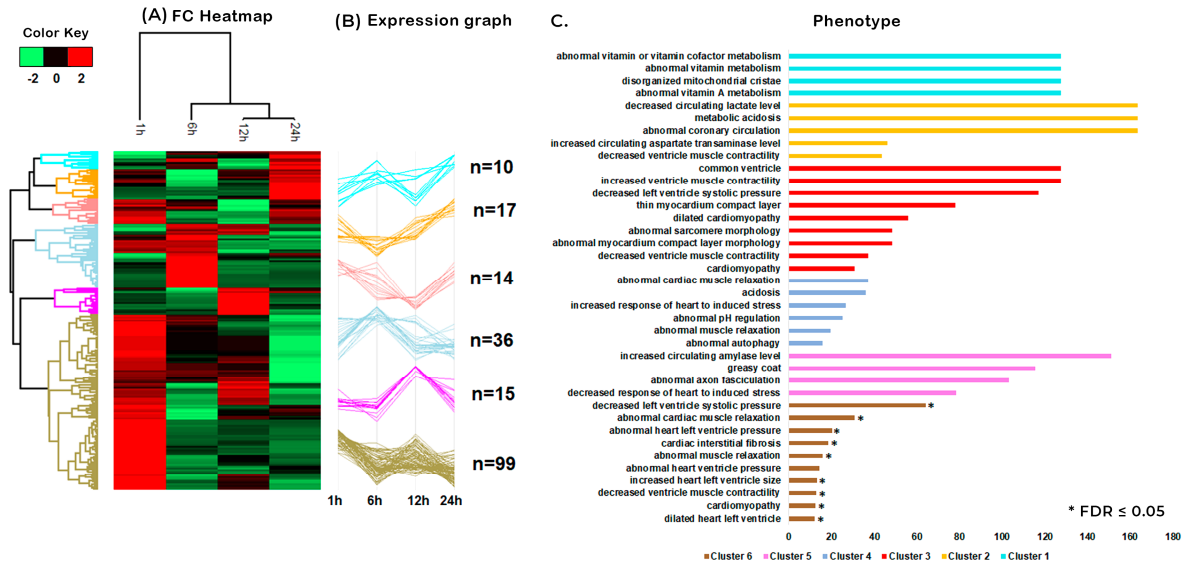


Fonte: próprio autor, disponível no manuscrito submetido para publicação em periódico científico (apêndice) como “Figure 2”.

Análise funcional de enriquecimento do fenótipo de mamíferos utilizando a ferramenta Webgestalt dos dados semi-quantitativos. Todos os valores de intensidade de proteínas identificadas na análise de quantificação por espectrometria de massas foram calculados e submetidos à análise funcional. **A, B, C e D** representam os tempos de 1 h, 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente.

A análise da mudança da abundância das proteínas permitiu identificar 191 proteínas, que apresentaram valores em pelo menos três das cinco réplicas em todos os intervalos de tempo nas amostras controle e tratadas com a peçonha (Tabela Suplementar 6). A análise de agrupamento dessas proteínas mostrou o perfil de mudança de abundância com o tempo após o tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus* quando comparado com o controle. A análise de agrupamento hierárquico organizou as proteínas ao longo do processo de tratamento da peçonha em seis grupos (Figura 7A). Com base nesses resultados, realizamos uma Análise de Enriquecimento de Superrepresentação (ORA) para o fenótipo (*Mammalian Phenotype Ontology*) usando a ferramenta Webgestalt para cada grupo (*cluster*) (Figura 7C).

Figura 7 - Agrupamento hierárquico dos níveis de quantificação de proteínas em 1 h, 6 h, 12 h e 24 h de tratamento com salina ou a peçonha de *C. d. terrificus*



Fonte: próprio autor, disponível no manuscrito submetido para publicação em periódico científico (apêndice) como “Figure 3”.

Agrupamento hierárquico dos níveis de quantificação de proteínas em 1 h, 6 h, 12 h e 24 h. **A.** Grupo hierárquico das proteínas mais significativas para cada tratamento, mostrando mudanças no comportamento das proteínas ao longo do tempo. A alteração da abundância da proteína é representada em uma escala log₂. **B.** Gráficos de expressão de cada grupo (*cluster*) e o número de proteínas que compõem cada *cluster*. Os valores de quantificação de proteína foram normalizados pelo escore Z por linhas. **C.** Enriquecimento da ontologia gênica da categoria de fenótipo para todos os seis *clusters*.

O gráfico de expressão mostrado no *cluster* 1 mostra um aumento na abundância relativa de proteínas em 6 h e 24 h e uma diminuição na abundância em 1 h e 12 h após o tratamento com a peçonha (Figura 7B). A análise de enriquecimento para o fenótipo deste conjunto de proteínas mostrou um enriquecimento de proteínas de quatro categorias de GO: "vitamina anormal ou metabolismo de cofator de vitamina", "metabolismo de vitamina anormal", "cristas mitocondriais desorganizadas" e "metabolismo de vitamina A anormal" (Figura 7C, mostrado em azul claro). O *cluster* 2 mostrou uma diminuição na abundância relativa de proteínas em 6 h e um aumento em 1 h, 12 h e 24 h (Figura 7B). O número total de categorias de GO identificados com a maior taxa de enriquecimento foram: “diminuição do nível de lactato circulante”, “acidose metabólica” e “circulação coronária anormal” (Figura 7C, mostrada em laranja). A análise da expressão relativa do *cluster* 3 mostrou uma diminuição na abundância relativa das proteínas em 12 h e um aumento na abundância relativa em 1 h, 6 h e 24 h após o tratamento com a peçonha (Figura 7B).

As análises de enriquecimento para o fenótipo dessas proteínas foram relacionadas a fenômenos que ocorrem no coração. Entre eles, destacamos "ventrículo comum" e "aumento da contratilidade do músculo ventrículo" com a maior taxa de enriquecimento (Figura 7C, mostrada em vermelho). No *cluster 4*, observamos um aumento na abundância relativa de proteínas em 6 h e uma diminuição na abundância em 1 h, 12 h e 24 h após o tratamento com a peçonha (Figura 7B). A análise de enriquecimento de fenótipo revelou várias categorias de GO das quais destacamos "relaxamento anormal do músculo cardíaco" e "acidose" com as taxas de enriquecimento mais altas (Figura 7C, mostrada em azul escuro). A análise de expressão relativa de proteínas no *cluster 5* agrupou proteínas que aumentaram na abundância relativa em 12 h e uma diminuição nesta abundância em 1 h, 6 h e 24 h após o tratamento com a peçonha (Figura 7B). A análise de enriquecimento de fenótipo identificada neste cluster mostrou quatro categorias de GO, das quais destacamos "diminuição da resposta do coração ao estresse induzido" (Figura 7C, mostrada em rosa). A análise da expressão relativa das proteínas no *cluster 6* com o maior número de proteínas mostrou diminuição da abundância das proteínas de 6 h para 24 h (Figura 7B). O enriquecimento funcional para o fenótipo mostrou 10 categorias de GO que podem estar relacionadas a alterações no coração, como "ventrículo esquerdo dilatado do coração", "cardiomiopatia", "contratilidade muscular do ventrículo diminuída", "aumento do tamanho do ventrículo esquerdo do coração", "pressão anormal do ventrículo cardíaco", "relaxamento muscular anormal", "fibrose intersticial cardíaca", "pressão anormal do ventrículo esquerdo do coração", "relaxamento anormal do músculo cardíaco", "diminuição da pressão sistólica do ventrículo esquerdo" (Figura 7C, mostrada em marrom).

4.3 Análise de PCA

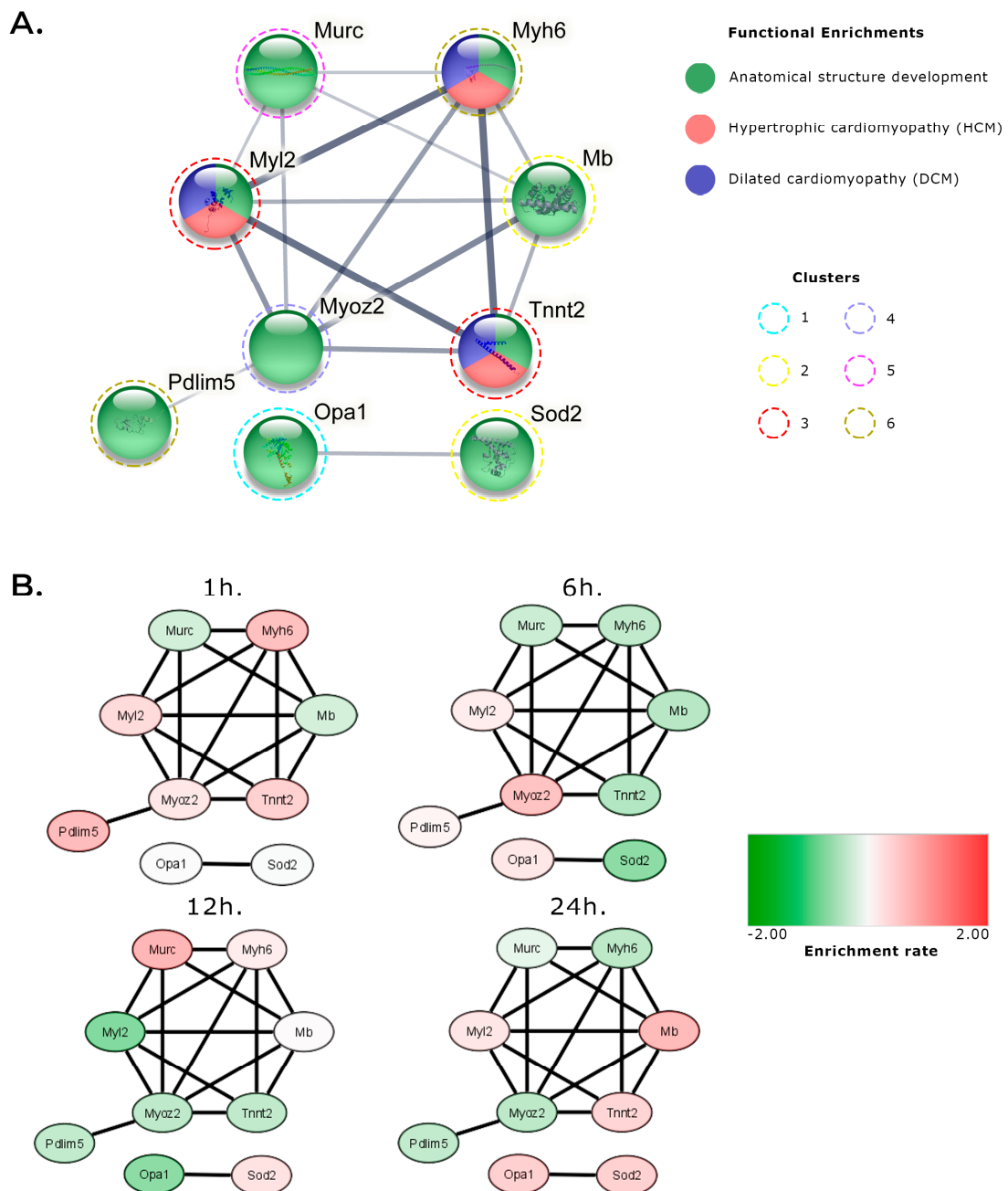
O PCA (Análise de Componentes Principais, em português) foi aplicado às proteínas presentes em pelo menos três réplicas biológicas para todos os tratamentos. Os intervalos de tempo projetados em um novo espaço de componentes representam as diferenças significativas para cada tempo específico. A projeção ortogonal entre os vetores para os tempos de 1 h e 6 h mostra as proteínas específicas associadas a cada intervalo que poderiam evidenciar parte da resposta sistêmica ao estresse no coração após o tratamento com a peçonha. Estão representados na Figura 8 os dois

primeiros componentes (PC1 e PC2) e explicam 63% da variabilidade proteômica total (Figura 8).

Após 6 h de tratamento com a peçonha, cujo intervalo de tempo é intermediário para a resposta sistêmica, observa-se uma correlação negativa com base no PC2 para os demais intervalos de tempo, corroborando com a análise de agrupamento, sendo evidenciada principalmente pelo *cluster* 4, onde muitas proteínas aumentaram sua abundância nestes intervalos de tempos, como MYOZ2 e NDUS6, que podem estar relacionadas ao “aumento da resposta do coração ao estresse induzido” e “relaxamento anormal do músculo cardíaco” (Figura 7C). Os intervalos de tempo entre 12 h e 24 h apresentaram correlação positiva e maior com os componentes PC1 e PC2, corroborando com a análise de agrupamento (Figura 7C), sendo evidenciada pelo *cluster* 2 onde muitas proteínas diminuíram sua abundância nesses tempos, porém com aumento de abundância de algumas proteínas incluindo SODM e MYG, ambas relacionadas à “redução da contratilidade do músculo ventricular”. Em 1 h após o tratamento com a peçonha, observa-se uma correlação maior e positiva no PC2 e um perfil significativamente divergente em relação aos demais momentos, o que pode ser explicado por um conjunto de proteínas recrutadas exclusivas associadas à primeira resposta ao tratamento com a peçonha, sendo evidenciado pela análise de agrupamento (Figura 7C) em particular o *cluster* 6, que destaca proteínas como PDLI5 e MYH6 relacionadas às categorias “ventrículo esquerdo dilatado do coração”, “cardiomiopatia” e “pressão anormal do ventrículo esquerdo do coração”.

tratamento com a peçonha, apenas a proteína Myl2 permaneceu regulada positivamente, e no intervalo de tempo de 12 h apenas Myh6 permaneceu regulada positivamente, e em 24 h tanto Myl2 e Tnnt2 permaneceram reguladas positivamente (Figura 9B).

Figura 9 - Análise de vias de proteínas no STRING e Cytoscape



Fonte: próprio autor, disponível no manuscrito submetido para publicação em periódico científico (apêndice) como “Figure 5”.

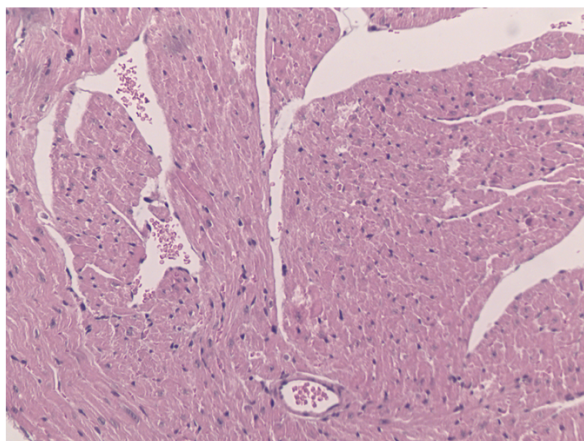
Visão da análise semi-quantitativa de rede de proteínas. **A.** Análise de STRING PPI onde a largura da aresta representa a confiança encontrada para a interação fornecida. A cor de cada nó é representada por sua atribuição funcional ou relacionada à doença. A linha pontilhada colorida ao redor dos nós representa o cluster de origem. **B.** Análise de rede combinando resultados quantitativos usando Cytoscape. Este resultado mostra padrões individuais de regulação positiva ou negativa (representados como vermelho e verde, respectivamente).

4.5 Análise histológica

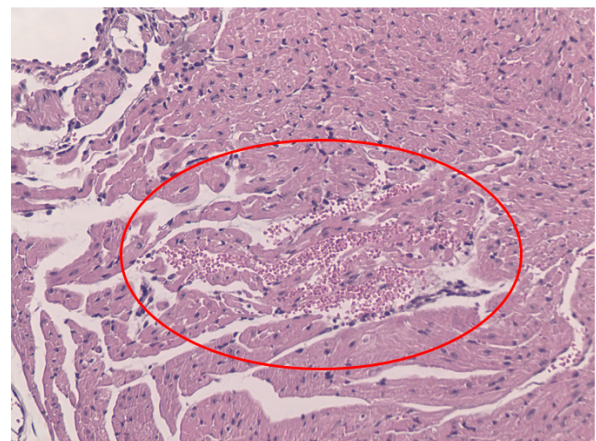
O exame por microscopia de seções dos tecidos cardíacos corados com H-E não mostrou grandes alterações na histopatologia macroscópica do coração durante a fase aguda do tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus*. Os corações coletados em 1 h, 6 h, 12 h e 24 h após o tratamento com a peçonha não mostraram aumento aparente de necrose ou infiltração inflamatória quando comparados aos grupos controle (Figura 10 A). Porém, foram observados sinais de extravasamento sanguíneo em alguns dos animais de 12 h ou 24 h após o tratamento com a peçonha, mas a alteração foi sutil e pôde ser detectada em apenas metade dos animais tratados com a peçonha nesses intervalos de tempo (Figura 10 B). Essas mudanças não foram observadas nos tempos de 1 h ou 6 h (Qui quadrado $p = 0,045$, considerando a observação de 12 h e 24 h).

Figura 10 – Análise microscópica por hematoxilina-eosina do coração dos camundongos

A.



B.



Fonte: próprio autor, 2021.

Análise histopatológica do coração dos camundongos após 24 h tratados com **A.** salina e **B.** peçonha. Observamos sinais de extravasamento sanguíneo em alguns dos animais em 12 h e 24 h após o tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus* (região demarcada com o círculo vermelho). Aumento 10x.

5 DISCUSSÃO

A caracterização das proteínas do coração após o tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus* mostrou que várias proteínas mudaram a abundância com o tempo. Com isso, a análise funcional das proteínas identificadas com base na análise do fenótipo por ontologia gênica mostrou que o tecido cardíaco sofreu várias mudanças.

Após 1 h do tratamento com a peçonha, observa-se uma suprarregulação de proteínas relacionadas ao corpúsculo renal anormal (Figura 6A). Além disso, na literatura encontram-se trabalhos que já relataram sobre distúrbios renais após a ocorrência de um acidente crotálico, cuja a insuficiência renal aguda (IRA) foi a complicação mais grave descrita, assim como a proteinúria, hematúria e insuficiência renal, que são as manifestações mais comuns decorrentes de mordidas por serpentes peçonhentas crotálicas (ALBUQUERQUE et al., 2013; AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; CHUGH; SAKHUJA, 2017; DANZIG, 1961; MARTINS et al., 2002).

Ademais, algumas categorias de proteínas mostraram mudanças relacionadas ao sistema nervoso local. Na literatura foi descrito que a crotocina tem demonstrado forte ação neurotóxica atingindo o tecido cardíaco, e dessa forma comprometendo o sistema nervoso autônomo cardíaco, conforme descrito por Hernández et al. (2007). Algumas categorias de GO para fenótipo foram enriquecidas para funções relacionadas a distúrbios lipídicos, destacando as categorias relacionadas aos níveis anormais de esteróis e colesteróis. Esses dados corroboram com as informações contidas no trabalho de Marinovic e colaboradores que descreveram que a crotamina pode reduzir os níveis de colesterol de baixa densidade e triglicerídeos, mas também aumenta os níveis de colesterol de alta densidade (MARINOVIC et al., 2018). Por outro lado, algumas categorias para fenótipo tiveram as proteínas com a regulação diminuída, como por exemplo a categoria relacionada à tumorigenicidade, e que na literatura já foi relatado sobre a atividade antitumoral proporcionada pela crotamina que é uma molécula presente na peçonha de serpentes do gênero *Crotalus* (SANTOS; FORTES-DIAS; SANTOS, 2017).

