WESLEI DA SILVA AGUIAR

**Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno da serpente
Bothrops moojeni e mecanismo antiveneno do plasma desses animais.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia.

São Paulo
2016

WESLEI DA SILVA AGUIAR

**Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno da serpente
Bothrops moojeni e mecanismo antiveneno do plasma desses animais.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Anita Mitico Tanaka
Azevedo

Versão corrigida. A versão original eletrônica,
encontra-se disponível no ICB e na Biblioteca
Digital de Dissertações e Teses da USP.

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

da Silva Aguiar, Weslei

Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno da serpente *Bothrops moojeni* e mecanismo antiveneno do plasma desses animais. / Weslei da Silva Aguiar; orientadora Anita Mitico Tanaka Azevedo. -- São Paulo, 2016.

88 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biotecnologia. 2. Bioquímica. 3. Proteômica. 4. *Bothrops moojeni*. I. Mitico Tanaka Azevedo, Anita, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas
Tecnológicas

Candidato: Weslei da Silva Aguiar

Titulo da Dissertação: Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno da serpente *Bothrops moojeni* e mecanismo antiveneno do plasma desses animais.

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno da serpente *Bothrops moojeni* e mecanismo antiveneno do plasma desses animais", protocolo nº 1304/14, sob a responsabilidade de Anita Mitico Tanaka Azevedo - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 17/6/2015.

This is to certify that the proposal "Biochemical study and biological characterization of *Bothrops moojeni*'s snake venom and plasma antivenom mechanism of these animals", protocol nº 1304/14, under the responsibility of Anita Mitico Tanaka Azevedo - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 6/17/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 06/2015 - 07/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório de Herpetologia	3 Serpentes <i>Bothrops moojeni</i> (M,F); 110 Camundongos Swiss 18-22g (M)

São Paulo, 22 de junho de 2015

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

À minha mãe Eliane, meu irmão Calvin e meu namorado Nathan. Por me darem asas para voar e também por me ancorarem quando foi preciso. Não tenho palavras para descrever tudo que vocês significam para mim. Vocês são, de longe, as pessoas que eu mais admiro nessa vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A minha família e amigos por sempre estarem do meu lado, nas horas boas e ruins. Minha família que eu amo sem ter escolha, mas se pudesse escolher amaria do mesmo jeito. E os meus amigos que eu escolhi amar pelo simples fato de que sim. Obrigado pelos conselhos, dedicação, carinho, risadas e amor. Sou extremamente grato por ter pessoas tão queridas na minha vida.

A minha mãe, meu irmão e meu namorado por serem os melhores seres humanos que eu poderia ter na minha vida. Mãe, cumprir a função de mãe e pai nunca foi fácil mas você sempre fez o melhor e as vezes quase o impossível. Nunca me deixou faltar nada e eu vou sempre fazer de tudo para retribuir cada ato seu. Calvin, meu irmão mais novo, obrigado por ser uma pessoa íntegra e de bom coração. Espero que tudo isso sirva sempre de inspiração na sua vida. Você tem potencial e incentivos para chegar muito longe! E Nathan, meu amorzinho, obrigado por ter entrado na minha vida da melhor maneira possível. Obrigado pelas inúmeras horas de carinho, companheirismo e respeito que temos um pelo outro. Serei sempre grato por ter você na minha vida, que além de fonte de inspiração é uma das maiores fontes da minha felicidade e incentivo. Obrigado a vocês pelo amor, pelo carinho, pelo suporte, por me alegrarem quando estive triste e por me direcionarem sempre na direção correta. Amo vocês!

À Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo, primeiramente por ter acreditado em mim e me dado um voto de confiança anos atrás. Obrigado também pela orientação, pelos ensinamentos, pelas conversas, pelas broncas e pelas (muitas) risadas que partilhamos durante essa longa jornada. E se nesse tempo todo de convivência eu pude também lhe ensinar o pouco que seja, posso partir para as novas etapas da minha vida com a sensação de dever cumprido.

Aos colegas de Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Caroline Serino Silva, César Adolfo Bravo Tobar, Henrique Fernandes Sericaku, Karen de Moraes Zani, Lídia Jorge Tasima e Nathália Galizio. Também aos que não estão mais no laboratório, mas passaram e deixaram suas marcas: Fernanda Sanches, Jéssica Mendes, Mariana Santesso e Victor Cioce, De maneira especial, gostaria de agradecer à Caroline pela imensa amizade que construímos dentro do laboratório e que há muito tempo já extravasou dele, por ter sido também mentora e amiga em todos esses anos de trabalho. Nunca teria dado um passo sequer se você não tivesse me ajudado antes. Nunca se esqueça da pessoa maravilhosa que você é! À Karen, por ser tão presente tanto nos assuntos de laboratório quanto pessoais. Ah, e obrigado também por rir das minhas desgraças e por comemorar minhas vitórias junto a mim. Ao Henrique por ser o melhor pupilo que alguém poderia ter. Obrigado por ter passado esse tempo todo comigo trabalhando lado a lado e construindo uma amizade que eu quero sempre levar comigo! À Iasmim pelas conversas, pelo carinho, pelas caronas, pelos bom dias de cara feia, por

nunca deixar eu ligar o ar condicionado, pelas risadas e por partilhar comigo essa experiência toda! À Lídia pelo carinho, por ser uma pessoa extremamente amável que você se sente à vontade de estar junto desde os primeiros dias de convívio. E também à Nathália por ser a atual presidente e vice-presidente do meu fã clube. Obrigado pelo carinho e pelas inúmeras horas de trabalho, diversão e carinho que vocês todos dividiram comigo. Sou e serei eternamente grato por todos esses momentos. Amo vocês!

Aos meus amigos de toda a vida, os presenciais e os distantes, que me acompanharam em tantos momentos bons e ruins, me dando amor e suporte, com suas presenças tanto físicas quanto emocionais. Obrigado Alice, Artur, Caio, Fabrício, Iolanda, Laís, Matheus, Matias, Maxwell, Nayara, Tamires e Willian por estarem longe porém sempre perto. Em especial ao meu amigo Diego Rondon, por ser uma inspiração desde cedo e por sempre ter acreditado em mim em todos os momentos desde que nos conhecemos 10 anos atrás. E também a minha querida amiga Bárbara Passaia, que viveu comigo as maiores aventuras que eu mesmo jamais pensei em viver. Obrigado por se tornar parte da minha família e por muitas vezes ser um porto seguro, mesmo com esse seu jeitinho birrento de ser. Obrigado também por ter me acompanhado desde a graduação e por dividir comigo as dores e os amores de toda essa época até agora. Amo vocês!

À Dra. Kathleen Fernandes Grego, Diretora do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por permitir a realização deste trabalho e por estar sempre disposta a nos ajudar em todos os aspectos.

Ao Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela extração de venenos das serpentes.

A todos do laboratório de Herpetologia pelo apoio, companheirismo, simpatia e por proporcionar a este lugar um ambiente tão agradável para se trabalhar e se conviver diariamente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

RESUMO

AGUIAR, W. S. **Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno da serpente *Bothrops moojeni* e mecanismo antiveneno do plasma desses animais.** 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os venenos de serpentes são misturas proteicas complexas com diversas atividades biológicas, tanto em suas presas quanto em vítimas humanas. Muitas dessas proteínas desempenham papel na captura de presas e no processo digestivo desses animais. É conhecido o fato de que algumas serpentes são resistentes à toxicidade de seu próprio veneno por mecanismos ainda não totalmente elucidados. Porém, foi observado no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan que indivíduos da espécie *Bothrops moojeni*, quando acidentados entre si, apresentavam casos de mortalidade ocasionados por efeitos do envenenamento. Assim, foi proposto um modelo composto de análises bioquímicas e biológicas de 13 amostras de veneno e plasma de serpentes *Bothrops moojeni*, a fim de avaliar diferenças na sua composição proteica. O SDS-PAGE mostrou perfis proteicos bem distintos para as amostras de veneno, ao passo que para as amostras de plasma se mostrou bem homogêneo. Foram realizados *Western Blotting* (WB) com amostras desses plasmas, que foram previamente submetidos à incubação com o veneno do próprio indivíduo. Alguns indivíduos mostraram uma zona de detecção na faixa de 25 kDa, comprovando assim interação entre algumas proteínas do plasma e do veneno desses indivíduos. Outro teste de WB cruzado, utilizando plasma de um indivíduo pré-incubado com o veneno de outro, mostrou que os venenos de alguns indivíduos possuem proteínas que se ligam à estas regiões do plasma, o que não ocorre com o veneno dos outros indivíduos testados. As atividades caseinolítica e coagulante dessas amostras também se mostraram superiores aos venenos que não apresentaram regiões reconhecidas pelo WB. A análise por espectrometria de massas mostrou que esses indivíduos apresentam, além de maiores concentrações proteicas e outras tantas exclusivas, inibidores de fosfolipases em sua composição. Quando estas amostras foram testadas *in vivo*, os resultados da Dose Letal 50% mostraram uma maior eficiência nesses venenos, ao passo que a Dose Mínima Hemorrágica mostrou-se inferior. Conclui-se que alguns indivíduos dessa espécie apresentam diferenças na composição dos seus venenos que se tornam significativas para o envenenamento. A alta variabilidade individual encontrada nessa espécie sugere que alguns indivíduos estão mais suscetíveis aos efeitos causados pelo envenenamento acidental do que outros.

Palavras-chave: *Bothrops*. Veneno. Biotecnologia. Toxicidade. Proteômica.