Após 6 h do tratamento com a peçonha, que corresponde ao tempo em que normalmente o paciente procura atendimento médico, observa-se um grande aumento nas categorias e funções relacionadas à mortalidade do indivíduo, o que demonstra um grande nível de distúrbios que a peçonha pode estar causando no coração e no organismo (Figura 6B). As categorias de GO relacionadas à anormalidade do

ventrículo foram observadas em 1 h após tratamento com a peçonha, mas no tempo de 6 h após o tratamento foi observado também um aumento de enriquecimento de proteínas relacionadas com a pressão do ventrículo esquerdo, o que pode denotar uma mudança no cenário observado anteriormente, embora não haja uma explicação exata sobre os mecanismos para este fato. Além disso, anormalidades nas categorias de proteínas relacionadas ao desenvolvimento embrionário e anormalidades relacionadas ao pulmão foram observadas. Adicionalmente, observou-se uma diminuição no enriquecimento de categorias de proteínas no tempo de 6 h que estão principalmente relacionadas a problemas na fisiologia do fígado, movimento voluntário anormal e distúrbios na morfologia das regiões do cérebro. Tendo isso em vista, em um trabalho anterior de nosso grupo foram observadas alterações em várias proteínas, relacionadas à morfologia do cérebro especificamente no cerebelo de camundongos tratados com a peçonha de *C. d. terrificus* (MONTONI et al., 2020).

Por sua vez, no tempo de 12 h após o tratamento com a peçonha, foi observado um aumento da categoria GO de proteínas relacionadas com o número anormal de granulócitos, o que pode estar indicando uma ativação das respostas da atividade imune local contra a ação da peçonha (Figura 6C). Além disso, as categorias de proteínas relacionadas à morfologia de leucócitos mielóides e morfologia anormal de fagócitos mononucleares e granulócitos podem indicar alterações nesses tipos de células do sistema imunológico. Anteriormente, em um trabalho de Cruz, Mendonça e Petricevich (2005) foi descrito que a peçonha de *C. d. terrificus* foi capaz de interferir nas alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas em macrófagos de camundongos BALB/c (CRUZ; MENDONÇA; PETRICEVICH, 2005). No tempo de 12 h, também foi observado um aumento no enriquecimento para as categorias de proteínas com as funções relacionadas à fisiologia anormal dos fibroblastos e diminuição da proliferação de fibroblastos. Por outro lado, observamos uma redução no enriquecimento nas categorias de proteínas relacionadas à arritmia, tamanho anormal do ventrículo direito do coração e aumento do tamanho do ventrículo direito do coração, mostrando um cenário oposto de anormalidades observadas nos tempos anteriores. Além disso, os resultados mostraram uma redução na categoria de proteínas relacionadas à redução do nível de colesterol circulante, ao contrário do cenário visto após 1 h após o tratamento com a peçonha. Em Winkler et al. (1993), foi descrito uma diminuição do nível de colesterol em pacientes e coelhos após a mordida da serpente *Vipera palaestinae*, que se correlacionou negativamente com a gravidade

do envenenamento. Esse fenômeno foi explicado como sendo provavelmente devido ao extravasamento transcápsular de lipoproteínas e alterações no transporte e metabolismo das lipoproteínas causadas por algum componente da peçonha, como a PLA2 (Fosfolipase 2) (WINKLER et al., 1993).

Após 24 h do tratamento com a peçonha *C. d. terrificus*, várias categorias de proteínas apresentaram um aumento de enriquecimento direcionados ao dano à estrutura cardíaca ao nível da estrutura celular e morfologia do coração, indicando uma possível lesão ao tecido cardíaco (Figura 6D). Esses dados corroboram com relatos apresentados anteriormente que descrevem fenótipos semelhantes aos observados neste estudo, como danos a ambos os ventrículos, presença de infiltrados de células de defesa, entre outros encontrados (PAOLA; ROSSI, 1993). Além disso, observou-se uma diminuição de enriquecimento de categorias de proteínas relacionadas ao tecido adiposo branco e massa corporal, o que corrobora com os dados apresentados por Marinovic e colaboradores descritos anteriormente (MARINOVIC et al., 2018).

A análise de agrupamento hierárquico permitiu observar mudanças na abundância do perfil de proteínas com o tempo após o tratamento da peçonha de *C. d. terrificus* (Figura 7 e Tabela Suplementar 6). Entre as proteínas identificadas, a OPA1 (proteína de 120 kDa semelhante à dinamina) do *cluster* 1 e localizada na categoria GO de “cristas mitocondriais desorganizadas” (Figura 7C), mostrou um aumento relativo da abundância em 6 h, uma queda após 12 h e um aumento às 24 h após o tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus* (Figura 7B). Na literatura, a OPA1 é uma proteína descrita com atividades relacionadas à função que mantém a estrutura normal e função com as cristas mitocondriais relacionadas à preservação da estrutura da membrana interna a fim de proteger as células do processo apoptótico (OLICHON et al., 2003). Assim, a redução dessa proteína pode levar à morte celular e contribuir para a progressão da insuficiência cardíaca, conforme descrito por Chen et al. (2009).

A SODM (superóxido dismutase) e a MYG (mioglobina) no *cluster* 2 estão ambas relacionadas à “contratilidade do músculo ventrículo diminuída” (Figura 7C). Essas proteínas tiveram a abundância diminuída em 6 h e aumentada em 12 h e 24 h após o tratamento com a peçonha (Figura 7B). Remmen et al. (2001) demonstraram anteriormente que a SODM pode desempenhar um papel importante na indução da via mitocondrial de apoptose no coração, surgindo principalmente através da transição da permeabilidade mitocondrial (REMMEN et al., 2001). MYG, por outro lado, é

descrita como uma proteína que está presente no citoplasma das células dos músculos esqueléticos e cardíacos e com a possibilidade de ser detectada em altas concentrações plasmáticas perfazendo dela um dos principais biomarcadores encontrados nas primeiras horas após um infarto agudo do miocárdio (OHMAN et al., 1990; PARIKH; LEMOS, 2006; STÖRK et al., 2000).

As proteínas MLRV (cadeia leve reguladora da miosina) e TNNT2 (troponina T2) no *cluster 3* estão relacionadas com "cardiomiopatia", "contratilidade muscular do ventrículo diminuída", "morfologia sarcômero anormal" e "cardiomiopatia dilatada" (Figura 7C). A abundância dessas proteínas diminuiu em 6 h e 12 h, e foram aumentadas em 24 h após o tratamento com a peçonha (Figura 7B). A proteína MLRV é codificada pelo gene MYL2 e integra as regiões sujeitas à regulação e fosforilação das cadeias leves da miosina, desempenhando um papel importante na estrutura e função do músculo cardíaco (SHEIKH; LYON; CHEN, 2015). Porém, mutações encontradas no gene que codifica MLRV foram relatadas como associadas a quadros patológicos relacionados a cardiomiopatia hipertrófica de câmara média do ventrículo esquerdo (CMH) e um papel no desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca crônica (FLAVIGNY et al., 1998; KABAEVA et al., 2002; LI et al., 2011). A proteína TNNT2 tem sido descrita por possuir uma atividade fisiológica na regulação do cálcio da função do filamento fino de actina, o que a torna essencial para a contração dos músculos cardíacos (WEI; JIN, 2016). Também foi relatado que mutações no gene que codifica TNNT2 podem resultar em cardiomiopatia dilatada (HERSHBERGER et al., 2009).

A MYOZ2 (miosina 2) no *cluster 4* está inserida na "resposta aumentada do coração ao estresse induzido" enquanto a proteína NDUS6 (NADH: proteína Ubiquinona Oxidoreductase Subunidade S) encontra-se na categoria GO de "relaxamento anormal do músculo cardíaco" (Figura 7C). O perfil quantitativo a respeito dessas proteínas mostrou que a abundância aumentou em 6 h, diminuiu em 12 h e permaneceu baixa até 24 h após o tratamento com a peçonha (Figura 7B). A MYOZ2 é descrita na literatura como sendo relacionada à cardiomiopatia hipertrófica (HCM) por conta de mutações que possam ocorrer em seu gene codificador (MARIAN, 2008; OSIO et al., 2007). A proteína NDUS6 pode estar relacionada a uma possível cardiomiopatia específica por deficiência do complexo mitocondrial I, que pode aumentar o risco de insuficiência cardíaca e morte (KE et al., 2012).

A CAVN4 (proteína 4 associada à caveolae) no *cluster* 5 está relacionada à categoria GO de “resposta diminuída do coração ao estresse induzido” (Figura 7C). Esta proteína está inserida no grupo cuja abundância aumentou em 12 h e diminuiu em 24 h após o tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus* (Figura 7B). Mutações no gene MURC / Cavin-4 da proteína CAVN4 têm sido observadas em indivíduos com doença cardíaca dilatada e uma possível deleção do gene poderia reduzir a lesão de reperfusão isquêmica em camundongos (NISHI et al., 2018, 2019).

A proteína PDLI5 (proteína 5 de domínio PDZ e LIM) e MYH6 (miosina-6) estão inseridas no *cluster* 6. A abundância de PDLI5 diminuiu em 6 h, 12 h e 24 h após o tratamento com a peçonha de *C. d. terrificus*, enquanto a abundância de MYH6 aumentou em 1 h e 12 h e diminuiu em 6 h e 24 h após o tratamento com a peçonha (Figura 7B). Ambas as proteínas estão relacionadas às categorias GO “coração dilatado do ventrículo esquerdo”, “cardiomiopatia” e “pressão anormal do ventrículo esquerdo do coração” (Figura 7C).

A proteína PDLI5 é descrita por ser responsável por manter a homeostase celular quando o coração é submetido a estresse biomecânico e, assim, regulando a atividade do canal de cálcio cardíaco e conseqüentemente preservando a contratilidade cardíaca. A perda ou redução desta proteína pode causar aumento ventricular, prejuízo da contratilidade cardíaca, disfunção sistólica do ventrículo esquerdo e redução da fração de encurtamento em resposta ao estresse. Além disso, modificações no gene codificador de PDLIM5 podem resultar em cardiomiopatia hipertrófica (HCM) ou cardiomiopatia dilatada (DCM), dependendo da rota percorrida durante a mutação (CHENG et al., 2010; LI; PONTEN; REMEDIOS, 2012). Na literatura encontram-se descrições de mutações no gene que codifica a proteína MYH6 que estão relacionadas a doenças como cardiomiopatia hipertrófica CMH e CMD dilatado (CARNIEL et al., 2005; HERSHBERGER et al., 2010; NIIMURA et al., 2002).

É importante destacar que a análise de rede e interação proteína-proteína das proteínas destacadas reforçam que elas têm o papel distinto relacionado à função cardíaca (Figura 9A). MYH6 está envolvida na contração muscular, TNNT2 é a subunidade de ligação da troponina à tropomiosina e MYL2 possui função relacionada ao desenvolvimento e função cardíaca (Figura 9A). Além disso, essas proteínas foram previamente relatadas na literatura por estarem envolvidas em cardiomiopatias (CARNIEL et al., 2005; FLAVIGNY et al., 1998; HERSHBERGER et al., 2009, 2010;

KABAEVA et al., 2002; LI et al., 2011; NIIMURA et al., 2002; SHEIKH; LYON; CHEN, 2015). Neste estudo, essas proteínas mostraram uma regulação positiva em 1 h, o que pode sugerir que essas proteínas estão sendo reguladas positivamente em resposta ao dano precoce provocado pela peçonha (Figura 9B), embora não tenhamos sido capazes de observar um padrão consistente ao longo de todo o processo do tratamento com a peçonha.

As análises da histologia dos corações dos camundongos permitiram identificar sinais de extravasamento sanguíneo em alguns animais em 12 h e 24 h após o tratamento com 0,5 DL 50 da peçonha de *C. d. terrificus* (Figura 10 B). No estudo da histologia do coração de ratos machos Wistar tratados com a peçonha de *C. d. terrificus* realizado por Paola e Rossi, foi mostrado que os primeiros focos de necrose miocárdica foram observados a partir das 24 h após a aplicação de 80 µg da peçonha desta serpente na cavidade intraperitoneal desses animais (PAOLA; ROSSI, 1993). Dessa forma, provavelmente observaríamos mudanças histológicas significativas dos efeitos tóxicos da peçonha apenas no período tardio com doses maiores de peçonha aplicada.

Os dados aqui apresentados foram capazes de identificar categorias de proteínas específicas em cada intervalo de tempo após o tratamento com a peçonha que, por fim, mostrou distúrbios clássicos esperados para um acidente crotálico como danos aos rins, danos ao sistema nervoso e danos ao coração. Além disso, o estudo do comportamento dessas proteínas pode melhorar as abordagens de tratamento ou projetar novas intervenções terapêuticas a fim de diminuir a debilitação, as incapacidades e as mortes causadas por acidentes com mordidas pela serpente *C. d. terrificus*.

6 CONCLUSÕES

A análise proteômica por espectrometria de massas permitiu identificar mais de 1300 proteínas do coração de camundongos tratados com a peçonha de *C. d. terrificus* e quantificar mudanças na abundância relativa após 1 h, 6 h, 12 h e 24 h de tratamento com a peçonha. Observamos que diversas proteínas apresentaram mudanças no perfil quantitativo ao longo do tempo de tratamento mostrando os possíveis efeitos tóxicos da peçonha no coração dos camundongos que podem estar desencadeando perturbações na fisiologia do coração.

O efeito tóxico da peçonha não afetou apenas uma proteína, mas sim uma grande quantidade de proteínas que trabalham sinergicamente desempenhando diversas funções no tecido cardíaco, desencadeando diferentes efeitos imunológicos e bioquímicos. Destacamos proteínas relacionadas às mitocôndrias, no desenvolvimento e manutenção da estrutura anatômica do coração e proteínas que podem ser classificadas como biomarcadores de doenças cardíacas, inclusive relacionadas às cardiomiopatias hipertrófica e dilatada. Estes dados corroboram com dados histológicos em que observamos, mesmo que não significativamente, extravasamentos sanguíneos em 12 h e 24 h após o tratamento com a peçonha. Estes dados mostram que inicialmente a peçonha age no dano a componentes celulares que culminam ao dano em componentes estruturais ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS¹

- AHRENS, C. H. *et al.* Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nature reviews** molecular cell biology, v. 11, n. 11, p. 789–801, 2010. DOI: 10.1038/nrm2973.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* Acute kidney injury caused by crotalus and bothrops snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, v. 55, n. 5, p. 295–301, 2013. DOI: 10.1590/S0036-46652013000500001.
- APPLE, F. S.; GOETZE, J. P.; JAFFE, A. S. Doença cardiovascular. *In*: BURTIS, C. A.; BRUNS, D. E.; RODRIGUES, F. S. M. (tradutor). **Tietz fundamentos de química clínica e diagnóstico molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2016. p. 632–650.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. *In*: CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil**: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 6–12.
- ARMIROTTI, A.; DAMONTE, G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. **Proteomics**, v. 10, n. 20, p. 3566–76, 2010. DOI: 10.1002/pmic.201000245.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. *et al.* Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 631–6, 1985. DOI: 10.1016/0041-0101(85)90367-8.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina (Ribeirão Preto online)**, v. 36, n. 2/4, p. 480, 2003. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v36i2/4p480-489.
- AZEVEDO MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente Crotálico. *In*: CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil**: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 108–115.
- BARBOSA, E. B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da associação médica brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012. DOI: 10.1590/S0104-42302012000300019.
- BARRABIN, H. *et al.* Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. *In*: ROSEMBERG, P. **Toxins**: animals, plant and microbial. New York: Pergamon Press, 1978. p. 113–133.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta**

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

Physiologica Latinoamericana. Buenos Aires, 1961. v. 11, p. 224–32.

BERGMANN, O. *et al.* Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1566–75, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.026.

BHARADWAJ, L. A. Cardiac toxicology. *In*: BALLANTYNE, B. *et al.* **General, applied and systems toxicology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2009. p. 1–22. DOI: 10.1002/9780470744307.gat067.

BIEBER, A. L.; NEDELKOV, D. Structural, biological and biochemical studies of myotoxin a and homologous myotoxins. **Journal of toxicology: toxin reviews**, v. 16, n. 1–2, p. 33–52, 1997. DOI: 10.3109/15569549709064092.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 07–16, 2003. DOI: 10.1590/S0102-311X2003000100002.

BRAZIL, O. V. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, n. 3, p. 981–92, 1966. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6002982>. Acesso em: 5 abr. 2021.

BRAZIL, O. V. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n. 3, p. 119–126, 1987. DOI: 10.1590/S0036-46651987000300001.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A2 and the crotoxin complex. **Toxicon**, v. 14, n. 3, p. 221–33, 1976. DOI: 10.1016/0041-0101(76)90010-6.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of mass spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405–14, 2007. DOI: 10.1002/jms.1242.

CAMARGO, A. C. M. *et al.* Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 516–23, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.07.013.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca: Comstock Pub Assoc, 1989.

CARNIEL, E. *et al.* Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. **Circulation**, v. 112, n. 1, p. 54–9, 2005. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.507699.

CELERMAJER, D. S. *et al.* Cardiovascular disease in the developing world: prevalences, patterns, and the potential of early disease detection. **Journal of the american college of cardiology**, v. 60, n. 14, p. 1207–16, 2012. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.03.074.

CHEN, C.-H. W. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. **Analytica chimica acta**, v. 624, n. 1, p. 16–36, 2008. DOI:

10.1016/j.aca.2008.06.017.

CHEN, L. *et al.* Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. **Cardiovascular research**, v. 84, n. 1, p. 91–9, 2009. DOI: 10.1093/cvr/cvp181.

CHENG, H. *et al.* Loss of enigma homolog protein results in dilated cardiomyopathy. **Circulation research**, v. 107, n. 3, p. 348–56, 2010. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.218735.

CHERNUSHEVICH, I. V.; LOBODA, A. V.; THOMSON, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 36, n. 8, p. 849–65, 2001. DOI: 10.1002/jms.207.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279–303, 1991. DOI: 10.1016/0041-0101(91)90116-9.

CHUGH, K. S.; SAKHUJA, V. Renal disease caused by snake venom. *In*: TU, A. T. **Handbook of natural toxins: reptile venoms and toxins**. Abingdon, England, United Kingdom: Routledge, 2017. p. 471–493. DOI: 10.1201/9780203752715.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. **Herpetologia brasileira**, v. 7, n. 1, p. 11–57, 2018. Disponível em: <http://public.sbherpetologia.org.br/assets/Documentos/2016/10/lista-de-repteis-2018-2.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2021.