ABSTRACT

AGUIAR, W. S. *Bothrops moojeni's* snake venom and plasma anti-venom mechanisms: a biochemical and biological characterization. 2016. 88 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Snake venoms are complex protein mixtures with different biological activities, both in their prey and in human victims. Many of these proteins play a role in the prey capture and in the digestive process of these animals. It is known the fact that some snakes are resistant to the toxicity of their own venom by mechanisms not yet fully elucidated. However, it was observed in the Herpetology Laboratory of the Butantan Institute that some *Bothrops moojeni* individuals injured by the same species, showed mortalities caused by envenoming effects. Thus, a model composed of biochemical and biological analysis of 13 venom and plasma samples from *Bothrops moojeni* individuals has been proposed to assess differences in their protein composition. SDS-PAGE showed distinct venom protein profiles, while a very homogeneous plasma ones. Western Blotting (WB) was performed with plasma samples, which was previously submitted to incubation with the respective venom. Some individuals showed a detection zone on the 25 kDa band, indicating interaction between the same individual plasma and venom proteins. Other crossed-WB assay using plasma from an individual incubated with the venom from the other one showed that some individuals have venom proteins which bind to these regions of the plasma, which does not occur with the venom of other individuals tested. The caseinolytic and coagulant activities of these venoms were higher than the venoms that did not show regions recognized by the WB. The analysis by mass spectrometry showed that these individuals present, as well as higher protein concentrations and other exclusive proteins, phospholipase inhibitors in their composition. When these samples were tested *in vivo*, the results of the 50 % Lethal Dose showed a higher efficiency in these venoms, while the Minimum Hemorrhagic Dose was lower. We conclude that some individuals of this species differ in the composition of the venom that become significant for envenomation. The high individual variability found in this species suggests that some individuals are more susceptible to the effects caused by accidental envenomation than others.

Keywords: *Bothrops moojeni*. Venom. Biotechnology. Toxicity. Proteomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>B. moojeni</i> (A) e sua distribuição geográfica (B)	19
Figura 2 - SDS-PAGE (10%) dos plasmas de <i>B. moojeni</i> (em condições reduzidas) ..	38
Figura 3 - SDS-PAGE (12%) dos venenos de <i>B. moojeni</i> (em condições reduzidas) ..	38
Figura 4 - Western blotting com amostras de plasma de <i>B. moojeni</i> , sensibilizadas com o respectivo veneno (indivíduos de 1 a 13)	40
Figura 5 - Western blotting ‘cruzado’ com plasma de um indivíduo incubado com amostra de veneno de outro indivíduo (indivíduos 2, 4 e 8)	41
Figura 6 - Zimografia em gel de poliacrilamida 12% dos venenos de <i>B. moojeni</i> e uma amostra de <i>B. jararaca</i> , contendo gelatina como substrato (indivíduos 1 a 13 e Bj: veneno de <i>B. jararaca</i>)	42
Figura 7 - Zimografia em gel de poliacrilamida 12% dos venenos de <i>B. moojeni</i> e uma amostra de <i>B. jararaca</i> , contendo caseína como substrato (indivíduos 1 a 13 e Bj: veneno de <i>B. jararaca</i>)	43
Figura 8 - Zimografia em gel de poliacrilamida 12% com amostras de veneno de <i>B. moojeni</i> (1 a 13) e uma amostra de veneno de <i>B. jararaca</i> , contendo gelatina como substrato e inibidor de serinoprotease (PMSF)	44
Figura 9 - Zimografia em gel de poliacrilamida 12% com amostras de veneno de <i>B. moojeni</i> (1 a 13) e uma amostra de veneno de <i>B. jararaca</i> , contendo gelatina como substrato e inibidor de metaloprotease (EDTA)	45
Figura 10 - DMC dos venenos de <i>B. moojeni</i> e <i>B. jararaca</i> utilizando plasma humano citratado. Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+)	46
Figura 11 - DMC dos venenos de <i>B. moojeni</i> e <i>B. jararaca</i> utilizando fibrinogênio bovino. Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+).....	47
Figura 12 - Figura 12: Dosagem da atividade fosfolipásica dos venenos de <i>B. moojeni</i> . Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+)	48
Figura 13 - Atividade caseinolítica dos venenos de <i>B. moojeni</i> e <i>B. jararaca</i> . Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+)	49

Figura 14 - Dosagem de LAAO dos venenos de <i>B. moojeni</i> e <i>B. jararaca</i> . Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+)	50
Figura 15 - Halo hemorrágico causado por 5 µg de veneno de <i>B. moojeni</i> em camundongos Swiss de 18-22 g após 2 h de inoculação do veneno	51
Figura 16 - Perfil cromatográfico das amostras de veneno Bm2, representante do grupo Bm + (A), e Bm4, representante do grupo Bm – (B)	53
Figura 17 - Composição proteica do veneno de <i>B. moojeni</i> do grupo Bm +	69
Figura 18 - Composição proteica do veneno de <i>B. moojeni</i> do grupo Bm -	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características básicas dos indivíduos da espécie <i>B. moojeni</i> utilizados ...	29
Tabela 2 - Dosagem de proteínas de veneno e plasma de <i>B. moojeni</i> pelo método de A ₂₈₀	39
Tabela 3 - Média e desvio padrão da DMC do Plasma dos venenos separados por grupos	48
Tabela 4 - Média e desvio padrão da DMC do Fibrinogênio dos venenos separados por grupos	49
Tabela 5 - Dosagem da atividade fosfolipásica e desvio padrão para os dois grupos analisados	50
Tabela 6 - Média da atividade caseinolítica e desvio padrão para os grupos de venenos analisados	51
Tabela 7 - Valores de LAAO e desvio padrão para os grupos de venenos analisados .	52
Tabela 8 - Dose Letal média (DL50) dos venenos de <i>B. moojeni</i> dos grupos Bm + e Bm -. Os números na tabela representam os valores das DL50 e os números em parênteses os seus respectivos intervalos (superior e inferior) de confiança 95%	54
Tabela 9 - Identificação dos compostos proteicos do indivíduo 2 (grupo Bm +) por espectrometria de massas (Synapt G2 HDMS Waters). Os compostos foram organizados por abundância, com maior quantidade de proteína (fmol) até os compostos que não foram quantificados pelo equipamento. As proteínas exclusivas deste grupo estão destacadas em negrito	57
Tabela 10 - Identificação dos compostos proteicos do indivíduo 4 (grupo Bm -) por espectrometria de massas (Synapt G2 HDMS Waters). Os compostos foram organizados por abundância, com maior quantidade de proteína (fmol) até os compostos que não foram quantificados pelo equipamento. As proteínas exclusivas deste grupo estão destacadas em negrito	64
Tabela 11 - Distribuição da composição proteica dos venenos dos dois indivíduos (Bm + e Bm -) de <i>B. moojeni</i> analisados por espectrometria de massas (Synapt G2 HDMS Waters)	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B. jararaca - *Bothrops jararaca*

B. moojeni - *Bothrops moojeni*

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

Da - Dalton

DL50 - Dose Letal Média

DMC-F – Dose mínima coagulante do Fibrinogênio

DMC-P – Dose mínima coagulante do Plasma

DMH – Dose Mínima Hemorrágica

DTT – Ditionitreitol

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

FAD - Flavina Adenina Dinucleótido

GFP-b - Glufibrinopeptídeo

GPC - Peptídio-glutamil-ciclo-transferase

HCl – Ácido clorídrico

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

IAA - Iodoacetamida

IB – Instituto Butantan

kDa - kilodalton

LAAO - L-aminoácido oxidase

NaCl – Cloreto de sódio

NGF - *Nerve Growth Factor*

NH₃ - Amoníaco

NOBA – 4-nitro- 3-(octanoloxo) ácido benzóico

OPD – Ortofenilenodiamina

PGs - Prostaglandinas

pI - Ponto isoelétrico

PLA₂ - Fosfolipase A2

PMSF - *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

TCA – Ácido tricloroacético

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Serpentes	27
3.2 Venenos.....	28
3.3 Plasma.....	29
3.4 Caracterização bioquímica dos venenos.....	29
3.4.1 Absorção no Ultra-Violeta (A_{280}).....	29
3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	29
3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Performance - Fase Reversa (RP-HPLC).....	30
3.4.4 Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF)	30
3.4.4.1 <i>Dosagem de proteínas - Bradford</i>	30
3.4.4.2 <i>Digestão em solução das amostras</i>	30
3.4.4.3. <i>Digestão em solução das amostras</i>	31
3.4.4.4 <i>Análises das amostras digeridas por espectrometria de massas - “Data Independent Acquisition”</i>	32
3.4.4.5 <i>Identificação de proteínas por busca em banco de dados</i>	33
3.5 Caracterização biológica dos venenos	33
3.5.1 Atividade proteolítica sobre a caseína	33
3.5.2 Zimografia	33
3.5.3 Atividade coagulante sobre o plasma e fibrinogênio – Dose Mínima Coagulante (DMC)	34
3.5.4 Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO)	34
3.5.5 Dosagem da atividade fosfolipásica (PLA ₂).....	35
3.5.6 Dose Mínima Hemorrágica (DMH)	35
3.5.7 Dose Letal (DL50).....	35