CRUZ, A. H.; MENDONÇA, R. Z.; PETRICEVICH, V. L. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. **Mediators of inflammation**, v. 2005, n. 6, p. 349–59, 2005. DOI: 10.1155/MI.2005.349.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 6, p. 924–9, 1988. DOI: 10.1016/0035-9203(88)90044-2.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 3, p. 447–451, 1990. DOI: 10.1016/0035-9203(90)90358-L.

DANZIG, L. E. Hemodialysis of acute renal failure following rattlesnake bite, with recovery. **JAMA**, v. 175, n. 2, p. 136, 1961. DOI: 10.1001/jama.1961.63040020031017.

DART, R. C.; RUSSELL, F. E. Toxic effects of animal toxins. *In*: AMDUR, M. O.; DOULL, J. KLAASSEN, C. D. **Cassarett and Doulls toxicology: the basic science of poisons**. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 1991. p. 753–803.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and molecular**

life sciences, v. 66, n. 17, p. 2851–71, 2009. DOI: 10.1007/s00018-009-0050-2.

DOLL, S. *et al.* Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1469, 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-01747-2.

DUMBACHER, J. P.; SPANDE, T. F.; DALY, J. W. Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (*Ifrita kowaldi*) from New Guinea. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 97, n. 24, p. 12970–12975, 2000. DOI: 10.1073/pnas.200346897.

EMIDIO, N. B. *et al.* Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU revista**, v. 41, n. 3 e 4, p. 101–111, 2015. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/2482>. Acesso em: 4 abr. 2020.

FERNANDES, C. A. H. *et al.* Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 43885, 2017. DOI: 10.1038/srep43885.

FERREIRA, M. L. *et al.* Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1603–1608, 1992. DOI:10.1016/0041-0101(92)90032-Z.

FIGUEIREDO, D. A. L. *et al.* Toposome: source of antimicrobial molecules in the gonads of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 109, p. 51–61, 2021. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.11.023.

FILHO, A. A. Acidentes provocados por animais peçonhentos. *In*: RATTON, J. L. de A. **Medicina intensiva**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1997, p. 574–579.

FLAVIGNY, J. *et al.* Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of molecular medicine**, v. 76, n. 3–4, p. 208–14, 1998. DOI: 10.1007/s001090050210.

FORTES-DIAS, C. L. *et al.* A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 22, p. 15646–15651, 1994. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)40730-7.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969–985, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.012.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 28, p. 2927–34, 2007. DOI: 10.2174/138161207782023739.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 909–920, 2008. DOI: 10.1002/pmic.200700777.

GONÇALVES-MACHADO, L. *et al.* Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of proteomics**, v. 135, p. 73–89, 2016. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.04.029.

GONÇALVES, J. M. Purification and properties of crotoamine. *In*: BUCKLEY, E. E.; PORGES, N. **Venoms**. Washington, DC: American association for the advancement of science, 1956. p. 261–273.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223–35, 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.11.020.

HADLER, W. A.; BRAZIL, O. V. Pharmacology of crystalline crotoxin. IV. Nephrotoxicity. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 33, n. 3, p. 1001–8, 1966. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6002953>. Acesso em 4 abr. 2021.

HEIN, M. Y *et al.* Proteomic analysis of cellular systems. *In*: WALHOUT, A. J. M.; VIDAL, M.; DEKKER, J. B. T. **Handbook of systems biology**. San Diego: Elsevier, 2013. p. 3–25. DOI: 10.1016/B978-0-12-385944-0.00001-0.

HERNÁNDEZ, M. *et al.* Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 59, n. 2, p. 129–37, 2007. DOI: 10.1016/j.etp.2007.04.002.

HERSHBERGER, R. E. *et al.* Clinical and functional characterization of TNNT2 mutations identified in patients with dilated cardiomyopathy. **Circulation: cardiovascular genetics**, v. 2, n. 4, p. 306–13, 2009. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.108.846733.

HERSHBERGER, R. E. *et al.* Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1, and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. **Circulation: cardiovascular genetics**, v. 3, n. 2, p. 155–61, 2010. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.109.912345.

HU, Q. *et al.* The Orbitrap: a new mass spectrometer. **Journal of mass spectrometry**, v. 40, n. 4, p. 430–43, 2005. DOI: 10.1002/jms.856.

IMAI, K.; KOSHIYAMA, A.; NAKATA, K. Towards clinical proteomics analysis. **Biomedical chromatography**, v. 25, n. 1–2, p. 59–64, 2011. DOI: 10.1002/bmc.1541.

JIN, H.; VARNER, J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. **British journal of cancer**, v. 90, n. 3, p. 561–5, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601576.

JORGE, M. T. *et al.* Comportamento de enzimas e alterações anátomo-patológicas do músculo esquelético em pacientes picados por serpentes do gênero *Crotalus*. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 19, n. supl, p. 29, 1986.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 4, p. 347–354, 1992. DOI: 10.1590/S0036-46651992000400013.

KABAEVA, Z. T. *et al.* Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy. **European journal of human genetics**, v. 10, n. 11, p. 741–8, 2002. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200872.

KARDONG, K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 46, p. 105–118, 1982. Disponível em: http://www.public.wsu.edu/~kkardong/Web%20of%20KVK_06b/Publications/Evolution_venom_app82.pdf. Acesso em: 4 abr. 2021.

KE, B. X. *et al.* Tissue-specific splicing of an Ndufs6 gene-trap insertion generates a mitochondrial complex I deficiency-specific cardiomyopathy. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 109, n. 16, p. 6165–6170, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1113987109.

KERKIS, A. *et al.* Crotoamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **FASEB journal**, v. 18, n. 12, p. 1407–9, 2004. DOI: 10.1096/fj.03-1459fje.

KISAKI, C. Y. *et al.* *Bothrops jararaca* snake venom modulates key cancer-related proteins in breast tumor cell lines. **Toxins**, v. 13, n. 8, p. 519, 2021. DOI: 10.3390/toxins13080519.

KOZAKO, T. *et al.* Role of the vestibular nuclei in endothelin-1-induced barrel rotation in rats. **European journal of pharmacology**, v. 454, n. 2–3, p. 199–207, 2002. DOI: 10.1016/s0014-2999(02)02498-6.

LEE, C. Y. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. **Annual review of pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 265–86, 1972. DOI: 10.1146/annurev.pa.12.040172.001405.

LI, A.; PONTEN, F.; REMEDIOS, C. G. dos. The interactome of LIM domain proteins: the contributions of LIM domain proteins to heart failure and heart development. **Proteomics**, v. 12, n. 2, p. 203–25, 2012. DOI: 10.1002/pmic.201100492.

LI, Y. *et al.* Slow cardiac myosin regulatory light chain 2 (MYL2) was down-expressed in chronic heart failure patients. **Clinical cardiology**, v. 34, n. 1, p. 30–4, 2011. DOI: 10.1002/clc.20832.

- LOMEO, R. da S. *et al.* Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. **Toxicon**, v. 85, p. 5–16, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.04.008.
- LOURENÇO, A. *et al.* Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. **Toxicon**, v. 69, p. 75–81, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.01.006.
- LYNCH, M. *et al.* Vascular proteomics in metabolic and cardiovascular diseases. **Journal of internal medicine**, v. 280, n. 4, p. 325–38, 2016. DOI: 10.1111/joim.12486.
- LYNCH, Vincent J. Inventing an arsenal: adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A2 genes. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 2, p. 1–14, 2007. DOI: 10.1186/1471-2148-7-2.
- MAGALHÃES, R. A. *et al.* Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 228–233, 1986. DOI: 10.1590/S0036-46651986000400004.
- MANSUR, A. de P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 99, n. 2, p. 755–761, 2012. DOI: 10.1590/S0066-782X2012005000061.
- MARIAN, A. J. Genetic determinants of cardiac hypertrophy. **Current opinion in cardiology**, v. 23, n. 3, p. 199–205, 2008. DOI: 10.1097/HCO.0b013e3282fc27d9.
- MARINOVIC, M. P. *et al.* Crotamine induces browning of adipose tissue and increases energy expenditure in mice. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 5057, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-22988-1.
- MARTINS, A. M. *et al.* Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1165–1171, 2002. DOI: 10.1016/S0041-0101(02)00119-8.
- MAY, C. *et al.* Instruments and Methods in Proteomics. *In: Data mining in proteomics*. Springer, 2011. p. 3–26. DOI: 10.1007/978-1-60761-987-1_1.
- MEBS, D. Snake venom composition and evolution of Viperidae. **Kaupia**, v. 8, p. 145–148, 1999.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. *In: CARDOSO, J. L. C. et al.. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 42–69.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes**

por animais peçonhentos. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2001. 112p.(Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <https://www.iciet.fiocruz.br/sites/www.iciet.fiocruz.br/files/Manual-de-Diagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf>. Acesso em 9 set. 2020.

MONTONI, F. *et al.* The impact of rattlesnake venom on mice cerebellum proteomics points to synaptic inhibition and tissue damage. **Journal of proteomics**, v. 221, p. 103779, 2020. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103779.

NGUYEN, S.; FENN, J. B. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 104, n. 4, p. 1111–1117, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0609969104.

NICOLAU, C. A. *et al.* An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 214–231, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.06.029.

NIIMURA, H. *et al.* Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. **Circulation**, v. 105, n. 4, p. 446–51, 2002. DOI: 10.1161/hc0402.102990.

NISHI, M. *et al.* P1683MURC/Cavin-4 deletion protects murine heart from ischemia-reperfusion injury. **European Heart Journal**, v. 39, n. suppl_1, 2018. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy565.P1683.

NISHI, M. *et al.* Systems network genomic analysis reveals cardioprotective effect of MURC/Cavin-4 deletion against ischemia/reperfusion injury. **Journal of the american heart association**, v. 8, n. 15, p. e012047, 2019. DOI: 10.1161/JAHA.119.012047.

NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M.; BARROS, G. C. Acidente crotálico em animais domésticos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 31, p. 47–56, 2004. Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/revista-cfmv-edicao-31-2004/comunicacao/revista-cfmv/2018/10/30/>.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363–370, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.06.009.

OHMAN, E. M. *et al.* Early detection of acute myocardial infarction: additional diagnostic information from serum concentrations of myoglobin in patients without ST elevation. **British heart journal**, v. 63, n. 6, p. 335–8, 1990. DOI: 10.1136/hrt.63.6.335.

OLICHON, A. *et al.* Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. **The journal of biological chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7743–6, 2003. DOI: 10.1074/jbc.C200677200.

OLIVEIRA, I. S. de *et al.* Global proteomic and functional analysis of *Crotalus*

durissus collilineatus individual venom variation and its impact on envenoming. **Journal of proteomics**, v. 191, p. 153–165, 2019. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.02.020.

OSIO, A. *et al.* Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. **Circulation research**, v. 100, n. 6, p. 766–8, 2007. DOI: 10.1161/01.RES.0000263008.66799.aa.

PAOLA, F. de; ROSSI, M. A. Myocardial damage induced by tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom in rats. **Cardiovascular pathology**, v. 2, n. 1, p. 77–81, 1993. DOI: 10.1016/1054-8807(93)90016-U.

PARIKH, S. V.; LEMOS, J. A de. Biomarkers in cardiovascular disease: integrating pathophysiology into clinical practice. **The american journal of the medical sciences**, v. 332, n. 4, p. 186–97, 2006. DOI: 10.1097/00000441-200610000-00006.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001. DOI: 10.1590/S0104-42302001000100026.

PINTO, A. R. *et al.* Revisiting cardiac cellular composition. **Circulation research**, v. 118, n. 3, p. 400–9, 2016. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307778.

PRADO-FRANCESCHI, J.; BRAZIL, O. V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 875–887, 1981. DOI: 10.1016/0041-0101(81)90085-4.

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**, v. 58, n. 2, p. 329–342, 2011. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.11.006.

RÁDIS-BAPTISTA, G. *et al.* Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 37, n. 7, p. 973–84, 1999. DOI: 10.1016/s0041-0101(98)00226-8.

REEKS, T. *et al.* Deep venomomics of the *Pseudonaja* genus reveals inter- and intra-specific variation. **Journal of proteomics**, v. 133, p. 20–32, 2016. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.11.019.

SANTOS, I. G. C. dos; FORTES-DIAS, C. L.; SANTOS, M. C. dos. Pharmacological applications of Brazilian snake venoms with emphasis in *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus ruruima*. **Scientia amazonia**, v. 6, n. 1, p. 42–53, 2017. Disponível em: <http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2016/10/v6-n1-42-53-2017.pdf>. Acesso em: 17 mai 2021.

SANTOS, P. E. B. *et al.* Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. **Toxicon**, v. 28, n. 2, p. 215–224, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90415-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90415-4).

SANTOS, Wellington da Silva *et al.* Proteomic analysis reveals rattlesnake venom modulation of proteins associated with mitochondrial, hypertrophic and dilated cardiomyopathy in mouse hearts. **Journal of proteomics**. No prelo

SERRANO, S. M. T. *et al.* A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501–10, 2005. DOI: 10.1002/pmic.200400931.

SHEIKH, F.; LYON, R. C.; CHEN, J. Functions of myosin light chain-2 (MYL2) in cardiac muscle and disease. **Gene**, v. 569, n. 1, p. 14–20, 2015. DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.027.

SILVA JÚNIOR, N. J.; BUCARETCHI, F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. *In*: CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 116–124.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia cardiovascular. *In*: **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7. ed. São Paulo: Artmed LTDA., 2017. p. 435–476.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação: acidente por animais peçonhentos. DATASUS. Atualizado em: jan. 2020. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 8 set. 2020.

SIQUEIRA, J. E. de *et al.* [Myocardial lesions after snake bites by the *Crotalus durissus terrificus* species (rattlesnake). A case report]. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 54, n. 5, p. 323–5, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2288520>. Acesso em: 4 abr. 2020.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Two active proteins from rattlesnake venom. **Nature**, v. 142, n. 3587, p. 213–213, 1938. DOI: 10.1038/142213a0.

STANLEY, B. A. *et al.* Heart disease, clinical proteomics and mass spectrometry. **Disease markers**, v. 20, n. 3, p. 167–178, 2004. DOI: 10.1155/2004/965261.

STÖRK, T. V. *et al.* Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome. North-Württemberg Infarction Study (NOWIS) Group. **The american journal of cardiology**, v. 86, n. 12, p. 1371–4, A5, 2000. DOI: 10.1016/s0002-9149(00)01246-7.

TALMAN, V.; KIVELÄ, R. Cardiomyocyte—endothelial cell Interactions in cardiac remodeling and regeneration. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 5, p. 101, 2018. DOI: 10.3389/fcvm.2018.00101.

TANJONI, I. *et al.* Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851–61, 2005. DOI: 10.1007/s10495-005-2945-1.

THOMAZINI, I. A.; BARRAVIERA, B. Alterações hematológicas nos acidentes por animais peçonhentos. *In*: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, p. 81–96, 1994.

TOKARNIA, C. H. *et al.*. Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops spp.* em animais de produção. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 34, n. 4, p. 301–312, 2014. DOI: 10.1590/S0100-736X2014000400001.

UETZ, P. *et al.* **The Reptile Database**. 2020. Disponível em: <http://reptile-database.reptarium.cz/>. Acesso em: 15 abr. 2020.

UNDERWOOD, G. **A contribution to the classification of snakes**. London: British Museum (Natural History), 1967. 179 p.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 1, p. 1–18, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.07.007.

REMMEN, H. V. *et al.* Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 281, n. 3, p. H1422-32, 2001. DOI: 10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1422.

VANZOLINI, P. E.; COSTA, A. M. M. R.; VITT, L. J. **Répteis das caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1980, 161p.

WALTHER, T. C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **The journal of cell biology**, v. 190, n. 4, p. 491–500, 2010. DOI: 10.1083/jcb.201004052.

WANG, Y.; FRANZEN, J.; WANCZEK, K. P. The non-linear resonance ion trap. Part 2. A general theoretical analysis. **International journal of mass spectrometry and ion processes**, v. 124, n. 2, p. 125–144, 1993. DOI: 10.1016/0168-1176(93)80004-X.

WARRELL, D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. *In*: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: Cornell University Press, 2004. p. 709–761.

WEI, B.; JIN, J. P. TNNT1, TNNT2, and TNNT3: Isoform genes, regulation, and structure-function relationships. **Gene**, v. 582, n. 1, p. 1–13, 2016. DOI: 10.1016/j.gene.2016.01.006.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951–67, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.030.

WHO - World Health Organization. **Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control**. Geneva: WHO Document Production Services, 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324838/9789241515641-eng.pdf>. Acesso em: 5 set. 2020.

WILLEMSE, G. T. Individual variation in snake venom. **Comparative biochemistry and physiology part B: comparative Biochemistry**, v. 61, n. 4, p. 553–557, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(78\)90049-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(78)90049-4).

WINKLER, E. *et al.* Decreased serum cholesterol level after snake bite (*Vipera palaestinae*) as a marker of severity of envenomation. **The journal of laboratory and clinical medicine**, v. 121, n. 6, p. 774–8, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8505588>. Acesso em: 6 mai. 2021.

WOLLBERG, Z. *et al.* A novel cardiotoxic polypeptide from the venom of *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp): cardiac effects in mice and isolated rat and human heart preparations. **Toxicon**, v. 26, n. 6, p. 525–34, 1988. DOI: 10.1016/0041-0101(88)90232-2.

WOLZ-RICHTER, S.; ESSER, K. H.; HESS, A. Antinociceptive activity of crotoxin in the central nervous system: A functional Magnetic Resonance Imaging study. **Toxicon**, v. 74, p. 44–55, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.07.019.

ZALUZEC, E. J.; GAGE, D. A.; WATSON, J. T. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. **Protein expression and purification**, v. 6, n. 2, p. 109–23, 1995. DOI: 10.1006/prev.1995.1014.

ZHANG, Y. *et al.* Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 2013. DOI: 10.1021/cr3003533.