3.6 Análise da interação proteína-proteína do veneno e plasma da <i>B. moojeni</i>.....	36
3.6.1 <i>Western blotting</i>	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Dosagem de Proteínas	37
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	37
4.3 <i>Western blotting</i>	39
4.4 Zimografia.....	41
4.4.1 Zimografia com gelatina.....	41
4.4.2 Zimografia com caseína.....	42
4.4.3 Zimografia com gelatina em presença de inibidores de serinoproteases (PMSF) ou metaloproteases (EDTA)	44
4.5 Dose Mínima Coagulante (DMC) – Plasma	46
4.6 Dose Mínima Coagulante (DMC) – Fibrinogênio.....	46
4.7 Atividade fosfolipásica dos venenos	47
4.8 Atividade caseinolítica dos venenos	48
4.9 Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO).....	49
4.10 Dose Mínima Hemorrágica (DMH)	50
4.11 Dose Letal (DL50).....	52
4.10 Cromatografia Líquida de Alta Performance - Fase Reversa (RP-HPLC)	52
4.11 Espectrometria de massas (nanoESI–qTOF).....	54
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, os mais complexos de todos os venenos conhecidos, sendo também as toxinas animais mais estudadas desde o século passado (KELLAWAY, 1931; MACKESSY, 1985; NOGUCHI, 1909; WHITE; MEIER, 1995) até os dias atuais (BORDON et al., 2015; MAGRO et al., 2004; MAMEDE et al., 2016; MARCUSSI et al., 2013; MENEZ, 2002; RIBEIRO DE QUEIROZ et al., 2014). Os venenos representam uma inovação crítica na evolução dos ofídios que permitiu a transição da forma de captura da presa de mecânica (construção) para química (veneno) e esta inovação desempenhou um papel importante na diversificação e evolução destes animais (FOX; SERRANO, 2005; FRY, 2005).

A principal função destas toxinas é imobilizar, paralisar e matar a presa a fim de que a mesma possa ser ingerida de maneira segura (RICHARDS; BARLOW; WÜSTER, 2012). Essas toxinas também compõem o mecanismo de defesa destes animais (MEBS, 1999). Além disso, também têm um importante papel na digestão do alimento desses animais, iniciando e auxiliando a digestão dos animais inteiros evitando que ocorra a putrefação das vísceras das presas abatidas no interior do aparelho digestivo das serpentes (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; MACKESSY, 1993; MEBS, 2001; SASA, 1999).

Cerca de 90% do peso seco dos venenos é constituído por proteínas, porém, apesar de apresentarem mais de 100 proteínas distintas (SERRANO et al., 2005), essas pertencem apenas a algumas famílias proteicas, incluindo enzimas (serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases) e proteínas sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP, fatores de crescimento neural e endotelial, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz) (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; FRY; WÜSTER, 2004; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; MARKLAND, 1998; SERRANO et al., 2005). As frações não proteicas são representadas por carboidratos, lipídeos, metais (frequentemente na forma de glicoproteínas e metaloproteases), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres. Esses venenos são misturas complexas com atividades biológicas diversas, que constituem uma excelente fonte de biomoléculas para o desenvolvimento de novas drogas (SUNTRAVAT; NUCHPRAYOON; PÉREZ, 2010).

A família Viperidae representa o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos registrados, não

somente no Brasil, mas também em outros países americanos. A fauna do Brasil possui cinco gêneros pertencentes a essa família, que somam cerca de 30 espécies (MELGAREJO; CARDOSO; FRANÇA, 2003). Pertencendo a essa família, o gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, sendo responsável por aproximadamente 90% dos 29.000 acidentes ofídicos anuais registrados no Brasil (BERNARDE, 2014). As serpentes desse gênero são encontradas em todo o território nacional, sendo que algumas espécies apresentam maior importância por sua extensa distribuição geográfica.

O objeto deste estudo é a serpente *B. moojeni*, conhecida popularmente como Caissaca, Caiçara ou Jacuruçu, é a principal espécie de *Bothrops* do cerrado do Brasil Central, distribuindo-se desde o Paraná até o Maranhão (figura 1). Pode também ser encontrada em partes da Argentina, Paraguai e Bolívia, habitando então florestas de araucária (BORGES; ARAÚJO, 1998). Essa espécie possui hábitos noturnos e semi-arborícolas e pode ser encontrada em florestas de galeria e outras áreas úmidas (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). Em sua fase adulta pode alcançar 230 cm de comprimento, mas sua maioria não atinge mais de 160 cm (CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 2004). Indivíduos fêmeas costumam ser maiores que indivíduos machos devido ao dimorfismo sexual (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). Sua alimentação é bastante generalista e variada, consistindo de anfíbios, lagartos e roedores, sendo que existe uma mudança ontogenética em sua dieta, com indivíduos filhotes alimentando-se de presas ectodérmicas e quando adultos, a maioria dos alimentos consumidos passam a ser endotérmicos (ANDRADE; ABE; DOS SANTOS, 1996; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003).

Figura 1 - *B. moojeni* (a) e sua distribuição geográfica (b) (Cardoso et al., 2009).

Podemos classificar as atividades fisiopatológicas do veneno botrópico em três categorias: atividade proteolítica, que engloba os principais efeitos locais como a ação inflamatória, necrótica, atividade coagulante e atividade hemorrágica, que agem ao nível do sistema circulatório e são responsáveis pelos distúrbios hemostáticos causados pelo envenenamento (ROSENFELD, 1971). Todas essas atividades dependem de inúmeros fatores e os agentes responsáveis pelos mesmos podem atuar em conjunto, fazendo com que uma mesma toxina apresente diversas atividades (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

A principal característica desse veneno é sua alta atividade proteolítica, responsável pela maioria dos efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento por esses animais (BERNARDES et al., 2008). Esses efeitos tornam o envenenamento por esses animais casos de grande importância médica, e que tem crescido em função da capacidade desses animais de se adaptarem aos ambientes modificados que os circundam, de apresentar comportamento agressivo e de seu grande porte (CARDOSO et al., 2009). O veneno da *B. moojeni* contém enzimas proteolíticas, as quais são associadas às atividades biológicas específicas, como hemorrágicas, coagulantes e anticoagulantes. Essas enzimas degradam uma grande variedade de substratos, tais como caseína, hemoglobina, colágeno, elastina, fibrinogênio, insulina e glucagon, causando coagulação sanguínea, hemorragia e necrose (RAW, 1991).

As proteínas do veneno de serpentes estão sujeitas à evolução Darwiniana (OHNO et al., 1997) e a variabilidade na composição do veneno entre gêneros, espécies, subespécies, populações e indivíduos confere às serpentes a capacidade de se adaptar a diferentes nichos ecológicos (GIBBS et al., 2011). Essa variabilidade nas composições e atividades dos venenos é relatada em inúmeros trabalhos e pode ser observada em diferentes níveis, como ontogenético, entre gêneros, geográfico, inter e intraespecífico (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991). Neste contexto, a dieta dos animais tem um papel de extrema importância na sua evolução, uma vez que o recrutamento de genes para a produção da peçonha e a estrutura das presas como um todo têm como objetivo primordial a captura de alimento (DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; KOCHVA; NAKAR; OVADIA, 1983; MACKESSY, 1988; THOMAS; POUGH, 1979). A ontogenia existente em alguns grupos de serpentes também tem estimulado pesquisa. Por exemplo, alguns trabalhos relatam alterações no tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por filhotes e adultos de serpentes *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*) (KAMIGUTI; SILVA; CARDOSO, 1986; RIBEIRO; JORGE, 1989).

As serinoproteases, importantes enzimas presentes nos venenos botrópicos, contêm um resíduo de serina no sítio reativo, que é estabilizado pela presença de histidina e de ácido aspártico. Estão frequentemente associadas a distúrbios hemostáticos, atuando sobre uma variedade de substratos, como componentes da cascata da coagulação sanguínea e do sistema fibrinolítico. Estas enzimas apresentam massa molecular variando entre 26 e 67 kDa (SERRANO; MAROUN, 2005). Embora homogêneas em suas características estruturais, as serinoproteases de peçonhas podem apresentar uma grande diversidade de perfis farmacológicos, atuando em diversos componentes da cascata da coagulação sanguínea e nos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina (SERRANO; MAROUN, 2005; VILCA-QUISPE et al., 2010).

As metaloproteases são enzimas que dependem de íons metálicos para serem ativadas. Estas enzimas estão envolvidas em diversos processos decorrentes do envenenamento, tais como: degradação de fatores da coagulação sanguínea, inibição de agregação plaquetária, edema, degradação de componentes da matriz extracelular e hemorragia (FOX; SERRANO, 2005; LIZANO et al., 2000; SERRANO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005). As metaloproteases podem ser divididas em três classes: **Classe P-I:** enzimas de massa molecular entre 20 e 30 kDa, que apresentam apenas o domínio protease (ou domínio catalítico). **Classe P-II:** enzimas de massa molecular de

cerca de 30 a 50 kDa que, além do domínio catalítico, apresentam um domínio desintegrina. Nesta classe pode haver uma autocatálise que leva à separação da metaloprotease PII em uma PI e uma desintegrina. **Classe P-III**: são enzimas que apresentam intensa atividade hemorrágica nos venenos. Apresentam o domínio catalítico, o desintegrina e um terceiro domínio, rico em cisteínas. Apresentam massa molecular variando entre 50 e 80 kDa. Podem apresentar-se na forma monomérica (**Classe P-IIIa**) e também na forma dimérica (**P-IIIb**) (FOX; SERRANO, 2008). **Classe P-IIIc (antiga classe P-IV)**: são proteases com massa molecular entre 80 e 100 kDa que apresentam, além dos 3 domínios anteriores, dois domínios tipo-lectina ligados por pontes dissulfeto no final de sua estrutura (BJARNASON; FOX, 1995; FOX; SERRANO, 2005, 2008; HITE et al., 1994; ZELANIS et al., 2010).