APÊNDICE

MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO CIENTÍFICO

Journal of Proteomics

Proteomic analysis reveals rattlesnake venom modulation of proteins associated with mitochondrial, hypertrophic and dilated cardiomyopathy in mouse hearts
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	VSI: ICAP 2021
Section/Category:	Original Article
Keywords:	Crotalus durissus terrificus; snake venom; mass spectrometrybased proteomics; mouse heart; cardiotoxicity; envenomation
Corresponding Author:	Leo Kei Iwai, PhD Butantan Institute: Instituto Butantan Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL
First Author:	Wellington da Silva Santos
Order of Authors:	Wellington da Silva Santos
	Fabio Montoni
	Rosangela Aparecida dos Santos Eichler
	Stephanie Santos Suehiro Arcos
	Diana Zukas Andreotti
	Carolina Yukiko Kisaki
	Hamida Macêdo Calacina
	Ismael Feitosa Lima
	Magna Aparecida Maltauro Soares
	Valdemir Melechco Carvalho
	Emer Suavinho Ferro
	Milton Yutaka Nishiyama-Jr
	Zhibin Chen
	Leo Kei Iwai, PhD

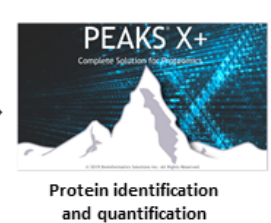
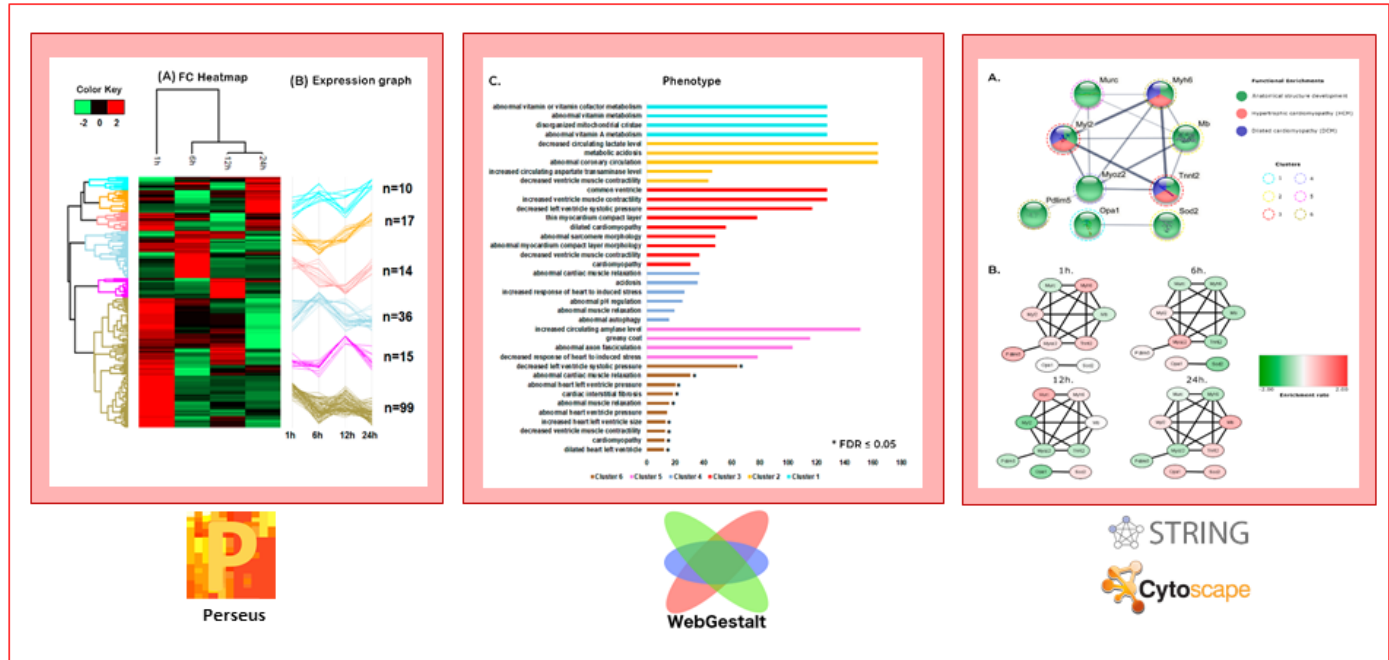
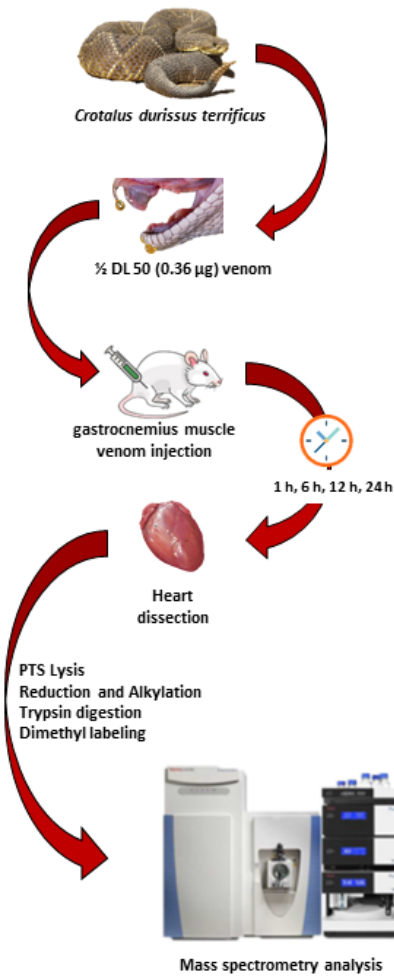
Abstract:	<p>Envenomation through snakebite is a neglected disease affecting thousands of people worldwide every year. Snake venoms are complex and trigger a diversity of effects that may lead to death. In Brazil, the rattlesnake <i>Crotalus durissus terrificus</i> snakebite is the most lethal. Its venom is neurotoxic, myotoxic, nephrotoxic, and cardiotoxic being responsible for several health problems for the individual affected. In this study, we evaluated the proteomic characterization of the cardiotoxic effects of <i>C. d. terrificus</i> venom in mouse models after the inoculation of 0.5 LD50 of the venom in mice. After 1 h, 6 h, 12 h and 24 h, the heart was removed, chemically modified and trypsin-digested before submitting to high-resolution mass spectrometry analysis. We analyzed the proteomic profile of >1300 proteins and observed that several proteins showed changes in the quantitative profile over time after venom treatment, reflecting the toxic effects of the venom in the mouse heart, which may have triggered disturbances in the physiology of the heart. The toxic effect of the venom affected several proteins associated with mitochondrial, hypertrophic, and dilated cardiomyopathy. The protein abundance changes suggest how these proteins might work synergistically upon envenomation in the heart tissue, through distinct immunological and biochemical effects.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Juan J Calvete Instituto de Biomedicina de Valencia jcalvete@ibv.csic.es Prof Calvete is one of the leading researcher in the world that studies various aspects</p>
	<p>of snake envenomation</p> <p>Bryan G. Fry The University of Queensland bgfry@uq.edu.au Prof Fry is one of the leading scientists studying venom and venom systems of venomous snakes including the <i>Crotalus durissus</i> rattle snake, which is the theme of this work</p> <p>Aleksandra Nita-Lazar National Institute of Health nitalazarau@niaid.nih.gov Prof Nita-Lazar is a leading scientist studying functional cellular networks using mass spectrometry-generated proteomics data. Her field of expertise includes the analysis of the effects of several types of cellular perturbation and systems.</p>

Significance

Proteomic analysis reveals rattlesnake venom modulation of proteins associated with mitochondrial, hypertrophic and dilated cardiomyopathy in mouse hearts

Crotalus durissus terrificus rattlesnake venom is known to be neurotoxic, myotoxic, nephrotoxic and cardiotoxic. Although there are several works describing the biochemical effect of the venom, no work have described the proteomic profile of the *C. d. terrificus* venom effect in the heart of mice. In this work, we describe the proteomic profile change of several mouse cardiac proteins upon venom treatment. This data shed new light on the clinical outcome of the envenomation by the *C. d. terrificus* snakebite as well as proteins identified may be used to incorporate and improve current treatment approaches and designing novel therapeutic interventions in order to reduce mortality and morbidity.

Graphical Abstract



Modulation of components related to changes in cardiac ventricles, immune response, and mitochondrial activity and proteins related to hypertrophic and dilated cardiomyopathies

Highlights

- *C. d. terrificus* rattlesnake venom treatment of mice showed changes in cardiac protein profile
- *C. d. terrificus* venom modulated proteins involved in biological and cellular process, molecular function, and phenotypic profile
- *C. d. terrificus* venom modulated GO categories related to cardiac ventricles, immuneresponse, and mitochondrial activity
- Network analysis showed disturbances of proteins related to hypertrophic and dilated cardiomyopathy

Proteomic analysis reveals rattlesnake venom modulation of proteins associated with mitochondrial, hypertrophic and dilated cardiomyopathy in mouse hearts

Wellington da Silva Santos¹, Fabio Montoni¹, Rosangela Aparecida dos Santos Eichler², Stephanie Santos Suehiro Arcos¹, Diana Zukas Andreotti², Carolina Yukiko Kasaki¹, Hamida Macêdo Calacina¹, Ismael Feitosa Lima¹, Magna Aparecida Maltauro Soares³, Valdemir Melechco Carvalho⁴, Emer Suavinho Ferro², Milton Yutaka Nishiyama-Jr¹, Zhibin Chen⁵, Leo Kei Iwai^{1*}

1. Laboratory of Applied Toxinology (LETA) and Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, São Paulo, 05503-900, Brazil

2. Department of Pharmacology, Biomedical Sciences Institute (ICB), University of São Paulo (USP), São Paulo, 05508-000, Brazil

3. Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, Av. Vital Brazil, 1500, São Paulo 05503-900, SP, Brazil

4. Grupo Fleury, Av. João Pedro Cardoso, 158, São Paulo 04355-000, SP, Brazil

5. Department of Microbiology and Immunology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33136, USA.

Running Title: Snake venom effect in mouse heart proteomics

***Corresponding author**

Dr Leo K. Iwai, Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP, 05503-900, Brazil

Phone: +55-11-2627-9731

E-mail: leo.iwai@butantan.gov.br

Abstract

Envenomation through snakebite is a neglected disease that affects thousands of people worldwide every year. Snake venoms are complex and trigger a diversity of effects in the affected person which can lead to amputation of the members and even death. In Brazil, the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. terrificus*) causes the second highest cases of snakebite accident and it is the most lethal. Its venom is known to be neurotoxic, myotoxic, nephrotoxic, and cardiotoxic being responsible for several health problems for the individual affected. In this study, we focused on the evaluation of the proteomic characterization of the cardiotoxic effects of *C. d. terrificus* venom in mouse models, after the inoculation of 0.5 LD₅₀ of the venom in the gastrocnemius muscle. After 1 h, 6 h, 12 h and 24 h, the heart was removed, chemically modified and trypsin-digested before submitting to high-resolution mass spectrometry analysis. We analyzed the proteomic profile of >1300 proteins and observed that several proteins showed changes in the quantitative profile over time after venom treatment, reflecting the toxic effects of the venom in the mouse heart, which may have triggered disturbances in the physiology of the heart. The toxic effect of the venom affected several proteins associated with mitochondrial, hypertrophic, and dilated cardiomyopathy. The protein abundance changes suggest how these proteins might work synergistically upon envenomation in the heart tissue, through distinct immunological and biochemical effects.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*; snake venom; mass spectrometry-based proteomics; mouse heart; cardiotoxicity; envenomation

1 Introduction

Venomous snakebites are a serious worldwide health problem, due to snakes' innate ability to cause serious wounds to its prey and humans, who share the same environment with them [1]. According to the WHO, accidents caused by venomous snakes are classified as a neglected tropical disease, causing negative impacts on public health in emerging and developing countries. Every year, about 2.7 million individuals are bitten by venomous snakes around the world, where about 490,000 amputations and up to 138,000 deaths have been reported every year, in addition to other serious health problems arising from the snakebite accident [2].

In Brazil, there are mainly four genera of venomous snakes: *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* (Viperidae family) and the *Micrurus* (Elapidae family) [3]. According to the epidemiological data obtained by the Notifiable Diseases Information System (SINAN) of the Health Surveillance Secretariat of the Brazilian Ministry of Health in the period from 2015 to 2020, the *Crotalus* genus recorded 11,825 accidents and 108 deaths. It was the most lethal when compared to the other venomous snake genera in Brazil [4] and the second largest genus of venomous snakes responsible for this type of accident in Brazil [5].

The understanding of the animal toxins effect is of great importance to assess the clinical outcome of envenomation, improve the production of antivenom serums, and identify possible molecules with therapeutic potential [6].

Crotalus venom is composed of five major components: crotoxin, crotapotin, crotamine, gyroxin, and convulxin. Crotoxin [7] is a neurotoxin that makes up to about 65% of the dry weight of the venom [8], being responsible for clinical observed neurotoxicity [9,10]. Crotapotin is the acidic subunit of crotoxin, that works as a chaperone to potentiate the action of PLA2 [11,12]. Crotamine activity is related to myotoxicity. Together with crotoxin, they are capable of producing lesions in the skeletal muscle tissue in a systemic way [13,14]. Gyroxin causes severe loss of balance, causing the victim to constantly rotate on their own axis [15,16]. Convulxin can cause seizures and breathing disorders [17]. Lastly, coagulation disorders, hemolytic action, nephrotoxicity [18,19] and cardiotoxicity have also been observed in some studies [20-23].

Some studies have described proteomic, transcriptomic, immunological, and biochemical analysis to study the composition and the effect of individual toxins

present in different types of snakes [24-27]. However, few works have described the effects of envenomation at the proteomic molecular level in cells [28,29], tissues or isolated organs [30].

Heart is responsible for pumping blood throughout the body, becoming the target of studies related to the development of cardiovascular diseases, that arise from multifactorial causes [31,32]. In addition, some of the heart diseases can be caused by toxicity in the heart due to the action of chemical agents, heavy metals, pharmaceutical products, biotoxins [33], including cardiotoxins from some snakes [34]. Molecular analysis of the heart is one of the way to study heart disease in search for cardiac biomarkers that can help treat these diseases [35]. Mass spectrometry-based technologies can be used to describe the proteomic behavior and conditions in these diseases and thus identify and characterize the cardiotoxic effects of drugs and toxins [36].

Thus, in this work we used the proteomic approach to study the effect of the *C. d. terrificus* venom on the cardiac tissue of the Swiss strain of mouse at different time points after the envenomation, in order to better characterize the mechanisms of action and molecular targets of the venom.

2 Experimental section

2.1 *Crotalus durissus terrificus* venom

C. d. terrificus venom was extracted and lyophilized at the herpetology department of Butantan Institute and supplied by the Strategic Nucleus of Venom and Anti-Venom (NEVAS). The venom used was a pool from 256 snakes collected in the states of São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, and Paraná. The LD50 of this lot of venom (01/14-2) was determined in the herpetology department by Dr Karen de Moraes Zani and Dr Anita Mitico Tanaka Azevedo being equal to 0.71 µg/ animal. The venom was diluted with 0.9% NaCl to a concentration of 1.0 mg/ mL, aliquoted, and stored at -80° C until use.

2.2 Animals

We used 64 adult Swiss male mice weighing between 18 and 22 g. These animals were provided by the Central Animal Facility of the Butantan Institute and were

approved for experimental use by the Animal Use Ethics Committee of the Butantan Institute under the certification CEUAIB: 2283181019 (2019).

The animals destined for proteomic analysis ($n = 40$) were placed in polycarbonate boxes coated with a Millipore filter, containing five mice in each box. For histological analysis ($n = 24$), three animals were placed in each box. Mice were kept at room temperature of 22 °C and constant humidity, positive pressure, 12-hour light/dark cycle, and free access to water and food. The methodology applied in this study followed the norms of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and all associated legislation.

2.3 Treatment of mice with *C. d. terrificus*

An amount of 0.355 µg of the venom was diluted in 50 µL of saline solution (0.9% NaCl) and injected into the gastrocnemius muscle of mice for 1 h, 6 h, 12 h, and 24 h in quintuplicate for mass spectrometry analysis and in triplicate for histological analysis. As a negative control of the experiment, only the vehicle (saline) was injected in mice for the same time as mice treated with venom.

2.4 Sample processing for histology

After treatment, animals were anesthetized with isoflurane and hearts were immediately placed in a solution of cadmium chloride (100 mM) for 30 seconds, then fixed in 4% PFA (pH 6.9) for 24 hours and stored in 70% ethanol. Paraffin blocks were assembled and cut at 30 µm thickness and stained with hematoxylin-eosin for microscopy analysis. Cardiac tissue slides were H&E stained according to the protocol by Fischer et al. (2008) [37] and analyzed using objectives of 4 x, 10 x, 25 x, and 40 x magnification in a upright Olympus microscope (Shinjuku City, Tokyo, Japan).

2.5 Sample processing for mass spectrometry analysis

After the heart dissection and washing with saline solution to remove excess blood, samples were weighed and immediately frozen in liquid nitrogen until further processing. The hearts were lysed with PTS lysis buffer as previously described [38] supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Halt, Thermo Fisher Scientific, IL, USA). Lysis was performed using a rate of 6 x the volume to heart weight

on ice as previously described (Montoni et al., 2020) [30]. Immediately after, hearts were homogenized using Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) at 6800 g for 30 seconds. After that, samples were heated at 95 °C for 5 minutes and sonicated on ice for 20 minutes, followed by centrifugation at 14,000 g at 4 °C for 30 min. The supernatant of the samples was collected and stored in a freezer at -80°C until use. Protein concentration was determined by Pierce BCA method and 10 µg from all samples were run in a 10% SDS-PAGE to evaluate total extract. The digestion was carried out with trypsin (Sigma-Aldrich, MO, USA) at 1:50 ratio using a modified FASP protocol, originally described by Wiśniewski et al. [39]. Briefly, 200 µg of proteins from the total extract were reduced with 0.02 mM dithiothreitol (DTT) at room temperature and then alkylated with 0.05 mM iodoacetamide on the Microcon YM-10 MWCO 10 KDa filter (Merck Millipore Ltd., County Cork, Ireland) at room temperature and protected from light. The pH of each sample was checked and, if necessary, adjusted to pH 8.0 with 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH. Further incubation was done at 37 °C for 18 hours and interrupted with the addition of 2 µL of 10% TFA. Tryptic peptides were labeled through dimethylation, performed by incubating the peptide extract with 20 µL of the light label mixture for the control condition (500 µL of 50 mM TEAB, 2.8 µL of 37% CH₂O and 25 µL of 0.6 NaBH₃CN) and 20 µL of the heavy marker mixture for samples treated with venom (500 µL of 50 mM TEAB, 5 µL of 20% ¹³CD₂O, 25 µL of 0.6 M NaBD₃CN) for 2 hours at room temperature. The reaction was stopped with 5 µL of 1% ammonia and incubated for 30 min at 35 °C. The extracts treated with saline and venom were combined in a 1:1 ratio. Desalting was carried out following the method described by Rappsilber et al. 2007 [40] with some modifications. Briefly, 30 µg of tryptic peptides were desalted on Stage-Tips on 200 µL pipettor tips with three layers of SDB-XC membrane (styrene-divinylbenzene, Empore, 3M, Royersford, PA, USA). The membranes were initially conditioned with 100% methanol, washed with solution A (5% acetonitrile, 0.1% TFA), loaded with samples, and subsequently washed with solution A. The peptides retained on the membranes were eluted three times with 20 µL of solution B composed of 80% acetonitrile, 0.1% TFA and combined. Before proceeding to mass spectrometry analysis, all tryptic peptides were analyzed on an SDS-PAGE stained with silver nitrate in order to verify the digestion quality.

2.6 Mass spectrometry-based proteomic analysis

Light and heavy dimethylated tryptic peptide samples were analyzed on the Q-Exactive HF quadrupole hybrid mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) coupled to a nano LC UltiMate 3000 system (Thermo Scientific) using the shotgun/bottom-up approach in positive ion mode. One microgram of peptides from each sample was injected at a gradient of 5 to 50% solvent B (90% acetonitrile, 0.1% TFA) in 60 min at a flow rate of 200 nL/min. The electrospray source was operated at 2.2kV, and the peptide mixture was analyzed by acquiring full scan mode spectra with a resolution of 120,000 for the determination of MS1 with a maximum injection time of 60ms in the range of 375 to 1500 m/z. The dependent data acquisition (DDA) was carried out by automatically selecting the 20 most intense peaks for the subsequent acquisition of product ion spectra with MS/MS (MS2) with a resolution of 15,000 with a maximum injection time of 40 ms over a range of 200 to 2,000 m/z with a dynamic exclusion of 15 seconds.