As desintegrinas são proteínas não enzimáticas que apresentam baixa massa molecular (5 a 9 kDa). Sua estrutura é formada pela sequência Arginina, Glicina e Ácido Aspártico (sequência RGD) que imita a sequência RGD presente em moléculas que interagem com integrinas plaquetárias, como, por exemplo, o fibrinogênio (CALVETE et al., 2005). Desta forma, as desintegrinas têm a capacidade de inibir a agregação plaquetária. Essas proteínas, como dito anteriormente, são geralmente originadas do processamento de metaloproteases da classe PII e fazem parte da sua estrutura, embora já tenham sido encontradas sequências de cDNA codificantes apenas para desintegrinas (OKUDA; KOIKE; MORITA, 2002).

As lectinas tipo C têm esta designação por fazerem parte da família de lectinas que necessitam de íons cálcio para sua interação com glicoconjugados. Estas moléculas apresentam uma conformação típica em sua estrutura, uma espécie de *loop*, cujos resíduos coordenam a ligação com íons cálcio (DRICKAMER, 1988). A maioria das lectinas encontradas em venenos de serpentes não apresenta esse *loop* de ligação com o cálcio e nem todas se ligam a carboidratos (CLEMETSON et al., 2001). Geralmente as lectinas tipo C são diméricas e apresentam massa molecular aproximada de 30 kDa. Estas proteínas estão envolvidas principalmente nas alterações de processos hemostáticos decorrentes do envenenamento, interagindo principalmente com receptores plaquetários e fatores da cascata de coagulação sanguínea (ZINGALI; BIANCONI; MONTEIRO, 2001).

As fosfolipases são uma superfamília de enzimas que atuam sobre membranas celulares realizando a clivagem de fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios,

desconstruindo a parede celular. Existem diferentes tipos de fosfolipases, dependendo do seu ponto de atuação no fosfolípídeo. As fosfolipases A₂ (PLA₂) foram as primeiras a serem conhecidas e sua descoberta foi devido à observação de sua ação do suco pancreático de mamíferos e da ação da peçonha de serpentes na hidrólise de fosfatidilcolina (WITTCOFF, 1951).

As PLA₂s são enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, catalisando especificamente a hidrólise de fosfolipídios na ligação éster do carbono 2 e liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos, em uma reação dependente de cálcio, resultando em inflamação tecidual na região afetada pela picada (ARNI; WARD, 1996; DENNIS et al., 1991; KUDO; MURAKAMI, 2002; SANTOS-FILHO et al., 2008). São enzimas de baixa massa molecular, por volta de 14 kDa (DENNIS et al., 2011), e apresentam um importante papel nas funções celulares, como manutenção dos fosfolipídios celulares, geração de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos, transdução de sinais, proliferação celular e contração muscular.

As L-Aminoácido Oxidases (LAAOs) são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos em alfa-cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio. As LAAOs são usualmente glicoproteínas homodiméricas ligantes de FAD, com uma massa molecular entre 110 e 150 kDa, em condições não redutoras. Essa classe de enzimas está amplamente distribuída em várias espécies de seres vivos tanto nas peçonhas de serpentes quanto em insetos, fungos, bactérias e até mesmo plantas (TAN e FUNG, 2008). As LAAOs são substâncias de grande interesse na área científica por apresentarem alto potencial citotóxico sobre diversos patógenos e linhagens celulares tumorais; (LEE et al., 2011; SUN et al., 2010; CHU et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2005; DU; CLEMETSON, 2002). Trabalhos recentes descrevem seus efeitos biológicos como: indução de apoptose, citotoxicidade, indução e/ou inibição de agregação plaquetária, hemorragia, hemólise, edema, atividade bactericida e anti-HIV (SOUZA et al., 1999; STÁBELI et al., 2007; STILES; SEXTON; WEINSTEIN, 1991; SUHR; KIM, 1996). Muitos dos efeitos biológicos de LAAOs são creditados aos efeitos secundários do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzido durante a reação enzimática e que induz a apoptose celular, agindo assim como um auxiliador no processo de envenenamento (ANDE et al., 2006; DU; CLEMETSON, 2002; RODRIGUES et al., 2009).

Na composição do veneno de serpentes também podemos encontrar outras proteínas que podem, ou não, estar envolvidas nos processos causados pelas proteínas mais conhecidas. Temos a Peptídio-glutamil-ciclo-transferase (GPC), que faz parte da família das transferases e é responsável pela conversão de L-peptídeo-glutamil em 5-peptídeo-oxoprolil e NH_3 (BUSBY et al., 1987). Proteínas secretórias ricas em cisteína, conhecidas como CRISPs, são glicoproteínas envolvidas no funcionamento do sistema reprodutivo dos mamíferos (KOPPERS; REDDY; O'BRYAN, 2011). Nos venenos de serpentes, as CRISPs são responsáveis pela inibição da contração do músculo liso e bloqueio dos canais iônicos (YAMAZAKI; MORITA, 2004). E temos também os Fatores de Crescimento Neural (NGF, do inglês *Nerve Growth Factor*) que, como o próprio nome já diz, são proteínas relacionadas ao crescimento, manutenção e sobrevivência de células nervosas (REICHARDT, 2006).

Tradicionalmente, a proteômica é definida como a análise do conjunto completo de proteínas (proteoma) expressas por uma célula, tecido ou organismo em determinada situação e, ao contrário do genoma, não é estático, podendo ser modificado pelas condições e estímulos às quais este organismo está exposto (YAN, 1995). A venômica é a estratégia proteômica empregada para o estudo do veneno de serpentes (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; CALVETE et al., 2009a). Além de caracterizar o perfil proteico desses venenos e compreender como esses evoluem, outro importante objetivo de projetos venômicos é identificar toxinas de importância médica, contribuindo para a elucidação do mecanismo de ação desses venenos e possibilitando a utilização dessas moléculas no desenvolvimento de novos fármacos (MÉNEZ; STÖCKLIN; MEBS, 2006; MENEZ, 2002). A variabilidade da composição dos venenos pode ser convenientemente analisada através da combinação de ferramentas proteômicas e ensaios toxinológicos e bioquímicos (CALVETE et al., 2009a).

A complexidade do proteoma do veneno dos viperídeos é atribuída a diversos mecanismos moleculares, incluindo o alto grau de variação na sequência de aminoácidos de regiões não conservadas e níveis variáveis de glicosilação dentro de uma mesma família de toxinas, como as proteases e as PLA_2 s, e a estrutura modular dos precursores de metaloproteases, que permite padrões de processamento variáveis e, conseqüentemente, estruturas proteicas variáveis (FOX; SERRANO, 2008; NAKASHIMA et al., 1995; SERRANO et al., 2005).

Um grande número de espécies de serpentes apresentam mudanças na composição do veneno relacionadas com o seu desenvolvimento ontogenético (ALAPE-GIRÓN et al., 2008; CALVETE et al., 2009b, 2011; GUTIÉRREZ et al., 1990; MACKESSY, 1988; MACKESSY et al., 2006). A composição dos venenos é resultado de múltiplos fatores e sua variabilidade inerente é geralmente relacionada aos fatores ambientais e ecológicos (ZELANIS et al., 2010). Por exemplo, com relação à idade do animal, os venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni* jovens apresentam maior atividade pró-coagulante (ativação de fator X e protrombina) e menor atividade inflamatória aguda local em relação às serpentes adultas (FURTADO, 1987; RIBEIRO; JORGE, 1989). Com relação à distribuição geográfica, Daltry e seus colaboradores observaram que serpentes de uma mesma espécie, coletadas em regiões diferentes, podem apresentar variações nas atividades dos venenos. Nesse estudo, estes pesquisadores demonstraram que a variação geográfica relatada para as atividades do veneno da serpente *Calloselasma rhodostoma* está intimamente associada à sua dieta, não ocorrendo o envolvimento de relações filogenéticas e do fluxo de genes. Dessa forma, acredita-se que os componentes do veneno refletem diretamente a composição de presas da região e os hábitos alimentares das serpentes (DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996).

Devido à natureza tóxica do veneno de serpentes para os humanos, a elucidação das causas da sua variabilidade apresenta importância central para a pesquisa em toxinologia. Como consequência da frequência e magnitude desta variação, é possível observar que, muitas vezes, o soro antiofídico apresenta-se ineficaz (FRY et al., 2003; WARRELL, 1989; WÜSTER, 1996; WÜSTER et al., 1992) e o envenenamento apresenta sintomas inesperados (GILLISSEN et al., 1994). Como os venenos das serpentes evoluem de maneira acelerada em comparação ao próprio organismo, e diferenças quanto às presas ingeridas podem resultar em diferentes formulações selecionadas pelas pressões evolutivas, a abordagem filogenética tradicional empregada na produção de antivenenos pode ser associada ou mesmo substituída pelo conhecimento do perfil das toxinas que compõem esses venenos (CALVETE et al., 2009a), incluindo as variações ontogenéticas, individuais e geográficas (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991).

Além de contribuir para a elucidação da evolução dos venenos, a caracterização do conteúdo proteico do veneno dessas serpentes apresenta ainda benefícios para a pesquisa básica, o diagnóstico clínico, o desenvolvimento de novas ferramentas de

pesquisa e drogas com potencial aplicação terapêutica e estratégias para a produção de soros antiofídicos (SANZ et al., 2006). Considerando-se ainda que, se presentes, estas variações podem resultar na produção de soros menos efetivos e em resultados inconsistentes na pesquisa científica (MODAHL; DOLEY; KINI, 2010). Para a produção de soros antiofídicos específicos, as causas da variação da composição dos venenos precisam inicialmente ser compreendidas, para que então populações representativas de serpentes sejam selecionadas para a produção de venenos (FRY et al., 2003). Isto é particularmente relevante para espécies com grande capacidade adaptativa e amplamente distribuídas (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010).

E é claro que com a existência de tantos compostos com diferentes capacidades de causar danos aos diversos tipos de organismos e tecidos, fez-se na natureza a necessidade de inibidores específicos para tantos tipos de toxinas. As peçonhas de serpentes podem ser neutralizadas por diversos agentes, entre eles anticorpos mono e policlonais e agentes químicos (sintéticos e naturais) de origem animal e vegetal. (BORGES et al., 2001; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; MAGRO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005). Existem muitos exemplos de inibidores presentes tanto no plasma quanto no veneno de serpentes e também em várias outras espécies de animais que necessitam desta proteção por serem predadores destes animais peçonhentos ou por serem predados pelos mesmos.

Há muitos anos sabe-se que as serpentes são resistentes às suas próprias peçonhas. Esta resistência pode ser explicada pela presença de fatores neutralizantes em seu plasma sanguíneo (DOMONT; PERALES; MOUSSATCHÉ, 1991; OVADIA; KOCHVA; MOAV, 1977). Atualmente há a descrição de uma série de inibidores existentes no sangue de diversos animais, incluindo fatores neutralizantes de hemorragia, neurotoxicidade, miotoxicidade, atividade fosfolipásica e muitos outros (LIZANO et al., 1997; PÉREZ; SÁNCHEZ, 1999; SO et al., 2008).

Foi demonstrado por Zingali e colaboradores que a botrojaracina, uma proteína de 27 kDa e pertencente à família das lectinas do tipo C, é capaz de inibir 50% da atividade da trombina em agregar plaquetas, sendo um importante inibidor da coagulação sanguínea proveniente do veneno de serpente (ZINGALI et al., 1993). A botrojaracina é uma proteína ácida (pI = 4,2) purificada do veneno de *B. jararaca* que forma um complexo não covalente com a trombina. A botrojaracina inibe a atividade da trombina sobre o fibrinogênio, o fator V da cascata de coagulação sanguínea, as

plaquetas, a ativação da proteína G, a ligação da trombina com a trombomodulina e o complexo antitrombina-heparina (AROCAS et al., 1996).

Em 1999, foi isolada e identificada no veneno da serpente *Bothrops alternatus* um inibidor da coagulação. A botralternina é uma proteína com 95% de homologia com a botrojaracina nos primeiros 25 aminoácidos analisados. Com 27 kDa de massa molecular, a botralternina é também uma lectina com capacidade de inibir a atividade da trombina, ligando-se a ambos os exossítios da mesma (CASTRO; FERNANDES; ZINGALI, 1999).

As características do veneno da *B. moojeni* são semelhantes às das outras serpentes do gênero *Bothrops*; no entanto, uma peculiaridade é a alta mortalidade ocasionada pelos acidentes entre serpentes dessa mesma espécie, fato não observado em outras espécies deste gênero. Foi observado em cativeiro que serpentes dessa espécie, quando acidentam-se entre si, apresentaram hemorragia na região visceral e necrose, mesmo quando a picada ocorreu em uma região mais afastada do ventre. Tal fato pode indicar tanto a falta de um mecanismo de defesa no plasma contra o próprio veneno, como algum fator, em particular, relacionado à peçonha do animal, conforme informado pela Dra. Kathleen Fernandes Grego e registrado em fichas de necropsia do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica e a composição proteica do veneno das serpentes *B. moojeni* do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, assim como a atividade antiveneno do plasma desses animais. As atividades em análise foram comparadas com as da serpente *B. jararaca*.

2 Objetivos

O presente estudo tem como objetivo investigar a composição e a atividade biológica do veneno e do plasma das serpentes *B. moojeni*, assim como o mecanismo antiveneno desses animais.

3 Material e métodos

3.1 Serpentes

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

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

extração de veneno é feita em microtubos, sendo então imersos em banho de gelo para conservar as propriedades do veneno até o momento de armazenamento. Após a extração, álcool iodado 2% é aplicado nas presas para evitar infecções.

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

Todos os filhotes nascidos em cativeiro são encaminhados para a sala de filhotes, onde permanecem por três anos, também em gaiolas plásticas, com papelão corrugado e água à vontade. No primeiro ano, os filhotes são alimentados quinzenalmente e, após o primeiro ano, mensalmente. A alimentação forçada, com papa ou camundongos inteiros pré-abatidos, é realizada nas serpentes, adultas ou filhotes, que se recusam a comer sozinhas por mais de três meses.

Treze indivíduos da espécie *B. moojeni* foram utilizados para análise neste trabalho. As informações sobre procedência, tamanho (medidos da cabeça até a cauda do animal), peso e sexo destes estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Características básicas dos indivíduos da espécie *B. moojeni* utilizados.

Identificação	Em cativeiro desde:	Peso (g)	Comprimento (cm)	Localização	Sexo
Bm1	2002	1.605	134	UHE - Porto Primavera - SP	F
Bm2	2006	1.780	146	Araraquara - SP	F
Bm3	2009	985	140	Cuiabá - MT	F
Bm4	2010	655	135	Buritizal - SP	F
Bm5	2010	1.175	138	Patos de Minas - MG	F
Bm6	2012	490	114	Cajuru - SP	F
Bm7	2008	1.865	168	Palmas - TO	F
Bm8	2013	990	132	Patos de Minas - MG	F
Bm9	2013	520	110	Araraquara - SP	F
Bm10	2012	345	109	Araraquara - SP	M
Bm11	2013	440	108	Araraquara - SP	M
Bm12	2005	1.080	138	Palmas - TO	F
Bm13	2013	300	111	Araraquara - SP	M

3.2 Venenos

Os venenos foram obtidos através da extração manual conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Foram extraídas, individualmente, amostras de veneno de treze indivíduos da espécie *B. moojeni*. Estes foram centrifugados a 1400 g para retirar qualquer resquício de células epiteliais, sangue ou saliva, separados, liofilizados e armazenados a -20°C até o momento da análise. Foi utilizado também um *pool* de veneno de *B. jararaca*, proveniente do estoque de venenos do Laboratório de Herpetologia, com o intuito de comparação em alguns experimentos de atividades bioquímicas.

3.3 Plasma

Os plasmas, dos mesmos treze indivíduos que tiveram amostras de veneno coletadas, foram obtidos a partir da coleta do sangue das serpentes em presença do anticoagulante citrato de sódio 3,8% (9 volumes de sangue para 1 de anticoagulante) e centrifugação do mesmo a 1200 g à temperatura ambiente por 15 minutos. Os plasmas foram estocados a -20°C até a utilização.

3.4 Caracterização bioquímica dos venenos

3.4.1 Absorção no Ultra-Violeta (A_{280})

Em uma placa de microtitulação foram pipetados 100 μL de uma solução contendo 10 μL de veneno in natura em 990 μL de solução salina 0,85% (1:10) e o conteúdo proteico das amostras foi determinado por meio de leitura a A_{280} em leitor de placas Epoch (Biotek), de acordo com Stoscheck (STOSCHECK; DEUTSCHER, 1990), em que uma unidade de A_{280} como equivale a 1 mg de proteína, tendo a albumina bovina como proteína padrão.

3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras de venenos e plasmas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 e 10%, respectivamente, de acordo com o método de Laemmli (1970). Por canaleta, foram aplicados 20 μg de proteína. Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Coomassie Blue G250, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Performance - Fase Reversa (RP-HPLC)

Para todas as amostras utilizadas neste experimento, 1 mg de veneno liofilizado foi ressuscitado em 150 μ L de uma solução de ácido trifluoroacético 0,1 % e acetonitrila 5% (solução A) e centrifugado a 10.600 g por 10 minutos. Seguindo método anteriormente descrito (CALVETE et al., 2011), o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de fase reversa C-18 25 x 0,4 mm (Teknokroma Europa 300), equilibrada previamente com a solução A, utilizando-se cromatografo ÄKTA Purifier UPC10 (GE Healthcare). As amostras foram eluídas por meio de um gradiente de uma solução de ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 95% (solução B) de 0% a 70% de solução B por 70 mL, seguido por um passo de 100% de solução B por mais 30 mL. A absorbância foi monitorada em A_{215} e foram coletadas frações de 1 mL durante todo o processo.

3.4.4 Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF)

3.4.4.1 Dosagem de proteínas - Bradford

O ensaio colorimétrico de Bradford (1976) foi utilizado para assegurar, com maior precisão, a quantidade de proteínas utilizada nos procedimentos seguintes, garantindo a confiabilidade do teste quantitativo da espectrometria de massas. Um miligrama de veneno liofilizado foi ressuscitado em 1 mL de solução salina 0,85%. Em uma placa de microtitulação, 5 μ L das amostras foram incubadas com 250 μ L do reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad), à temperatura ambiente, por 10 minutos, seguindo as indicações do fabricante. A leitura foi realizada a A_{595} nm em leitor de placas Epoch (Biotek). A determinação da concentração de proteínas foi realizada por meio de uma curva padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) como padrão.