2.7 Data processing and statistical methods

Raw data files were analyzed using PEAKS Studio version X plus software (Bioinformatics Solutions Inc, Toronto, Canada) using denovo sequencing tools and Search DB for the classic search of sequences against the *Mus musculus* databank, downloaded from UniProtKB/ Swiss-Prot in July 2020. The parameters used were: carbamidomethylation of cysteine as fixed modification; methionine oxidation and deamination of Asparagine and Glutamine as variable modifications with mass error tolerance ± 10 ppm for MS and ± 0.02 Da for MS/ MS. Trypsin was selected as the enzyme used in protein digestion and two lost cleavages per peptide and up to three post-translational modifications were allowed. Protein decoy was enabled and false discovery rate (FDR) using the Benjamini-Hochberg method was set to 0.1% and the ALC (average local confidence) was set to 80%. The maximum allowable retention time window was 3 minutes. Protein quantification was performed by the dimethylation labeled as light (+28 Da) for control and heavy (+36 Da) for venom treated samples [41]. The identification of protein groups, normalization of the ion spectra areas, and determination of the significance of the protein groups were performed using the algorithm present in the PEAKS X plus software. The protein identification comparison was analyzed using an online available Venn diagrams generator

(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). The unique proteins of each time point of the venom treated mice were initially obtained through a screening analysis, in which only proteins present in each of the venom treated-condition (exclusive proteins) were analyzed. Data from all time points were analyzed through the functional enrichment analysis available in the Webgestalt tool (<http://www.webgestalt.org/>) described by Wang et al. (2017) [42]. Overrepresentation Enrichment Analysis (ORA) was created for the GO of biological process, cellular component, and molecular function. The FDR was set to 0.05 using the Benjamini Rochberg method, which was used in the statistical tests to determine the enrichment when comparing among all tested time points.

Semi-quantitative analysis values from the raw data table generated by the PEAKS X plus software were filtered according to the minimum occurrence of at least three of the five valid values of the normalized ratio in each experimental condition. Afterwards, the data was transformed using log₂ and z-scored using Perseus software version 1.6.5.0 [43] and submitted to a hierarchical grouping based on the Euclidean distance. Clusters were analyzed performing an ORA analysis for Mammalian phenotype ontology in order to verify the behavior of the proteins grouped in each cluster. Also, the same protein set was analyzed using STRING [44], keeping only proteins that were involved on cardiomyopathy and formed a protein-protein interaction (PPI) network. The network was uploaded to Cytoscape [45,46] to generate a pathway overview. The principal component analysis (PCA) used the normalized protein quantification values to find which linear combinations would explain most of the variability of the differentially expressed proteins for the different assays. The PCA studies were performed using the R-statistics FactoMineR [47] and Factoextra (<http://www.sthda.com/english/rpkgs/factoextra>) for graphical visualization.

All raw data were uploaded and stored at the Center for Computational Mass Spectrometry of the University of California, San Diego, Massive website (<https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/jobs.jsp>) with the following ID=97fd62e68c964a198b1e1e72d46fb932.

3 Results

3.1 Exclusively identified proteins of venom treatment

Hearts were dissected, lysed and total protein was quantified showing an average amount between 5.72 and 8.18 mg (Supplemental Table 1). Each sample was lysed using PTS buffer, chemically modified, and digested with trypsin. Mass spectrometry analysis of trypsin digested heart samples treated with either saline or *C. d. terrificus* venom at 1 h, 6 h, 12 h, and 24 h allowed us to identify 20,146 spectra corresponding to 9,767 peptides, which corresponds to 1,341 distinctive proteins (Supplemental Table 2). In order to elect proteins exclusively present in venom condition, we compared control vs. venom treated conditions from each time point. At each time point we identified 1047 (1 h), 747 (6 h), 860 (12 h), and 1027 (24 h) proteins from both saline and venom treatments (Supplemental Figure 1A and Supplemental Table 3). Moreover, 73 (1 h), 5 (6 h), 11 (12 h) and 40 (24 h) proteins were identified exclusively in hearts treated with *C. d. terrificus* venom when analyzing each time point individually (Supplemental Figure 1A and Supplemental Table 3). Functional enrichment analysis of differentially abundant proteins at each time point revealed that after 1 h of venom treatment, the biological processes of "cell adhesion mediator activity" and "mitochondrial gene expression" showed respectively the highest and the lowest enrichment rates (Supplemental Figure 1B). After 6 h time venom treatment, the heart proteome scenario changed regarding differential protein abundance, showing the processes of "deaminase activity" and "foam cell differentiation" with the highest enrichment rate and "platelet-derived growth factor receptor signaling pathway" presenting the lowest enrichment rate (Supplemental Figure 1C). At the 12 h venom-treatment time, the GO category "peroxisome organization" showed an FDR ≤ 0.05 with the highest enrichment rate, while the "somatic diversification of immune receptors" showed the lowest enrichment rate (Supplemental Figure 1D). At 24 h venom treatment "retromer complex" GO function presented the highest enrichment rate, while "signal transduction in response to DNA damage" showed the lowest enrichment rate (Supplemental Figure 1E).

The analysis of the proteins identified in the venom treated conditions at all time points allowed us to identify 676 proteins from which 62 (1 h), 8 (6 h), 10 (12 h), and 29 (24 h) proteins were identified exclusively at each time points (Figure 1A and Supplemental Table 4). Functional enrichment classification analysis using Webgestalt

tool allowed us to profile these exclusive proteins based on the biological process (Figure 1B), cellular component (Figure 1C), and molecular function (Figure 1D) at each time point.

[Figure 1]

As for biological process, 36 GO categories were identified and enriched. Many of which were unique to a certain time point, however “spindle localization” was enriched after 6 h and 24 h of venom treatment. In addition, at 12 hours after venom treatment, “peroxisome organization” was the GO category with the highest enrichment rate with $FDR \leq 0.05$ (Figure 1B).

Cellular component analysis showed 26 enriched GO categories, where “endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment”, “Sm-like protein family complex”, and “extracellular organelle” showed an enrichment with $FDR \leq 0.05$ within 1 h venom treatment. At 6 h treatment with venom, “neuromuscular junction” and “cell division site” also showed an enrichment with $FDR \leq 0.05$. At the 24 h venom treatment, the “retromeric complex” GO category presented the highest enrichment rate when compared to the other GO categories at the same time with $FDR \leq 0.05$. Furthermore, the GO category “polysome” appeared with significant enrichment rates after 6 h, 12 h and 24 h venom treatment while “NADH dehydrogenase complex” and “COP9 signalosome” were enriched at 1 h and 6 h venom treatment (Figure 1C).

Amongst the 28 GO categories enriched and identified in the molecular function analysis, the “ADP binding” was the only category presenting an enrichment rate with $FDR \leq 0.05$ at 6 h venom treatment. However, the “AU-rich element binding” were also enriched at 1 h and 24 h after venom treatment. In addition, the “hijacked molecular function” was observed at 12 h venom treatment with the highest enrichment rate when compared to the other GO categories (Figure 1D).

3.2 Semi quantitative analysis

Quantitative mass spectrometry analysis of samples allowed us to identify 1108 proteins (Supplemental Table 5). Quantitative enrichment analysis was performed using gene set enrichment analysis (GSEA) supported by Webgestalt tool. Within 1 h after treatment, the venom treated group showed the enrichment of several GO

categories including “abnormal cholesterol homeostasis”, “abnormal cholesterol level”, “abnormal nervous system physiology”, and “abnormal cell differentiation” and a decrease in “abnormal motor neuron morphology” and “abnormal heart ventricle pressure” categories (Figure 2A). At 6 h treatment, the venom treated group showed enrichment for “abnormal sensitivity to induced morbidity/mortality”, “abnormal induced morbidity/mortality”, “abnormal heart left ventricle morphology”, “abnormal muscle morphology”, and “abnormal leukocyte cell number”. On the other hand, we observed a decrease in enrichment for “abnormal artery morphology”, “decrease total body fat amount” and “abnormal circulating protein level” (Figure 2B). Differentiated enrichment at 12 h after venom treatment was also observed showing an increase in enrichment for the GO categories related to “abnormal fibroblast physiology”, “abnormal developmental patterning”, “decreased fibroblast proliferation”, and “digestive/alimentary phenotype”. On the other hand, we observed a decrease in the enrichment of "irregular heartbeat", "decrease circulating cholesterol level", "abnormal mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport", "abnormal heart right ventricle size", and "increase heart right ventricle size" (Figure 2C). For the 24 h after venom treatment, we highlight the increase in "abnormal heart development", "dilated heart", "abnormal heart left ventricle morphology", "abnormal cardiac muscle tissue morphology", “increased heart rate”, “small heart”, “abnormal heart layer morphology”, and “abnormal myocardium layer morphology”. Moreover, we highlight the decrease in "abnormal white adipose tissue amount", "abnormal circulating free fatty acids level", "increase total tissue mass", "increase body weight", "abnormal circulating enzyme level", and “abnormal food intake” (Figure 2D).

[Figure 2]

The analysis of the relative abundance change along with the time within each time point, allowed us to identify 191 proteins, when considering all time points in both the control and venom-treated samples (Supplemental Table 6). The clustering analysis of these proteins showed the abundance change profile along with the time upon venom treatment compared to the control. Hierarchical clustering analysis clustered proteins along the envenomation process in six clusters (Figure 3A). Based on these results, we performed an Overrepresentation Enrichment Analysis (ORA) for phenotype (Mammalian Phenotype Ontology) using the Webgestalt tool for each cluster (Figure 3C).

The expression plot shown in cluster 1 shows an increase in the relative abundance of proteins at 6 h and 24 h and a decrease in abundance at 1 h and 12 h after venom treatment (Figure 3B). Enrichment analysis for phenotype of this set of proteins showed an increase of four GO categories: “abnormal vitamin or vitamin cofactor metabolism”, “abnormal vitamin metabolism”, “disorganized mitochondrial cristae” and “abnormal vitamin A metabolism” (Figure 3C, shown in light blue). Cluster 2 showed a decrease in the relative abundance of proteins at 6 h and an increase at 1 h, 12 h and 24 h (Figure 3B). The total number of GO categories identified with the highest enrichment rate were: “decreased circulating lactate level”, “metabolic acidosis” and “abnormal coronary circulation” (Figure 3C, shown in orange). The analysis of the relative expression of cluster 3 showed a decrease in the relative abundance of the proteins at 12 h and an increase in the relative abundance at 1 h, 6 h, and 24 h after envenomation (Figure 3B). The enrichment analysis for the phenotype of these proteins were related to phenomena that occur in the heart. Among them, we highlight “common ventricle” and “increased ventricle muscle contractility” with the highest enrichment rate (Figure 3C, shown in red). In cluster 4, we observed an increase in relative abundance of proteins at 6 h and a decrease in abundance at 1 h, 12 h and 24 h after envenomation (Figure 3B). The phenotype enrichment analysis revealed several GO categories from which we highlight “abnormal cardiac muscle relaxation” and “acidosis” with the highest enrichment rates (Figure 3C, shown in dark blue). The relative expression analysis of proteins in cluster 5 grouped proteins that increased in the relative abundance at 12 h and a decrease in this abundance at 1 h, 6 h, and 24 h after envenomation (Figure 3B). Phenotype enrichment analysis identified in this cluster showed four GO categories from which we highlight “decreased response of heart to induced stress”. (Figure 3C, shown in pink). The analysis of the relative expression of proteins in cluster 6 with the highest number of proteins showed proteins decrease abundance from 6 h to 24 h (Figure 3B). Functional enrichment for phenotype showed 10 Go categories which may be related to changes in the heart such as “dilated heart left ventricle”, “cardiomyopathy”, “decreased ventricle muscle contractility”, “increased heart left ventricle size”, “abnormal heart ventricle pressure”, “abnormal muscle relaxation”, “cardiac interstitial fibrosis”, “abnormal heart left ventricle pressure”, “abnormal cardiac muscle relaxation”, “decreased left ventricle systolic pressure” (Figure 3C, shown in brown).

[Figure 3]

3.3 PCA analysis

The PCA was applied to the proteins present in at least two biological replicates for all treatments, and the time points projected into new component space to show the significant differences to each specific time point. The orthogonal projection between the vectors for the 1h and 6h time points raise the specific proteins associated to each time point that could evidence part of the systemic stress response in the heart after the envenomation. We have chosen the first two components (PC1 and PC2) solution as a bona fide signal, explaining 63% of the total proteomics variability carried by the protein expression (Figure 4).

[Figure 4]

At 6h after envenomation, an intermediary time point for the systemic response, there was a negative correlation based on PC2 to the other time points, corroborating to the clustering analysis, being evidenced mainly by the cluster 4 where many proteins increased their abundance at these time points, such as MYOZ2 and NDUS6 that can be related to “increased response of heart to induced stress” and “abnormal cardiac muscle relaxation” (Figure 3C). The 12h and 24h time points presented a positive and higher correlation with PC1 and PC2 components, corroborating to the clustering analysis (Figure 3C), being evidenced by the cluster 2 where many proteins decreased their abundance at these time points, but some increased their abundance including SODM and MYG proteins, both related to “decreased ventricle muscle contractility”. At the 1h after envenomation there was a higher and positive correlation in the PC2 and significantly divergent profile compared to the other time points, which can be explained by a set of exclusive recruited proteins associated to the first response to the envenomation, being evidenced by the clustering analysis (Figure 3C) in particular the cluster 6, which highlights proteins such as PDLI5 and MYH6 related to “dilated heart left ventricle”, “cardiomyopathy” and “abnormal heart left ventricle pressure”.

3.4 Network analysis

In the network analysis (Figure 5), we highlight nine proteins that play important roles in heart tissue forming two clusters. One containing Murc, Myh6, Mb, Tnnt2, Myoz2, Pdim5, and Myl2 and another cluster containing Opa1 and Sod2 (Figure 5A).

All proteins are involved with the heart structure development, from which three proteins: Myh6, Tnnt2 and Myl2 are related to Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and Dilated cardiomyopathy (DCM) (Figure 5A). In general, these proteins showed increase in abundance at 1h, at the 6 h after venom treatment only the protein Myl2 remained upregulated, at the 12 h time point only Myh6 remained upregulated, and at the 24 h both Myl2 and Tnnt2 remained upregulated (Figure 5B).

[Figure 5]

3.5 Histology analysis

Examination by microscopy of H-E stained heart tissue sections did not observe major changes in gross histopathology of the heart during this acute phase of venom challenge. The heart tissues collected at 1 h, 6 h, 12 h and 24 h after venom treatment did not show apparent increase of necrosis or inflammatory infiltration when compared to the control groups. There were signs of blood vasculature leakage in some of animals 12 h or 24 h after venom treatment, but the alteration was subtle and could be detected in only half of the venom treated animals at the 12 h to 24 h time points. No such changes were observed at the 1hr or 6hr time points (Chi Square $p=0.045$, considering the observation of both 12 h and 24 h).

4 Discussion

Characterization of heart proteins upon *C. d. terrificus* venom treatment showed that several proteins changed abundance along with the time after venom treatment.

Functional analysis of the identified proteins based on the GO phenotype analysis showed that the cardiac tissue underwent several abnormalities. After 1h (Figure 2A) of venom treatment, we observed upregulation of proteins related to renal abnormal corpuscle. Kidney disorders upon crotalic accident have already been previously reported where acute kidney injury (AKI) was the most severe complication reported as well as proteinuria, hematuria and renal failure which are the most common manifestations of crotalic snakebites [48-52].

In addition, disorders related to the physiology of the nervous system due to crotoxin activity have shown strong neurotoxic action reaching cardiac tissue, compromising the autonomic cardiac nervous system [53]. Interestingly enough, we have detected enrichment of several GO categories and functions related to lipid

disorders, where were observed abnormal levels of sterols and cholesterols. This data corroborates with the work of Marinovic and coworkers who described that crostamine reduces the levels of low-density cholesterol and triglycerides and increases levels of high-density cholesterol [54]. Regarding downregulated GO categories, we have highlighted the category related to tumorigenicity, which also corroborates previous reported data pointing antitumoral activity of crostamine [55].

Focusing at the 6 h (Figure 2B) time point after venom treatment, which corresponds to the time normally patients seeks medical assistance, it is observed a large increase in GO categories and function related to the individual's mortality, which demonstrates a large level of disturbances that the venom may be causing in the heart and in the organism as a whole. GO categories related to ventricle abnormality were observed as in the earlier time point, but at 6 h post venom treatment we also observed an increase for the left ventricle pressure, which may denote a change in the scenario previously observed, although we cannot explain the exact mechanism for this occurrence. Additionally, abnormality is observed in GO categories related to embryonic development and abnormalities related to the lung. The downregulated GO categories at 6 h time point are mostly related to problems in the physiology of the liver, abnormal voluntary movement, and disturbance in the morphology of brain regions. Interestingly enough, in our previous work we have already reported changes in several proteins, including proteins related to brain morphology in the cerebellum of mouse treated with *C. d. terrificus* venom [30].

At the 12 h time point (Figure 2C), we observed an increase in the GO category related to the abnormal number of granulocytes, which may be indicating an activation of the responses of local immune activity against the action of the venom. In addition, GO categories related to myeloid leukocyte morphology and abnormal morphology of mononuclear phagocytes and granulocytes indicates alterations in these immune system cell types. Cruz et al. (2005) has previously observed that the *C. d. terrificus* interfered in morphological, functional and biochemical alterations in BALB/c mice macrophages [56]. We also observed an increase in enrichment for the GO categories and function related to abnormal fibroblast physiology and decreased fibroblast proliferation. On the other hand, we observed a reduction of GO categories related to arrhythmia, abnormal heart right ventricle size and increased heart right ventricle size, showing an opposite scenario of abnormalities observed at the earlier time points. In addition, we highlight the reduction in the GO category related to reducing the level of

circulating cholesterol, unlike the scenario seen after 1 h post venom treatment. Winkler and colleagues (1993) have shown decreased cholesterol level in patients and rabbits after *Vipera palaestinae* snakebite which negatively correlated with the severity of envenomation [57]. This phenomenon was explained as being probably due to transcapillary lipoprotein leakage and changes in lipoprotein transport and metabolism caused by some of the venom component such as PLA2.

At 24 h (Figure 2D) after *C. d. terrificus* venom treatment, we observed an increase in several GO categories and function denoting damage to the cardiac structure at the cell structure level and heart morphology, indicating a possible damage to the cardiac tissue in mice. These data corroborate previously presented data describing similar phenotypes to those observed in this study, such as damage to both ventricles, presence of infiltrates of defense cells, among others [23]. Regarding downregulated GO categories at the 24 h venom treatment, we observed the reduction of white adipose tissue and the reduction of body mass, which corroborates with the data presented by Morinovic and collaborators [54].

The hierarchical clustering analysis allowed us to observe changes in the protein profile abundance along with the time after *C. d. terrificus* venom treatment (Figure 3 and Supplemental Table 6). Among the identified proteins, we highlight OPA1 (dynamin-like 120 kDa protein) from cluster 1 which is directly related to “disorganized mitochondrial cristae” GO category (Figure 3C). This protein abundance showed a sharp increase at 6 h, a drop at 12 h, and an increase at 24 h, after *C. d. terrificus* venom treatment (Figure 3B). OPA1 is a protein described as one of the proteins that maintain the normal structure and function of mitochondrial crests, and preserves the structure of the inner membrane to protect cells from apoptosis [58]. Thus, a reduction in this protein may lead to cell death and contribute to the progression of heart failure, as described by Chen et al. [59].

SODM (superoxide dismutase) and MYG (myoglobin) in cluster 2 are both related to “decreased ventricle muscle contractility” (Figure 3C). These proteins had decreased abundance at 6 h, and an increasing abundance at 12 h and 24 h after *C. d. terrificus* venom treatment (Figure 3B). Van Remmen et al. [60] have previously shown that SODM may play an important role in inducing the mitochondrial pathway of apoptosis in the heart, arising mainly through the mitochondrial permeability transition. MYG, on the other hand, is a protein that is present in the cytoplasm of skeletal and cardiac muscles, and can be detected in high plasma concentrations as

one of the first biomarkers in the first hours after an acute myocardial infarction [61-63].

MLRV (Myosin Regulatory Light Chain) and TNNT2 (Troponin T2) proteins in cluster 3 both related to “cardiomyopathy”, “decreased ventricle muscle contractility”, “abnormal sarcomere morphology” and “dilated cardiomyopathy” (Figure 3C). These proteins decreased in abundance at 6 h and 12 h, and increased in abundance at 24 h after *C. d. terrificus* venom treatment (Figure 3B). The MLRV protein is encoded by the MYL2 gene and integrates the regions prone to regulation and phosphorylation of the myosin light chains that play an important role in the structure and function of the cardiac muscle [64]. Mutations found in the gene encoding MLRV have been reported to be associated with left ventricular middle chamber hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and a role in the development and progression of chronic heart failure [65-67]. The TNNT2 protein has been described as having a physiological activity in calcium regulation of the actin thin filament function, which ultimately becomes essential for the cardiac muscles contraction [68]. It has also been reported that mutations in the gene encoding TNNT2 could result in dilated cardiomyopathy [69].

MYOZ2 (myozenin 2) in cluster 4 is inserted at the “increased response of heart to induced stress” and the protein NDUS6 (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit S protein) is related to “abnormal cardiac muscle relaxation” GO category (Figure 3C). Their quantitative profile shows that these proteins had their abundance increased at 6 h, decreased at 12 h and remained low until 24 h after venom treatment (Figure 3B). The MYOZ2 protein is related to hypertrophic cardiomyopathy (HCM) due to mutations in its encoding gene [70,71]. The NDUS6 protein may be related to a possible specific cardiomyopathy due to mitochondrial complex I deficiency, which may increase the risk of heart failure and death [72].

The CAVN4 (caveolae-associated protein 4) in cluster 5 is related to “decreased response of heart to induced stress” GO category (Figure 3C). This protein was included in the group whose abundance increased within 12 h and decreased within 24 h after *C. d. terrificus* envenomation (Figure 3B). Mutations in the MURC/Cavin-4 gene of the CAVN4 protein can be observed in individuals with dilated heart disease and a possible gene deletion could reduce ischemic-reperfusion injury in mice [73,74].

PDLI5 (PDZ and LIM domain protein 5) from cluster 6 is inserted in the cluster whose protein abundance decreased at 6 h, 12 h and 24 h after *C. d. terrificus* venom treatment (Figure 3B). MYH6 (myosin-6), on the other hand, showed an increase in

abundance at 1 h and 12 h and a decrease in abundance at 6 h and 24 h after envenomation (Figure 3B). Both PDLI5 and MYH6 are related to “dilated heart left ventricle”, “cardiomyopathy” and “abnormal heart left ventricle pressure” GO categories (Figure 3C). The PDLI5 protein is responsible for maintaining cellular homeostasis when the heart is subjected to biomechanical stress and thus regulates the activity of the cardiac calcium channel, thus preserving cardiac contractility. The loss or reduction of PDLI5 can cause ventricular enlargement, impairment of cardiac contractility, left ventricular systolic dysfunction and reduction in the shortening fraction in response to stress. Furthermore, modifications in the coding gene of PDLIM5 could result in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) or dilated cardiomyopathy (DCM), depending on the route taken during the mutation [75,76]. Mutations in the gene encoding MYH6 may be related to diseases such as hypertrophic cardiomyopathy CMH and dilated CMD [77-79]. In addition, some proteins that we highlighted in this session were also analyzed in the PCA analysis.

Network and PPI analysis of the highlighted proteins revealed that all of the proteins have their distinct role related to the heart function. Myh6, involved in muscle contraction, Tnnt2 that is the tropomyosin-binding subunit of troponin, and Myl2 that have function related to heart development and function (Figure 5A). These proteins have been reported in literature for being involved on cardiomyopathies [64-67,69,77-79]. In this study, these proteins showed an upregulation at 1 h, which might suggest that these proteins are being upregulated as a response to early venom damage (Figure 5B), although we were not able to observe a consistent pattern along the entire process of envenomation.

In general, we verified effects that shed new light on the clinical outcome of the envenomation by the *C. d. terrificus* snakebite. We observed that specific proteins identified at each time point upon *C. d. terrificus* venom treatment were related to classical disorders expected for a crotalic accident, such as kidney damage, nervous system damage, and heart damage. Furthermore, we observed modulation of proteins that may be incorporated in the production of antivenom serums as well as improving treatment approaches or designing novel therapeutic interventions in order to diminishing the debilitation, disabilities, and death caused by snakebite accidents.

5 Conclusion

In this study, we analyzed the proteomic profile of >1300 proteins of mouse heart after 0.5 LD *Crotalus durissus terrificus* venom inoculation into the gastrocnemius muscle at 1 h, 6 h, 12 h, and 24 h time points. We found substantial alterations of proteins related to the heart tissue damage at both early and late stage after venom treatment. The toxicity of venom affects several proteins in the heart that work synergistically through distinct functions in the heart tissue, and thus triggers a variety of immunological and biochemical effects, which initiate cellular component damage at the early time points and eventually lead to the structure damage.

6 Acknowledgements

We thank Dr. Solange MT Serrano, Prof Hugo A. Armelin, Prof Graziella Elisa Ronsein, and Dr Eduardo S Kitano for insightful discussion.

7 Funding

This work was supported by grants 2013/07467-1, 2016/04000-3, and 2017/17943-6 from the São Paulo Research Foundation (FAPESP). ESF was supported by Erna and Jakob Michael “Visiting Professorship”, Department of Biological Regulation, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel and grant 302809/2016-3 from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development, CNPq, Brazil. WSS was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) institutional fellowship #88882.442313/2019-01 (Butantan Institute, Brazil) and WSS was supported by CNPq # 131408/2019-4 for SSSA (University of São Paulo, Brazil). CYK was supported by FAPESP master’s degree program fellowship 2017/06496-9. ZC was supported in part a grant from the National Cancer Institute (NCI) of National Institutes of Health (NIH) R01CA245673.

8 No conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

9 Bibliography

- [1] J.P. Chippaux, Snake-bites: appraisal of the global situation., Bulletin of the World Health Organization. 76 (1998) 515. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9868843>.
- [2] World Health Organization (WHO), Snakebite envenoming, (2017). Available online: <https://www.who.int/snakebites/disease/en/> (accessed August 15, 2019).
- [3] M.M. Azevedo-Marques, P. Cupo, S.E. Hering, ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS: SERPENTES PEÇONHENTAS, Med. (Ribeirao Preto. Online). 36 (2003) 480. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v36i2/4p480-489>.
- [4] Brazilian Ministry of Health, Accidents by venomous animals: what to do and how to avoid them (2019) (Portuguese). Available online: <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos> (accessed 12 August, 2021).
- [5] SINAN - Notifiable Diseases Information System (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), Notification of Health and Diseases 2007 – present: accident by poisonous animals (2020) (Portuguese). Available online: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def> (accessed 12 August, 2021).
- [6] J.W. Fox, S.M.T. Serrano, Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: An overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications, Curr. Pharm. Des. 13 (2007) 2927–2934. <https://doi.org/10.2174/138161207782023739>.
- [7] J.M. Gonçalves, Purification and properties of crotoxin, in: E.E. Buckley, N. Porges (Eds.), Venoms, American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, 1956: pp. 261–273.
- [8] K.H. SLOTTA, H. FRAENKEL-CONRAT, Two Active Proteins from Rattlesnake Venom, Nature. 142 (1938) 213–213. <https://doi.org/10.1038/142213a0>.
- [9] O.V. Brazil, Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action., Mem. Inst. Butantan. 33 (1966) 981–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6002982>.
- [10] R. da S. Lomeo, A.P. de F. Gonçalves, C.N. da Silva, A.T. de Paula, D.O. Costa Santos, C.L. Fortes-Dias, D.A. Gomes, M.E. de Lima, R. da Silva Lomeo, A.P. de Faria Gonçalves, C.N. da Silva, A.T. de Paula, D.O.C. Santos, C.L. Fortes-Dias, D.A.

- Gomes, M.E. de Lima, Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels., *Toxicon*. 85 (2014) 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.008>.
- [11] C.L. Fortes-Dias, Y. Lin, J. Ewell, C.R. Diniz, T.Y. Liu, A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 15646–15651. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40730-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40730-7).
- [12] C.A.H. Fernandes, W.M. Pazin, T.R. Dreyer, R.N. Bicev, W.L.G. Cavalcante, C.L. Fortes-Dias, A.S. Ito, C.L.P. Oliveira, R.M. Fernandez, M.R.M. Fontes, Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism, *Sci. Rep.* 7 (2017) 43885. <https://doi.org/10.1038/srep43885>.
- [13] A.L. Bieber, D. Nedelkov, Structural, Biological and Biochemical Studies of Myotoxin a And Homologous Myotoxins, *J. Toxicol. Toxin Rev.* 16 (1997) 33–52. <https://doi.org/10.3109/15569549709064092>.
- [14] N. Oguiura, M. Boni-Mitake, G. Rádis-Baptista, New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom, *Toxicon*. 46 (2005) 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.009>.
- [15] H. Barrabin, J.L. Martiarena, J.C. Vidal, A. Barrio, Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, in: P. Rosemberg (Ed.), *Toxins Anim. Plant Microb.*, Pergamon Press, New York, 1978: pp. 113–133.
- [16] A. Barrio, Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom, in: *Acta Physiol. Latinoam.*, ASSN LATINOAMER CIENC FISIOL, SERRANO 665, 1414 BUENOS AIRES, ARGENTINA, 1961: pp. 224–32.
- [17] J. Prado-Franceschi, O. Vital Brazil, Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *Toxicon*. 19 (1981) 875–887. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90085-4).
- [18] W.A. Hadler, O.V. Brazil, Pharmacology of crystalline crotoxin. IV. Nephrotoxicity., *Mem. Inst. Butantan.* 33 (1966) 1001–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6002953>.
- [19] C.H. Tokarnia, M.F. Brito, J.D. Barbosa, J. Döbereiner, Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops* spp. em animais de produção, *Pesqui. Veterinária Bras.* 34 (2014) 301–312. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400001>.

- [20] P. Cupo, M.M. Azevedo-Marques, S.E. Hering, Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84 (1990) 447–451. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90358-L](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90358-L).
- [21] P.E.B. Santos, S.D. Souza, L. Freire-Maia, A.P. Almeida, Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart, *Toxicon.* 28 (1990) 215–224. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90415-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90415-4).
- [22] J.E. de Siqueira, M. de L. Higuchi, N. Nabut, A. Lose, J.K. Souza, M. Nakashima, [Myocardial lesions after snake bites by the *Crotalus durissus terrificus* species (rattlesnake). A case report], *Arq. Bras. Cardiol.* 54 (1990) 323–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2288520>.
- [23] F. de Paola, M.A. Rossi, Myocardial damage induced by tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom in rats, *Cardiovasc. Pathol.* 2 (1993) 77–81. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1054-8807\(93\)90016-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1054-8807(93)90016-U).
- [24] L. Gonçalves-Machado, D. Pla, L. Sanz, R.J.B. Jorge, M. Leitão-De-Araújo, M.L.M. Alves, D.J. Alvares, J. De Miranda, J. Nowatzki, K. de Moraes-Zani, W. Fernandes, A.M. Tanaka-Azevedo, J. Fernández, R.B. Zingali, J.M. Gutiérrez, C. Corrêa-Netto, J.J. Calvete, Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest, *J. Proteomics.* 135 (2016) 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.04.029>.
- [25] C.A. Nicolau, P.C. Carvalho, I.L.M. Junqueira-de-Azevedo, A. Teixeira-Ferreira, M. Junqueira, J. Perales, A.G.C. Neves-Ferreira, R.H. Valente, An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*, *J. Proteomics.* 151 (2017) 214–231. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.029>.
- [26] T. Reeks, V. Lavergne, K. Sunagar, A. Jones, E. Undheim, N. Dunstan, B. Fry, P.F. Alewood, Deep venomomics of the *Pseudonaja* genus reveals inter- and intra-specific variation., *J. Proteomics.* 133 (2016) 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.019>.
- [27] I.S. de Oliveira, I.A. Cardoso, K. de C.F. Bordon, S.E.I. Carone, J. Boldrini-França, M.B. Pucca, K.F. Zoccal, L.H. Faccioli, S.V. Sampaio, J.C. Rosa, E.C. Arantes, Global proteomic and functional analysis of *Crotalus durissus collilineatus* individual venom variation and its impact on envenoming., *J. Proteomics.* 191 (2019) 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.020>.

- [28] M.C. Menezes, E.S. Kitano, V.C. Bauer, A.K. Oliveira, E. Cararo-Lopes, M.Y. Nishiyama, A. Zelanis, S.M.T. Serrano, Early response of C2C12 myotubes to a sub-cytotoxic dose of hemorrhagic metalloproteinase HF3 from *Bothrops jararaca* venom, *J. Proteomics*. 198 (2019) 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.006>.
- [29] C.Y. Kisaki, S.S.S. Arcos, F. Montoni, W. da Silva Santos, H.M. Calacina, I.F. Lima, D. Cajado-Carvalho, E.S. Ferro, M.Y. Nishiyama-Jr, L.K. Iwai, *Bothrops Jararaca Snake Venom Modulates Key Cancer-Related Proteins in Breast Tumor Cell Lines*, *Toxins (Basel)*. 13 (2021) 519. <https://doi.org/10.3390/toxins13080519>.
- [30] F. Montoni, D.Z. Andreotti, R.A. dos S. Eichler, W. da S. Santos, C.Y. Kisaki, S.S.S. Arcos, I.F. Lima, M.A.M. Soares, M.Y. Nishiyama-Jr, D. Nava-Rodrigues, E.S. Ferro, V.M. Carvalho, L.K. Iwai, The impact of rattlesnake venom on mice cerebellum proteomics points to synaptic inhibition and tissue damage., *J. Proteomics*. 221 (2020) 103779. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103779>.
- [31] E.F. Teston, H.P.M. Cecilio, A.L. Santos, G.O. de Arruda, C.A.T. Radovanovic, S.S. Marcon, Factors associated with cardiovascular diseases in adults, *Med. (Ribeirao Preto. Online)*. 49 (2016) 95. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v49i2p95-102>.
- [32] C.A.T. Radovanovic, L.A. dos Santos, M.D. de B. Carvalho, S.S. Marcon, Arterial Hypertension and other risk factors associated with cardiovascular diseases among adults, *Rev. Lat. Am. Enfermagem*. 22 (2014) 547–553. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.3345.2450>.
- [33] L.A. Bharadwaj, Cardiac Toxicology, in: B. Ballantyne, T.C. Marrs, T. Syversen, D.A. Casciano, S.C. Sahu (Eds.), *Gen. Appl. Toxicol.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2009: pp. 1–22. <https://doi.org/10.1002/9780470744307.gat067>.
- [34] Z. Wollberg, R. Shabo-Shina, N. Intrator, A. Bdolah, E. Kochva, G. Shavit, Y. Oron, B.A. Vidne, S. Gitter, A novel cardiotoxic polypeptide from the venom of *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp): cardiac effects in mice and isolated rat and human heart preparations., *Toxicon*. 26 (1988) 525–34. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90232-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90232-2).
- [35] D.S. Celermajer, C.K. Chow, E. Marijon, N.M. Anstey, K.S. Woo, Cardiovascular disease in the developing world: prevalences, patterns, and the potential of early disease detection., *J. Am. Coll. Cardiol.* 60 (2012) 1207–16. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.03.074>.

- [36] B.A. Stanley, R.L. Gundry, R.J. Cotter, J.E. Van Eyk, Heart Disease, *Clinical Proteomics and Mass Spectrometry, Dis. Markers.* 20 (2004) 167–178. <https://doi.org/10.1155/2004/965261>.
- [37] A.H. Fischer, K.A. Jacobson, J. Rose, R. Zeller, Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections., *CSH Protoc.* 3 (2008) pdb.prot4986. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>.
- [38] T. Masuda, M. Tomita, Y. Ishihama, Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis., *J. Proteome Res.* 7 (2008) 731–40. <https://doi.org/10.1021/pr700658q>.
- [39] J.R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann, Universal sample preparation method for proteome analysis., *Nat. Methods.* 6 (2009) 359–62. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1322>.
- [40] J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips., *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1896–906. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261>.
- [41] P.J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, A.J.R. Heck, Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics., *Nat. Protoc.* 4 (2009) 484–94. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.21>.
- [42] J. Wang, S. Vasaikar, Z. Shi, M. Greer, B. Zhang, WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit., *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) W130–W137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx356>.
- [43] S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M.Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, J. Cox, The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data., *Nat. Methods.* 13 (2016) 731–40. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
- [44] D. Szklarczyk, A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K.P. Tsafou, M. Kuhn, P. Bork, L.J. Jensen, C. von Mering, STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) D447–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>.
- [45] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks., *Genome Res.* 13 (2003) 2498–504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.