3.4.4.2 Digestão em solução das amostras

Um mg de veneno liofilizado foi ressuscitado em 1 mL de solução salina 0,85%. Cem microlitros (contendo 100 μ g de proteínas) foram incubados com 1,4-Ditiotreitol 5 mM (DTT) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM por 25 minutos a 56 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas com iodoacetamida 14 mM (IAA) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM à temperatura ambiente no escuro por 30 minutos. Na sequência, as amostras foram incubadas novamente com DTT 5 mM à temperatura

ambiente por 15 minutos. Foi então adicionado cloreto de cálcio 1 mM e tripsina 20 ng/ μ L (1:100) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram incubadas por 16 horas a 37° C. Após a incubação, foi adicionado ácido fórmico 0,4%, e as amostras foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes resultantes foram secos em um sistema de concentração a vácuo (miVac–Gene Vac, Ipswich Suffolk) e armazenados a -20 °C até o momento da análise.

3.4.4.3 Digestão em gel das amostras

Bandas de proteínas das regiões por volta de 25 kDa, presentes no SDS-PAGE das amostras de plasma foram excisadas e submetidas ao processo de digestão *in gel* segundo o protocolo descrito por Hanna et al., (2000), com algumas modificações. Inicialmente, os fragmentos de gel excisados foram incubados em 500 μ L de uma solução de metanol 50% e ácido acético 5% em água deionizada por duas horas. Em seguida, essa solução foi removida e 500 μ L da mesma solução foram adicionados aos fragmentos de gel, permanecendo por uma hora nesta solução. Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados pela incubação por 10 minutos (2 vezes de 5 min) em 200 μ L de acetonitrila (100%). A solução de acetonitrila foi removida e o restante evaporado em sistema de concentração a vácuo. Em seguida, os fragmentos de gel foram reidratados por 30 min em 30 μ L (por fragmento de gel) de solução redutora (DTT 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Após a reidratação, a solução foi removida e os fragmentos foram incubados por 30 minutos em 30 μ L da solução alquilante (IAA 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Em seguida, a solução alquilante foi removida, e os fragmentos de gel submetidos à incubação, por 10 min, em 100 μ L de solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Após esta etapa, a solução de bicarbonato de amônio foi removida e 200 μ L de acetonitrila 100% foram adicionados e os fragmentos incubados por 5 min. A solução de acetonitrila foi removida e, novamente, os fragmentos de gel incubados, por 10 min, em 200 μ L da solução de bicarbonato de amônio 100 mM. Na última etapa de desidratação, a solução de bicarbonato de amônio foi removida e os fragmentos de gel incubados por 10 minutos (duas vezes de 5 min) em 200 μ L de acetonitrila 100%. A solução de acetonitrila foi removida e o restante evaporado em sistema de concentração a vácuo. Os fragmentos de gel foram reidratados em 5 μ L de uma solução de tripsina 20 ng/ μ L em bicarbonato de amônio 50 mM, em banho de gelo, por 30 min. Em seguida, a solução de tripsina foi

removida, uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionada (em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel) e os tubos contendo os fragmentos foram incubados a 37 °C por 18 horas. A extração dos peptídeos do gel foi feita com a adição de 30 µL (por fragmento de gel) da solução 1 (ácido fórmico 5% em água deionizada) e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo microtubo, e, ao pedaço de gel do tubo anterior foram adicionados 12 µL da solução 2 (ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%). Os fragmentos de gel foram incubados por 20 minutos (duas vezes por 10 min) nessa solução, e a solução foi transferida para o tubo contendo os peptídeos que foram extraídos com a solução 1. A solução foi concentrada em sistema de concentração a vácuo e as amostras foram mantidas a -20 °C até o momento da análise.

3.4.4.4 Análises das amostras digeridas por espectrometria de massas - “Data Independent Acquisition”

Os peptídeos resultantes da digestão do item 3.4.4.2 foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1%, aos quais foram adicionados 15 µL de álcool desidrogenase-ADH (Waters MassPrep, P00330) 1 nmol/L, para a análise quantitativa das amostras. Alíquotas de 5 µg dos peptídeos digeridos de cada amostra foram aplicadas em um sistema de cromatografia nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters). As amostras foram injetadas em uma coluna *trap* (C18 nanoAcquity trap Symmetry de 180 µm x 20 mm, Waters) com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram eluídas em uma coluna analítica capilar (C18 nanoAcquity BEH 75 µm x 200 mm, 1,7 µm) usando um gradiente de 93% de solução A (ácido fórmico 0,1%) e 7% de solução B (acetonitrila 99,9% e ácido fórmico 0,1%) até atingir 35% dessa segunda solução durante 92 minutos em um fluxo de 275 nL/min. Os dados foram adquiridos pelo espectrômetro de massas no modo de aquisição HDMSE, alternando-se os modos de baixa energia (4eV) e de alta energia de colisão com rampa de 19-45eV a cada 1,25 segundos. O espectrômetro de massas foi calibrado antes do uso e também durante a corrida analítica, a cada intervalo de 30 segundos, utilizando a fonte nanoLockSpray com o peptídeo GFP-b (glufibrinopeptídeo, Waters). Ambas as amostras foram analisadas em triplicata técnica.

3.4.4.5 Identificação de proteínas por busca em banco de dados

Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados pelo ProteinLynx Global Server 3.0.1 (Waters) com limites de contagens para baixa, alta energia e de intensidade de 50 e 750 e 1200 volts, resolução do TOF e largura dos picos automáticas e m/z do calibrante para carga +2 de 785,8426 com janela de 0,2 Da. As buscas no banco de dados foram realizadas com as sequências do gênero *Bothrops* obtidas do Uniprot (www.uniprot.org, 9485 sequências) com os seguintes parâmetros: carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa, oxidação das metioninas, acetilação dos N-terminais e deaminação das asparaginas e glutaminas como modificações variáveis, perda de até duas clivagens da tripsina e configuração automática para tolerâncias de massas dos íons precursores e dos fragmentos. Os limites utilizados para identificação foram: mínimo de 1 fragmento por peptídeo, 5 fragmentos por proteína, 2 peptídeos por proteína e taxa máxima de falsos positivos de 5%, estimada pela busca simultânea com um banco de dados reverso.

3.5 Caracterização biológica dos venenos

3.5.1 Atividade proteolítica sobre a caseína

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

3.5.2 Zimografia

Para a zimografia em gel foi utilizado o método anteriormente descrito (HEUSSEN; DOWDLE, 1980), com algumas modificações. Os venenos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo gelatina ou caseína (Sigma), na concentração final de 1 mg/mL. Após a corrida, os géis foram lavados por

30 minutos em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo 2,5% de detergente Triton X-100. Em seguida, os géis foram lavados por 10 minutos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 para a remoção do Triton X-100. Como última etapa, os géis foram mantidos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo CaCl_2 10 mM e NaCl 200 mM e incubados durante a noite à 37 °C. Após isso, os géis foram corados utilizando-se Coomassie Blue R350, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). Também foram repetidos os experimentos utilizando, na preparação da amostra, inibidores de proteases para avaliar a composição dessas enzimas no veneno. Cinco mM de PMSF (inibidor de serinoproteases) ou 10 mM de EDTA (inibidor de metaloproteases) foram adicionados às amostras durante o preparo das mesmas. A zimografia seguiu como descrito anteriormente, com amostras tanto com PMSF quanto com EDTA.

3.5.3 Atividade coagulante sobre o plasma e fibrinogênio – Dose Mínima Coagulante (DMC)

A Dose Mínima Coagulante (DMC) é definida como a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de plasma citratado ou fibrinogênio em 60 segundos a 37 °C (THEAKSTON; REID, 1983b). Os venenos foram diluídos em solução salina 0,85% em diferentes concentrações. O tempo de coagulação foi obtido adicionando-se 100 µL de cada solução de veneno às alíquotas de 200 µL de plasma, mantidas a 37 °C. O tempo de coagulação foi cronometrado imediatamente após a adição da solução de veneno em um coagulômetro Drake. A atividade coagulante dos venenos sobre o fibrinogênio foi determinada pelo mesmo método utilizado para a DMC-Plasma, utilizando uma solução 2 mg/mL de fibrinogênio bovino purificado no próprio laboratório.

3.5.4 Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO)

A atividade de LAAO dos venenos foi determinada usando o método no qual é analisada a quantidade de peróxido de hidrogênio liberado pela reação entre as LAAOs presentes no veneno e a mistura reativa (KISHIMOTO; TAKAHASHI, 2001). Os venenos liofilizados foram diluídos em solução salina 0,85% a uma concentração de 0,5 mg/mL. Dez µL das amostras foram incubados em microplacas (Sarstedt) com 90 µL de mistura reativa (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, L-metionina 250 mM, o-fenilendiamina 2 mM (OPD) e peroxidase de rábano 0,8 U/mg) por uma hora a 37 °C. Em seguida, a reação

foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 2 M e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de placas Epoch (Biotek). A determinação da atividade da LAAO foi realizada através de uma curva padrão, utilizando-se peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações. Uma unidade de LAAO foi expressa em μmoles de H_2O_2 por μg de veneno por minuto ($\mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{min}$).

3.5.5 Dosagem da atividade fosfolipásica (PLA_2)

Para a mensuração da atividade fosfolipásica foi empregado o método que utiliza como princípio a clivagem do substrato ácido 4-nitro-3-octanolóxy ácido benzóico (NOBA) na presença de PLA_2 s, liberando um produto cromogênico que é medido à A_{425} nm (HOLZER; MACKESSY, 1996). Os venenos liofilizados foram diluídos em solução salina 0,85% (2 mg/mL). Em microplacas com 96 poços (Sarstedt), foram pipetados 20 μL de água deionizada, 20 μL de NOBA 3 mM em acetonitrila, 200 μL de tampão Tris 10 mM CaCl_2 10 mM e NaCl 100 mM pH 8,0 e 20 μL dos venenos. A placa foi incubada por 20 minutos à 37 °C, seguido da medição a A_{425} nm. De acordo Holzer e Mackessy, 0,1 unidade de $A_{425}\text{nm}$ é equivalente à liberação de 25,8 nanomoles (nmoles) de cromóforo. A atividade fosfolipásica foi expressa em nmoles de produto por minuto de incubação por mg de proteína (nM/min/mg).

3.5.6 Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

Para avaliar a atividade hemorrágica foi utilizado o método de Kondo (KONDO et al., 1960) modificado por Gutiérrez (GUTIÉRREZ et al., 1985). Grupos de 5 camundongos Swiss machos, com pesos entre 18 e 22 g, foram inoculados na região abdominal, por via intra-dérmica, com diferentes doses de veneno em volumes de 100 μL . Após 2 horas da inoculação, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO_2 , suas peles da região ventral foram removidas, fixadas em uma placa de vidro e, com o uso de um transiluminador, a região hemorrágica foi transferida para uma folha de sulfite, posteriormente digitalizada e a área hemorrágica foi medida utilizando-se do programa ImageJ. A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) foi definida como a concentração de veneno que causa um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro.

3.5.7 Dose Letal (DL_{50})

A dose letal média (DL_{50}) é definida como a dose responsável pela morte de 50% da população analisada (SILLES VILLARROEL, 1978). Foram utilizados

camundongos Swiss machos, com peso variando entre 18 e 22 g, inoculados por via intraperitoneal (0,5 mL da solução de veneno em salina 0,85%). A sobrevivência ou morte dos indivíduos foi analisada por um período de 48 horas. Para calcular a DL50 foi utilizado o método de Probit (FINNEY, 1971) com software proprietário com base em sistema DOS.

3.6 Análise da interação proteína-proteína do veneno e plasma da *B. moojeni*

3.6.1 Western blotting

O método *Western blotting* (HARLOW; LANE, 1988) foi utilizado para verificar a ocorrência de imunointeração entre as proteínas do plasma e do veneno de *B. moojeni*. As proteínas presentes no plasma, após eletroforese em gel unidimensional, foram transferidas para uma membrana de PVDF (GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20 %), em sistema TE 77 PWR (GE Healthcare), por 2 horas, com voltagem de cerca de 20 V. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S para verificar a eficiência da transferência (Ponceau 0,5% e ácido acético 1%), e, em seguida, descorada com água deionizada. Em seguida, a membrana foi cortada para individualizar as amostras de plasma dos diferentes espécimes, e então foi bloqueada com leite Molico (5%) contendo tween 20 0,01% e incubada durante a noite à 4 °C. As membranas foram, então, submetidas a 3 lavagens sucessivas (5 minutos cada) com solução de lavagem (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, tween 20 0,01%, pH 7,5). Em seguida, cada membrana foi incubada com o seu respectivo veneno diluído 1:1000 em solução de incubação (leite Molico 5%, contendo tween 20 0,01%), por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com o soro antibotrópico diluído 1:1000 em solução de incubação, por 2 horas à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagens, as membranas foram incubadas com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase) diluído 1:10000 em tampão de incubação, por 2 horas, à temperatura ambiente. Após mais um ciclo de lavagens, as membranas foram reveladas adicionando-se o substrato cromogênico (5 mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto em 10 mL de tampão imidazol 0,1 M, 125 µL de CoCl₂ 0,2 M e 3,4 µL H₂O₂ 30%). A reação foi interrompida com adição de água destilada.

4 Resultados

4.1 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas pelo método de A_{280nm} foi utilizada em todos os venenos e plasmas de *B. moojeni* para sua utilização na maioria dos testes realizados nesse trabalho. Na tabela 2 apresenta os valores obtidos pela dosagem dos plasmas e do venenos *in natura*. Os valores obtidos se mantiveram bem homogêneos, tanto para os venenos, quanto para os plasmas, com valores de 160 até 198 mg/mL, e 25,6 e máximo de 28,9 mg/mL, para os venenos e plasmas, respectivamente.

Tabela 2 - Dosagem de proteínas de veneno e plasma de *B. moojeni* pelo método de A₂₈₀.

Veneno		Plasma	
Indivíduo	mg/mL	Indivíduo	mg/mL
<i>Bm1</i>	176,4	<i>Bm1</i>	28,9
<i>Bm2</i>	156,3	<i>Bm2</i>	27,7
<i>Bm3</i>	197,6	<i>Bm3</i>	25,6
<i>Bm4</i>	172,2	<i>Bm4</i>	27,1
<i>Bm5</i>	176,4	<i>Bm5</i>	26,8
<i>Bm6</i>	171,2	<i>Bm6</i>	26,7
<i>Bm7</i>	138,7	<i>Bm7</i>	28,8
<i>Bm8</i>	165,5	<i>Bm8</i>	27,0
<i>Bm9</i>	177,2	<i>Bm9</i>	23,8
<i>Bm10</i>	168,7	<i>Bm10</i>	26,5
<i>Bm11</i>	166,1	<i>Bm11</i>	22,6
<i>Bm12</i>	160,0	<i>Bm12</i>	27,6
<i>Bm13</i>	172,1	<i>Bm13</i>	28,1

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil proteico dos venenos e dos plasmas foi analisado utilizando-se SDS-PAGE 12 e 10%, respectivamente, com redução das suas cadeias na região das pontes dissulfeto pelo uso de β -mercaptoetanol.

A figura 2 mostra o perfil eletroforético do plasma das treze serpentes *B. moojeni* utilizadas neste trabalho, numeradas de 1 a 13, como descrito anteriormente na tabela 1. Todas apresentam um perfil semelhante, tendo apenas algumas bandas com intensidades diferentes, mas nenhuma banda exclusiva para nenhuma das amostras estudadas.

Figura 2 - SDS-PAGE (10%) dos plasmas de *B. moojeni* (em condições reduzidas).

Quanto ao perfil proteico dos venenos, foi observada uma grande variação de um indivíduo para outro, mesmo quando comparadas amostras de indivíduos de uma mesma região. Na figura 3 podemos observar, por exemplo, a ausência de uma banda na faixa de 22 kDa e a presença de outra banda bem evidente na faixa de 25 kDa no veneno 3. Outras diferenças também podem ser observadas, como as bandas de cerca de 22 kDa dos venenos 7 e 12, e também na faixa de 50 kDa, no qual duas bandas são mais evidentes nos venenos 2 e 6.

Figura 3 - SDS-PAGE (12%) dos venenos de *B. moojeni* (em condições reduzidas).

4.3 *Western blotting*

As amostras dos plasmas de todos os indivíduos foram submetidas à técnica de *Western blotting* para analisar a interação entre as proteínas presentes no plasma e as dos venenos das respectivas serpentes. Essa técnica é também conhecida como *overlay*. Assim, as amostras de plasma foram submetidas à técnica de eletroforese, seguida por transferência para uma membrana de PVDF. Após separação das canaletas, cada tira de membrana foi incubada com o respectivo veneno, previamente à incubação com o soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan. A revelação das membranas mostra regiões na faixa entre 20 e 30 kDa, na qual houve interação entre as proteínas do veneno e do plasma apenas em alguns indivíduos, enquanto outros não apresentaram tal interação (figura 4). Esses animais foram denominados de indivíduos positivos (+) (2, 6, 7, 8, 9 e 13) e indivíduos negativos (-) (1, 3, 4, 5, 10, 11, 12).

Figura 4 - *Western blotting* com amostras de plasma de *B. moojeni*, sensibilizadas com o respectivo veneno (indivíduos de 1 a 13).

Após esses resultados, foi testado o mesmo procedimento utilizando o plasma de uma serpente e o veneno de outro indivíduo, para observar se havia reação cruzada entre os diferentes animais, e para identificar ainda onde estariam as proteínas responsáveis pelo reconhecimento, no plasma ou veneno. Assim, 3 indivíduos foram selecionados, 2 (+) (indivíduos 2 e 8) e um (-) (indivíduo 4). O teste permitiu observar que a amostra de plasma, que anteriormente não apresentava a marcação na região citada (indivíduo 4), quando sensibilizada com venenos (+) (indivíduos 2 e 8) também exibiu a interação nas regiões marcadas (figura 5), demonstrando assim que as proteínas responsáveis por esta interação estão presentes nos venenos destes animais.

Figura 5 - *Western blotting* ‘cruzado’ com plasma de um indivíduo incubado com amostra de veneno de outro indivíduo (indivíduos 2, 4 e 8)

A partir desses resultados, todos os testes seguintes foram realizados seguindo a seguinte denominação, de acordo com a presença ou ausência desta região no veneno dos indivíduos: **grupo Bm +**, referente aos indivíduos que apresentaram o imunoreconhecimento na banda de aproximadamente 20 a 30 kDa no teste de *Western blotting* (indivíduos 2, 6, 7, 8, 9 e 13), e o **grupo Bm -**, que abrange os indivíduos cujo teste não mostrou nenhuma interação imunológica (indivíduos 1, 3, 4, 5, 10, 11 e 12).