- [46] N.T. Doncheva, J.H. Morris, J. Gorodkin, L.J. Jensen, Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data., *J. Proteome Res.* 18 (2019) 623–632. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00702>.
- [47] S. Lê, J. Josse, F. Husson, FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis, *J. Stat. Softw.* 25 (2008) 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>.
- [48] M.M. Azevedo-Marques, P. Cupo, T.M. Coimbra, S.E. Hering, M.A. Rossi, C.J. Laure, Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil., *Toxicon.* 23 (1985) 631–6. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90367-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90367-8).
- [49] K.S. Chugh, V. Sakhuja, Renal Disease Caused by Snake Venom, in: A.T. Tu (Ed.), *Handb. Nat. Toxins Reptil. Venoms Toxins*, Routledge, Abingdon, England, United Kingdom, 2017: pp. 471–493. <https://doi.org/10.1201/9780203752715>.
- [50] A.M.. Martins, M.H. Toyama, A. Havt, J.C. Novello, S. Marangoni, M.C. Fonteles, H.S.. Monteiro, Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys, *Toxicon.* 40 (2002) 1165–1171. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00119-8).
- [51] L.E. Danzig, Hemodialysis of Acute Renal Failure Following Rattlesnake Bite, with Recovery, *JAMA.* 175 (1961) 136. <https://doi.org/10.1001/jama.1961.63040020031017>.
- [52] P.L.M.M. Albuquerque, C. N. Jacinto, G.B. Silva Junior, J.B. Lima, M. do S.B. Veras, E.F. Daher, ACUTE KIDNEY INJURY CAUSED BY *Crotalus* AND *Bothrops* SNAKE VENOM: A REVIEW OF EPIDEMIOLOGY, CLINICAL MANIFESTATIONS AND TREATMENT, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 55 (2013) 295–301. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500001>.
- [53] M. Hernández, H. Scannone, H.J. Finol, M.E. Pineda, I. Fernández, A.M. Vargas, M.E. Girón, I. Aguilar, A. Rodríguez-Acosta, Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumananensis*) venom., *Exp. Toxicol. Pathol.* 59 (2007) 129–37. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.04.002>.
- [54] M.P. Marinovic, J.D. Campeiro, S.C. Lima, A.L. Rocha, M.B. Nering, E.B. Oliveira, M.A. Mori, M.A.F. Hayashi, Crotoxin induces browning of adipose tissue and increases energy expenditure in mice, *Sci. Rep.* 8 (2018) 5057. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22988-1>.

- [55] I.G.C. dos Santos, C.L. Fortes-Dias, M.C. dos Santos, Pharmacological applications of Brazilian snake venoms with emphasis in *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus ruruima*, *Scien Amaz.* 6 (2017) 42–53. <http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2016/10/v6-n1-42-53-2017.pdf>.
- [56] A.H. Cruz, R.Z. Mendonça, V.L. Petricevich, *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage., *Mediators Inflamm.* 2005 (2005) 349–59. <https://doi.org/10.1155/MI.2005.349>.
- [57] E. Winkler, M. Chovers, S. Almog, S. Pri-Chen, M. Rotenberg, M. Tirosh, D. Ezra, H. Halkin, Decreased serum cholesterol level after snake bite (*Vipera palaestinae*) as a marker of severity of envenomation., *J. Lab. Clin. Med.* 121 (1993) 774–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8505588>.
- [58] A. Olichon, L. Baricault, N. Gas, E. Guillou, A. Valette, P. Belenguer, G. Lenaers, Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7743–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200677200>.
- [59] L. Chen, Q. Gong, J.P. Stice, A.A. Knowlton, Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure., *Cardiovasc. Res.* 84 (2009) 91–9. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp181>.
- [60] H. Van Remmen, M.D. Williams, Z. Guo, L. Estlack, H. Yang, E.J. Carlson, C.J. Epstein, T.T. Huang, A. Richardson, Knockout mice heterozygous for *Sod2* show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281 (2001) H1422–32. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1422>.
- [61] E.M. Ohman, C. Casey, J.R. Bengtson, D. Pryor, W. Tormey, J.H. Horgan, Early detection of acute myocardial infarction: additional diagnostic information from serum concentrations of myoglobin in patients without ST elevation, *Br. Heart J.* 63 (1990) 335–8. <https://doi.org/10.1136/hrt.63.6.335>.
- [62] S. V Parikh, J.A. de Lemos, Biomarkers in cardiovascular disease: integrating pathophysiology into clinical practice., *Am. J. Med. Sci.* 332 (2006) 186–97. <https://doi.org/10.1097/00000441-200610000-00006>.
- [63] T. V Störk, A.H. Wu, M. Müller-Bardorff, R. Gareis, R. Müller, V. Hombach, H. Katus, M. Möckel, North-Württemberg Infarction Study (NOWIS) Group, Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome.

North-Württemberg Infarction Study (NOWIS) Group., *Am. J. Cardiol.* 86 (2000) 1371–4, A5. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(00\)01246-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(00)01246-7).

[64] F. Sheikh, R.C. Lyon, J. Chen, Functions of myosin light chain-2 (MYL2) in cardiac muscle and disease, *Gene*. 569 (2015) 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.027>.

[65] Y. Li, G. Wu, Q. Tang, C. Huang, H. Jiang, L. Shi, X. Tu, J. Huang, X. Zhu, H. Wang, Slow cardiac myosin regulatory light chain 2 (MYL2) was down-expressed in chronic heart failure patients., *Clin. Cardiol.* 34 (2011) 30–4. <https://doi.org/10.1002/clc.20832>.

[66] J. Flavigny, P. Richard, R. Isnard, L. Carrier, P. Charron, G. Bonne, J.F. Forissier, M. Desnos, O. Dubourg, M. Komajda, K. Schwartz, B. Hainque, Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy., *J. Mol. Med. (Berl)*. 76 (1998) 208–14. <https://doi.org/10.1007/s001090050210>.

[67] Z.T. Kabaeva, A. Perrot, B. Wolter, R. Dietz, N. Cardim, J.M. Correia, H.D. Schulte, A.A. Aldashev, M.M. Mirrakhimov, K.J. Osterziel, Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy., *Eur. J. Hum. Genet.* 10 (2002) 741–8. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200872>.

[68] B. Wei, J.-P. Jin, TNNT1, TNNT2, and TNNT3: Isoform genes, regulation, and structure-function relationships., *Gene*. 582 (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.006>.

[69] R.E. Hershberger, J.R. Pinto, S.B. Parks, J.D. Kushner, D. Li, S. Ludwigsen, J. Cowan, A. Morales, M.S. Parvatiyar, J.D. Potter, Clinical and functional characterization of TNNT2 mutations identified in patients with dilated cardiomyopathy., *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2 (2009) 306–13. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.846733>.

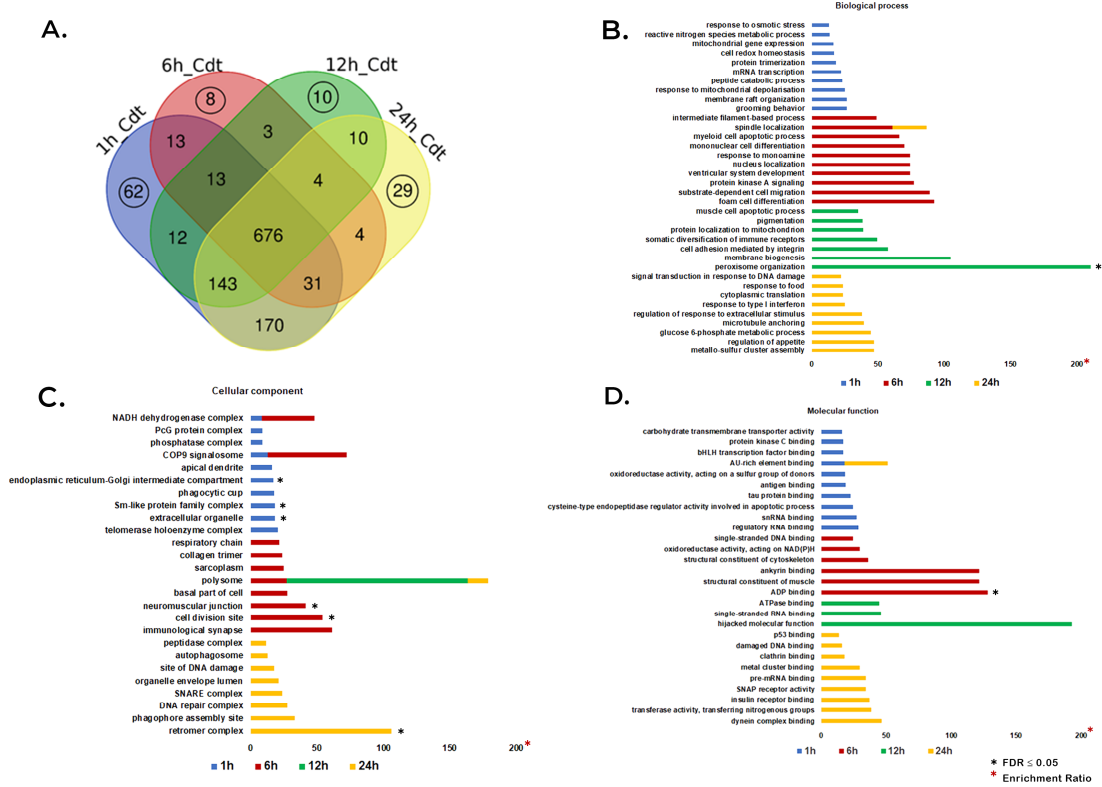
[70] A. Osio, L. Tan, S.N. Chen, R. Lombardi, S.F. Nagueh, S. Shete, R. Roberts, J.T. Willerson, A.J. Marian, Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy., *Circ. Res.* 100 (2007) 766–8. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000263008.66799.aa>.

[71] A.J. Marian, Genetic determinants of cardiac hypertrophy., *Curr. Opin. Cardiol.* 23 (2008) 199–205. <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e3282fc27d9>.

- [72] B.-X. Ke, S. Pepe, D.R. Grubb, J.C. Komen, A. Laskowski, F.A. Rodda, B.M. Hardman, J.J. Pitt, M.T. Ryan, M. Lazarou, J. Koleff, M.M.H. Cheung, J.J. Smolich, D.R. Thorburn, Tissue-specific splicing of an *Ndufs6* gene-trap insertion generates a mitochondrial complex I deficiency-specific cardiomyopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 6165–6170. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113987109>.
- [73] M. Nishi, T. Ogata, C.V. Cannistraci, S. Ciucci, N. Nakanishi, Y. Higuchi, A. Sakamoto, Y. Tsuji, K. Mizushima, S. Matoba, Systems Network Genomic Analysis Reveals Cardioprotective Effect of MURC/Cavin-4 Deletion Against Ischemia/Reperfusion Injury, *J. Am. Heart Assoc.* 8 (2019) e012047. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.012047>.
- [74] M. Nishi, T. Ogata, N. Nakanishi, Y. Higuchi, A. Sakamoto, S. Matoba, P1683MURC/Cavin-4 deletion protects murine heart from ischemia-reperfusion injury, *Eur. Heart J.* 39 (2018). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy565.P1683>.
- [75] H. Cheng, K. Kimura, A.K. Peter, L. Cui, K. Ouyang, T. Shen, Y. Liu, Y. Gu, N.D. Dalton, S.M. Evans, K.U. Knowlton, K.L. Peterson, J. Chen, Loss of enigma homolog protein results in dilated cardiomyopathy., *Circ. Res.* 107 (2010) 348–56. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218735>.
- [76] A. Li, F. Ponten, C.G. dos Remedios, The interactome of LIM domain proteins: the contributions of LIM domain proteins to heart failure and heart development., *Proteomics.* 12 (2012) 203–25. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100492>.
- [77] E. Carniel, M.R.G. Taylor, G. Sinagra, A. Di Lenarda, L. Ku, P.R. Fain, M.M. Boucek, J. Cavanaugh, S. Miodic, D. Slavov, S.L. Graw, J. Feiger, X.Z. Zhu, D. Dao, D.A. Ferguson, M.R. Bristow, L. Mestroni, Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy., *Circulation.* 112 (2005) 54–9. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.507699>.
- [78] R.E. Hershberger, N. Norton, A. Morales, D. Li, J.D. Siegfried, J. Gonzalez-Quintana, Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1, and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy., *Circ. Cardiovasc. Genet.* 3 (2010) 155–61. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.912345>.
- [79] H. Niimura, K.K. Patton, W.J. McKenna, J. Soultis, B.J. Maron, J.G. Seidman, C.E. Seidman, Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly., *Circulation.* 105 (2002) 446–51. <https://doi.org/10.1161/hc0402.102990>.

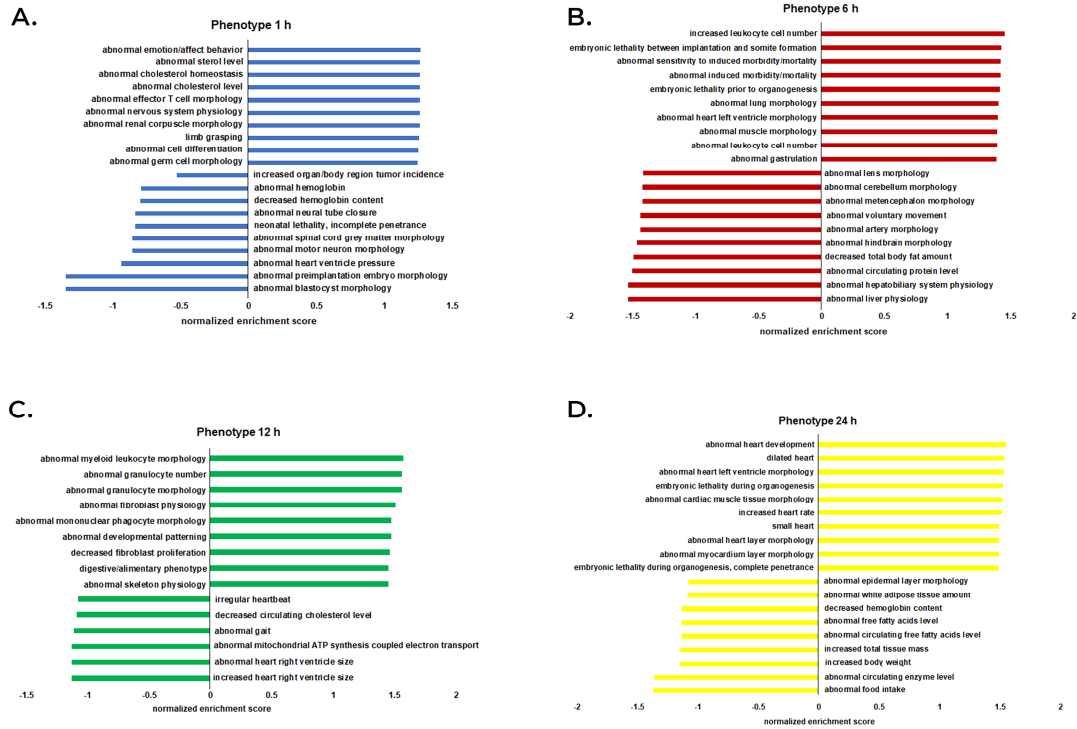
Figure Legends

Figure 1



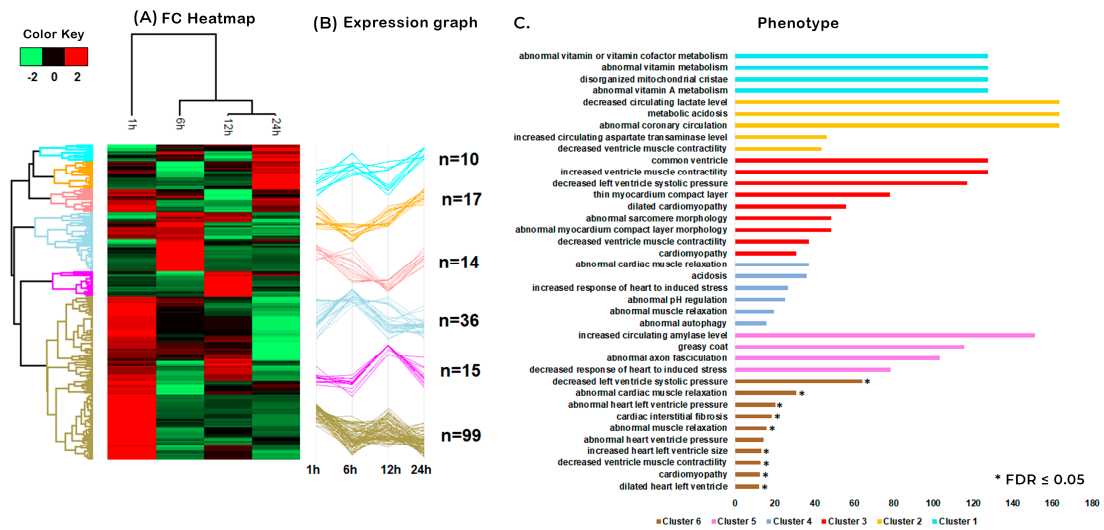
Overall Identification of proteins on venom condition. A. Venn diagram comparing proteins exclusively found on venom condition for each time point represented by black circles, which were submitted to further functional analysis. B. Enrichment for GO biological process. C. Enrichment for GO cellular component. D. Enrichment for GO molecular function.

Figure 2



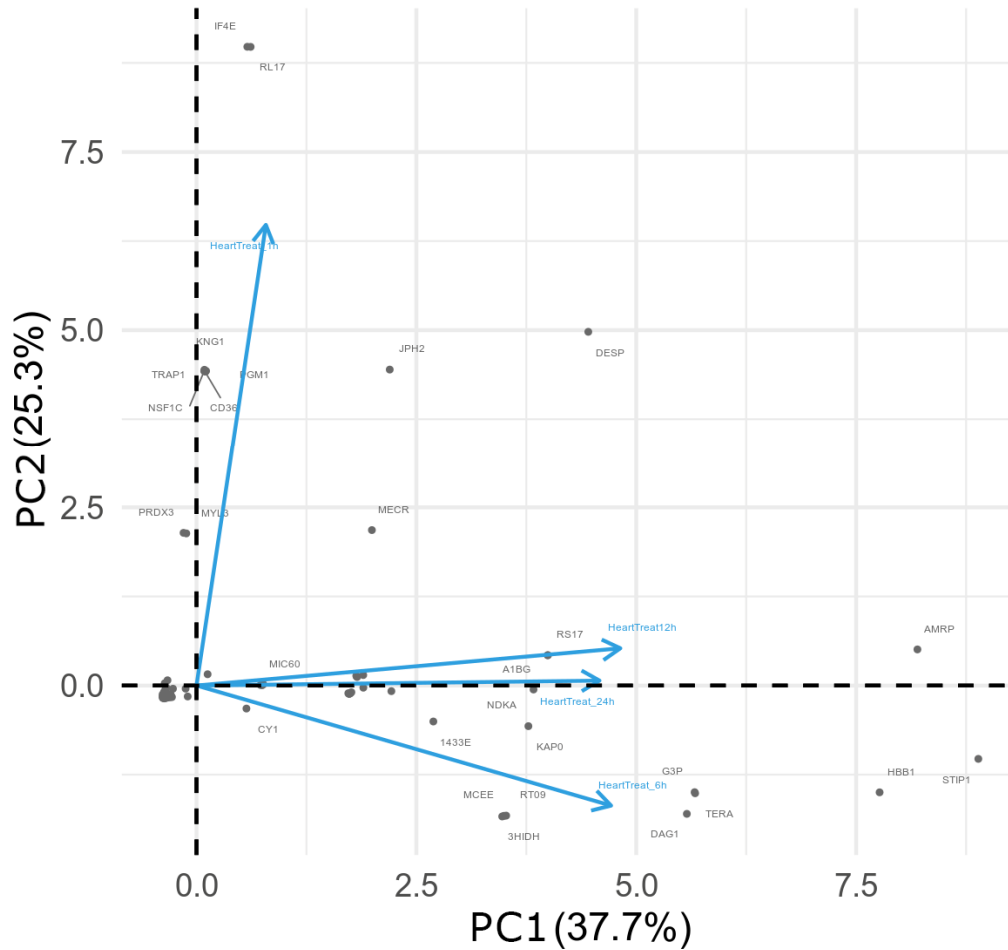
Semi quantitative functional analysis for mammalian phenotype enrichment. All proteins intensity values identified on mass spectrometry quantification analysis were averaged and submitted to functional analysis. A-D represents 1 h to 24 h time point respectively.

Figure 3



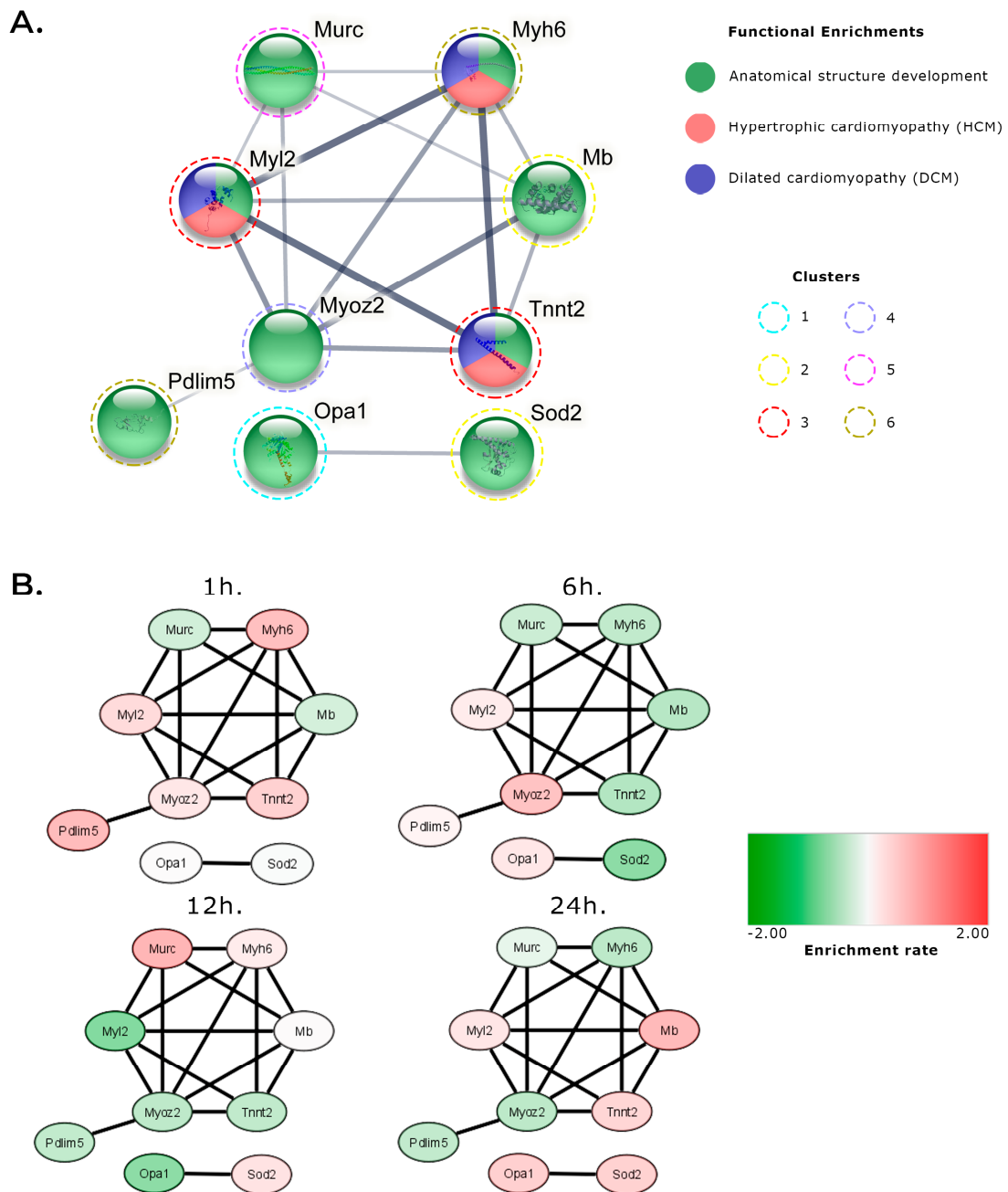
Hierarchical clustering of protein quantification levels at 1 h, 6 h, 12 h, and 24 h. A. Hierarchical cluster of the most significant proteins for each treatment showing changes in protein behavior over time. The protein fold change is represented on a log₂ scale. (B) Expression graphs of each cluster and the numbers of proteins composing each cluster. The protein quantification values were normalized by Z-score by rows. (C) The GO mammalian phenotype enrichment for all clusters.

Figure 4



Comparison of protein log₂ Fold Change profiles across different time points upon venom treatment. The 2D graph explains 63% of the protein variability among the different time points by the first two components PC1 and PC2. The 12 h and 24 h treatments are closer and represent higher correlation between the respective protein profiles. The 1 h and 6 h venom treatment vectors are orthogonal in terms of the observed proteome and indicate that those proteins and respective profiles are very divergent between them.

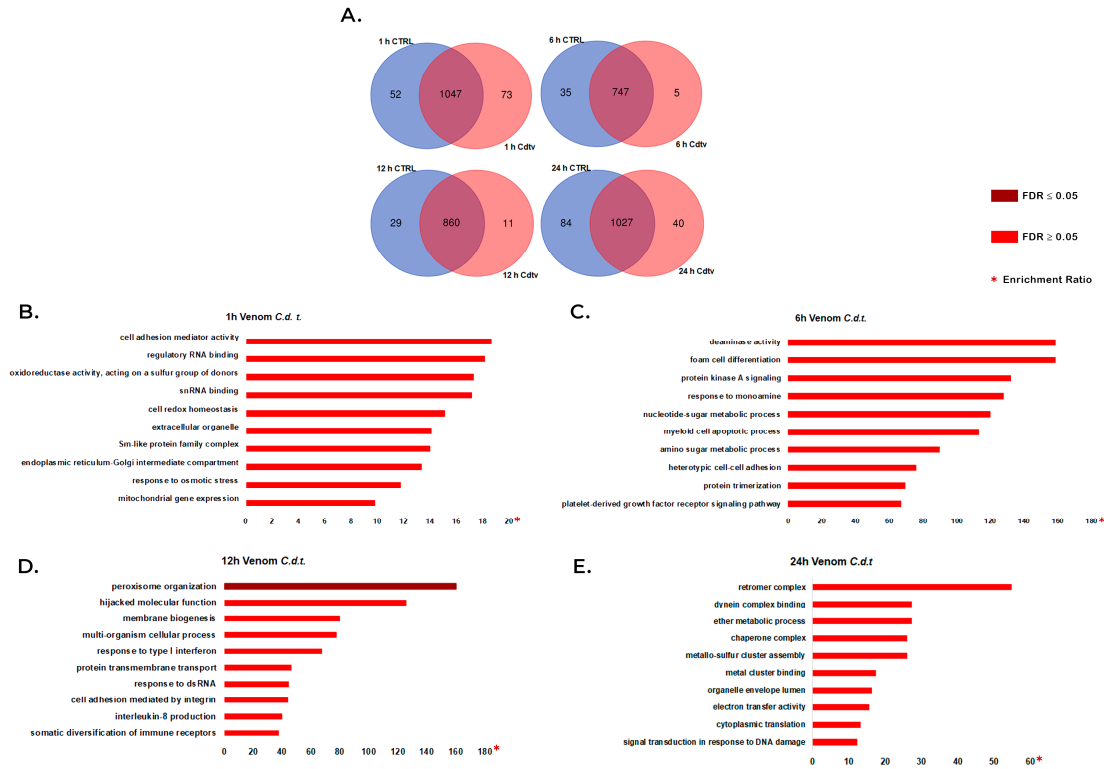
Figure 5



Network vision of semi quantitative highlighted proteins. A. STRING PPI analysis. The edge width represents the confidence found for the given interaction. The color of each node is represented by its functional assignment or disease related. The dotted colored line around nodes represents the cluster of origin. B. Network analysis combining quantitative results using Cytoscape. This result shows individual patterns of up / downregulation (represented as red and green, respectively) of these proteins.

Supplemental Figures and Table

Supplemental Figure 1



Overall Identification of proteins. A. Venn diagram representing the comparison of venom and control condition at each time point. B - E represents enrichment for biological process, molecular function and cellular component GO categories for 1 h to 24 h venom treatment, respectively.

Supplemental Table 1

Condition	Replicate					Mean	SD*
	1	2	3	4	5		
1 h CTRL	5.08	6.11	7.71	7.14	5.96	6.40	0.93
1 h Venom	5.46	5.71	9.01	6.26	6.63	6.61	1.27
6 h CTRL	12.53	9.29	6.02	7.50	5.58	8.18	2.53
6 h Venom	10.06	7.60	6.19	7.51	6.53	7.58	1.36
12 h CTRL	6.62	4.96	5.64	6.54	6.10	5.97	0.62
12 h Venom	5.93	6.05	6.90	5.52	5.74	6.03	0.47
24 h CTRL	5.76	6.28	5.32	5.24	5.99	5.72	0.36
24 h Venom	6.72	5.71	5.40	6.31	6.02	6.03	0.46

Protein quantification (mg) of hearts from mice treated with saline (control) or *C. d. terrificus* venom for 1 h, 6 h, 12 h, and 24 h. *Standard deviation.

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS COM CO-AUTORIA

Anexo A

Montoni F, Andreotti DZ, Eichler RADS, **Santos WDS**, Kisaki CY, Arcos SSS, Lima IF, Soares MAM, Nishiyama-Jr MY, Nava-Rodrigues D, Ferro ES, Carvalho VM, Iwai LK. The impact of rattlesnake venom on mice cerebellum proteomics points to synaptic inhibition and tissue damage. *J Proteomics*. 2020 Jun 15; 221:103779. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103779.

Journal of Proteomics 221 (2020) 103779



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot



The impact of rattlesnake venom on mice cerebellum proteomics points to synaptic inhibition and tissue damage



Fabio Montoni^a, Diana Zukas Andreotti^b, Rosangela Aparecida dos Santos Eichler^b, Wellington da Silva Santos^a, Carolina Yukiko Kisaki^a, Stephanie Santos Suehiro Arcos^a, Ismael Feltosa Lima^a, Magna Aparecida Maltauro Soares^c, Milton Yutaka Nishiyama-Jr^a, Daniel Nava-Rodrigues^e, Emer Suavinho Ferro^b, Valdemir Melechco Carvalho^d, Leo Kei Iwai^{a,*}

^a Laboratory of Applied Toxicology and Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling, LETA/CeTICS, Butantan Institute, Av. Vital Brazil, 1500, São Paulo 05503-900, SP, Brazil

^b Department of Pharmacology, Biomedical Sciences Institute (ICB), University of São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 317, São Paulo 05508-000, SP, Brazil

^c Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, Av. Vital Brazil, 1500, São Paulo 05503-900, SP, Brazil

^d Grupo Fleury, Av. João Pedro Cardoso, 158, São Paulo 04355-000, SP, Brazil

^e The Institute of Cancer Research, The Royal Marsden NHS Foundation Trust, 15 Coswold Road, Sutton, SM2 5NG London, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:
Mass spectrometry
Proteome analysis
Crotalus durissus terrificus
Snake envenomation
Mus musculus
Cerebellum

ABSTRACT

Snake envenomation is responsible for more than 130,000 deaths worldwide. In Brazil, the *Crotalus rattlesnake* is responsible for the second largest number of accidental snake bites in the country. Although there are many descriptions of the clinical and biochemical effects of *Crotalus* envenoming, there are few works describing the molecular events in the central nervous system of an organism due to envenomation. In this study, we analyzed the proteomic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on mice cerebellums. To monitor the envenomation over time, changes in the protein abundance were evaluated at 1 h, 6 h, 12 h and 24 h after venom injection by mass spectrometry. The analysis of the variation of over 4600 identified proteins over time showed a reduction in components of inhibitory synapse signaling, oxidative stress, and maintenance of neuronal cells, which paralleled increasing tissue damage and apoptosis factors. These analyses revealed the potential protein targets of the *C. d. terrificus* venom on the murine cerebellum, showing new aspects of the snake envenomation effect. These data may contribute to new therapeutic approaches (i.e., approaches directed at protein targets affected by the envenomation) on the treatment of envenomation by the neurotoxic *C. d. terrificus* snake venom. **Significance:** Snakebites are a neglected global health problem that affects mostly rural and tropical areas of developing countries. It is estimated that over 5.4 million people are bitten by snakes each year, from which 2.7 million people are bitten by venomous snakes, resulting in disabilities such as amputations and in some cases leading to death.

The *C. d. terrificus* snake is the most lethal snake in Brazil. Studying the molecular changes upon envenomation in a specific tissue may lead to a better understanding of the envenomation process by *C. d. terrificus* snakebites.

Anexo B

Figueiredo, DAL; Santos WS, Montoni F, Iwai LK, Silva Junior PI. Toposome: Source of antimicrobial molecules in the gonads of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 109, p. 51-61, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.023>

Fish and Shellfish Immunology 109 (2021) 51–61



Contents lists available at ScienceDirect

Fish and Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi



Full length article

Toposome: Source of antimicrobial molecules in the gonads of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816)



DAL Figueiredo^{a,b}, WS Santos^a, Fabio Montoni^a, Leo Kei Iwai^a, PI Silva Junior, Dr^{a,b,*}

^a Laboratory for Applied Taxinology (LETA/CeTICS), Butantan Institute, Sao Paulo CEP, 05503-900, SP, Brazil

^b Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo CEP, 05508-900, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Innate immune system
Marine natural compounds
Gender differences
Ecological behavior
Antimicrobial protein
Reproduction

ABSTRACT

Sea urchins live in a challenging environment that requires rapid and efficient responses against pathogens and invaders. This response may be also important in reproductive processes once males and females release their gametes into water. In addition, the gonads are organs with dual function: reproductive organ and nutrient reserve, therefore it needs efficient protective mechanisms to preserve the nutrients as well as the reproductive cells. The aim of this study was to evaluate the presence and characterize antimicrobial molecules in the male and female gonads of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Through HPLC purification, antimicrobial activity test and mass spectrometry several antimicrobial molecules were found in the gonads of both gender. Computational in silico analyses showed that they are fragments of a glycoprotein called toposome, also known as major yolk protein (MYP) which is one of the major proteins found in the gonads. Although different functions have been reported for this protein, this is the first description of a direct antimicrobial activity in *Lytechinus variegatus*. The results indicate that when undergoing proteolysis the toposome generates different fragments with antimicrobial activity which may indicate the importance of a rapid defense response strategy against invading microorganisms in the gonads used by both males and females sea urchins.




Anexo C

Kisaki, C.Y.; Arcos, S.S.S.; Montoni, F.; **da Silva Santos, W.**; Calacina, H.M.; Lima, I.F.; Cajado-Carvalho, D.; Ferro, E.S.; Nishiyama-Jr, M.Y.; Iwai, L.K. Bothrops Jararaca Snake Venom Modulates Key Cancer-Related Proteins in Breast Tumor Cell Lines. *Toxins* 2021, 13, 519. <https://doi.org/10.3390/toxins13080519>



Article

Bothrops Jararaca Snake Venom Modulates Key Cancer-Related Proteins in Breast Tumor Cell Lines

Carolina Yukiko Kisaki ¹, Stephanie Santos Suehiro Arcos ¹, Fabio Montoni ¹, Wellington da Silva Santos ¹, Hamida Macêdo Calacina ¹, Ismael Feitosa Lima ¹, Daniela Cajado-Carvalho ¹ , Emer Suavinho Ferro ² , Milton Yutaka Nishiyama-Jr ^{1,*}  and Leo Kei Iwai ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Applied Toxinology (LETA) and Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, São Paulo 05503-900, Brazil; carolkisaki@hotmail.com (C.Y.K.); stephanie.arcos@usp.br (S.S.S.A.); fabio.montoni@esib.butantan.gov.br (E.M.); wellington.silva@esib.butantan.gov.br (W.d.S.S.); hamidamacedo33@gmail.com (H.M.C.); ismael.lima@butantan.gov.br (I.F.L.); daniela.carvalho@butantan.gov.br (D.C.-C.)
- ² Department of Pharmacology, Biomedical Sciences Institute (ICB), University of São Paulo (USP), São Paulo 05508-000, Brazil; eferro@usp.br
- * Correspondence: milton.nishiyama@butantan.gov.br (M.Y.N.-J.); leo.iwai@butantan.gov.br (L.K.I.)

Abstract: Cancer is characterized by the development of abnormal cells that divide in an uncontrolled way and may spread into other tissues where they may infiltrate and destroy normal body tissue. Several previous reports have described biochemical anti-tumorigenic properties of crude snake venom or its components, including their capability of inhibiting cell proliferation and promoting cell death. However, to the best of our knowledge, there is no work describing cancer cell proteomic changes following treatment with snake venoms. In this work we describe the quantitative changes in proteomics of MCF7 and MDA-MB-231 breast tumor cell lines following treatment with *Bothrops jararaca* snake venom, as well as the functional implications of the proteomic changes. Cell lines were treated with sub-toxic doses at either 0.63 µg/mL (low) or 2.5 µg/mL (high) of *B. jararaca* venom for 24 h, conditions that cause no cell death per se. Proteomics analysis was conducted on a nano-scale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry (nLC-MS/MS). More than 1000 proteins were identified and evaluated from each cell line treated with either the low or high dose of the snake venom. Protein profiling upon venom treatment showed differential expression of several proteins related to cancer cell metabolism, immune response, and inflammation. Among the identified proteins we highlight histone H3, SNX3, HEL-S-156an, MTCH2, RPS, MCC2, IGF2BP1, and GSTM3. These data suggest that sub-toxic doses of *B. jararaca* venom have potential to modulate cancer-development related protein targets in cancer cells. This work illustrates a novel biochemical strategy to identify therapeutic targets against cancer cell growth and survival.

Keywords: mass spectrometry; proteome; snake venom; *Bothrops jararaca*; breast cancer

Key Contribution: We describe that *B. jararaca* snake venom modulates specific protein pathways related to cancer cell growth and invasion, which could be a useful approach to identify novel therapeutic targets for cancer treatment.



Citation: Kisaki, C.Y.; Arcos, S.S.S.; Montoni, F.; da Silva Santos, W.; Calacina, H.M.; Lima, I.F.; Cajado-Carvalho, D.; Ferro, E.S.; Nishiyama-Jr, M.Y.; Iwai, L.K. Bothrops Jararaca Snake Venom Modulates Key Cancer-Related Proteins in Breast Tumor Cell Lines. *Toxins* 2021, 13, 519. <https://doi.org/10.3390/toxins13080519>

Received: 5 July 2021

Accepted: 19 July 2021

Published: 25 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.