4.4 Zimografia

4.4.1 Zimografia com gelatina

A zimografia feita com gelatina como substrato apresentou uma região com atividade proteásica nas regiões entre 25 e 37 kDa em todos os venenos. Também é possível observar uma região com um nível de degradação do substrato bem nítida entre 50 e 75 kDa para o veneno 3 e entre 37 e 50 kDa no veneno 5, com exceção do veneno 7, em que se pode observar um padrão bem distinto dos outros, com ausência de ação proteolítica nessas mesmas regiões (figura 6). O veneno de *B. jararaca* foi utilizado para fins de comparação do perfil de degradação em relação à *B. moojeni*, uma vez que já que existem inúmeros trabalhos sobre o veneno dessa serpente.

Figura 6 - Zimografia em gel de poliacrilamida 12% dos venenos de *B. moojeni* e uma amostra de *B. jararaca*, contendo gelatina como substrato (indivíduos 1 a 13 e Bj: veneno de *B. jararaca*).

4.4.2 Zimografia com caseína

Quando utilizada a caseína como substrato, a zimografia mostrou zonas de degradação nas mesmas regiões observadas anteriormente, porém com menos intensidade quando comparadas às mesmas regiões no gel com gelatina. Já nas regiões de maior peso molecular (250 kDa) foi observada degradação do substrato para todas as

amostras, exceto a do indivíduo 8. O indivíduo 3 apresentou duas bandas distintas de degradação, nas regiões de 250 e 150 kDa (figura 7).

Figura 7 - Zimografia em gel de poliacrilamida 12% dos venenos de *B. moojeni* e uma amostra de *B. jararaca*, contendo caseína como substrato (indivíduos 1 a 13).

4.4.3 Zimografia com gelatina em presença de inibidores de serinoproteases (PMSF) ou metaloproteases (EDTA)

O mesmo procedimento para a zimografia com gelatina (item 4.4.2.) foi repetido, adicionando PMSF e EDTA às amostras, separadamente. As figuras 8 e 9 mostram que as mesmas zonas que haviam sofrido ação proteolítica anteriormente ainda estão presentes, porém em menor intensidade, mostrando a presença de proteínas com ação proteolítica nessas regiões, tanto as serinoproteases, quanto as metaloproteases.

Figura 8 - Zimografia em gel de poliacrilamida 12% com amostras de veneno de *B. moojeni* (1 a 13) e uma amostra de veneno de *B. jararaca*, contendo gelatina como substrato e inibidor de serinoprotease (PMSF 5 mM).

Figura 9 - Zimografia em gel de poliacrilamida 12% com amostras de veneno de *B. moojeni* (1 a 13) e uma amostra de veneno de *B. jararaca*, contendo gelatina como substrato e inibidor de metaloprotease (EDTA 10 mM).

4.5 Dose Mínima Coagulante (DMC) – Plasma

A DMC mostra resultados distintos para todos os venenos analisados individualmente (figura 10), sendo que os venenos do grupo Bm + obtiveram uma dose mínima coagulante mais baixa em comparação aos outros venenos (tabela 3).

Figura 10 - DMC dos venenos de *B. moojeni* e *B. jararaca* utilizando plasma humano citratado (μg de veneno por mL de plasma). Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+).

Tabela 3 - Média e desvio padrão da DMC Plasma dos venenos separados por grupos.

DMC Plasma ($\mu\text{g/mL}$)	
Grupo	Média
Bm +	$23,24 \pm 25,80$
Bm -	$58,32 \pm 48,59$

4.6 Dose Mínima Coagulante (DMC) – Fibrinogênio

O mesmo procedimento feito anteriormente foi repetido, substituindo o plasma humano por uma solução de fibrinogênio bovino 2 mg/mL (figura 11). Os resultados

também foram distintos para cada amostra de veneno, e o grupo Bm + apresentou, nesse caso, uma DMC mais alta (tabela 4).

Figura 11 - DMC dos venenos de *B. moojeni* e *B. jararaca* utilizando fibrinogênio bovino (μg de veneno por mL de solução de fibrinogênio bovino). Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+).

Tabela 4 - Média e desvio padrão da DMC Fibrinogênio dos venenos separados por grupo.

DMC Fibrinogênio ($\mu\text{g/mL}$)	
Grupo	Média
Bm +	$18,42 \pm 15,98$
Bm -	$10,60 \pm 8,91$

4.7 Atividade fosfolipásica dos venenos

A dosagem da atividade fosfolipásica dos venenos (figura 12) mostrou, novamente, resultados distintos entre as amostras, sendo que se observou uma atividade maior de PLA₂ para o grupo Bm - (tabela 5).

Figura 12 - Dosagem da atividade fosfolipásica dos venenos de *B. moojeni* (nanomoles por minuto por miligrama de veneno). Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+).

Tabela 5 - Dosagem da atividade fosfolipásica e desvio padrão.

Atividade fosfolipásica (nM/min/mg)	
Grupo	Média
Bm +	18,96 ± 6,11
Bm -	21,80 ± 3,47

4.8 Atividade caseinolítica dos venenos

Os resultados da atividade caseinolítica, tanto individualmente (figura 13) quanto para os grupos (tabela 6), mostraram claramente que, juntamente com os resultados da DMC – Plasma, todos os indivíduos do grupo Bm + apresentam uma atividade caseinolítica mais elevada, quando comparados aos indivíduos do grupo Bm -.

Figura 13 - Atividade caseinolítica dos venenos de *B. moojeni* e *B. jararaca* (unidades de atividade por minuto por miligrama de veneno). Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+).

Tabela 6 - Média da atividade caseinolítica e desvio padrão para os grupos de venenos analisados.

Atividade caseinolítica (U/min/mg)	
Grupo	Média
Bm +	558,15 ± 128,46
Bm -	284,31 ± 89,67

4.9 Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO)

O resultado da dosagem de LAAO (figura 14) foi expresso em μM de H_2O_2 por μg de veneno por minutos de incubação, e mostrou pouca variação de atividade entre os indivíduos. Quando analisadas as médias dos valores para os grupos (tabela 7), foi possível notar valores um pouco superiores para o grupo Bm -.

Figura 14 - Dosagem de LAAO para os venenos de *B. moojeni* e *B. jararaca* representados em micromols de H_2O_2 por micrograma de veneno por minuto. Barras em azul representam os indivíduos do grupo (-) e barras em vermelho os indivíduos do grupo (+).

Tabela 7 - Valores de LAAO e desvio padrão para os grupos de veneno analisados.

LAAO ($\mu M/\mu g/min$)	
Grupo	Média
Bm +	$0.14 \pm 0,05$
Bm -	$0.17 \pm 0,05$

4.10 Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

A atividade de DMH foi realizada utilizando-se duas amostras de venenos individuais. Foram escolhidos indivíduos para representar os dois grupos (positivo e negativo), tendo em consideração a quantidade de veneno liofilizado disponível. Cinco grupos de cinco camundongos cada foram inoculados com diferentes concentrações de veneno. O veneno *Bm2*, do grupo +, apresentou uma DMH de 3,21 μg de veneno por animal, com um desvio padrão de 0,63 μg . Enquanto o veneno do grupo -, o *Bm4*, apresentou uma DMH cerca de duas vezes menor que o veneno *Bm2*, obtendo uma dose

de 1,55 μg por animal com desvio padrão de 0,35 μg . A figura 15 mostra o resultado da dose de 5 μg de cada um dos venenos testados no tecido extraído dos camundongos.

Figura 15 - Halo hemorrágico causado por 5 μg de veneno de *B. moojeni* em camundongos Swiss de 18-22 g após 2 horas de inoculação do veneno.

4.11 Dose Letal (DL50)

A DL50 foi testada utilizando-se, novamente, os dois mesmos venenos utilizados no teste de DMH. Seus resultados foram expressos em µg de veneno por animal. Ambos os venenos apresentaram valores de DL50 bem próximos (tabela 8), tendo o veneno do grupo *Bm +* uma dose 7,6% mais potente em comparação ao veneno *Bm -* analisado. Considerando seus limites inferior e superior de confiança 95%, esses dois indivíduos apresentam variação intra-específica para esse teste.

Tabela 8 - Dose Letal média (DL50) (µg de veneno/animal) dos venenos de *B. moojeni* dos grupos *Bm +* e *Bm -*. Os números na tabela representam os valores das DL50 e os números em parênteses os seus respectivos intervalos (superior e inferior) de confiança 95%.

Grupo	DL50
<i>Bm +</i>	105.3 (161.45 - 68.33)
<i>Bm -</i>	113.97 (176.37 - 78.53)

4.10 Cromatografia Líquida de Alta Performance - Fase Reversa (RP-HPLC)

Dois venenos, cada um pertencente a um grupo (veneno 2 do grupo *Bm +* e 4 pertencente ao grupo *Bm -*) foram analisados por cromatografia líquida (RP-HPLC) e seus perfis foram comparados, apresentando um comportamento semelhante. Podemos notar uma variação na altura de alguns picos (figura 16), o que nos sugere diferentes concentrações proteicas entre os indivíduos.

Figura 16 - Perfil cromatográfico das amostras de veneno Bm2, representante do grupo Bm + (A), e Bm4, representante do grupo Bm – (B).

4.11 Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF)

Essa análise foi realizada com as mesmas amostras utilizadas na Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa (RP-HPLC): uma amostra do veneno Bm2, referente ao grupo Bm +, e uma amostra do veneno Bm4, representante do grupo Bm -. Os resultados mostram que o teste identificou um total de 210 compostos no veneno do grupo Bm + e 200 compostos proteicos no veneno do grupo Bm -. Foram encontrados também compostos exclusivos para cada uma das amostras analisadas, sendo 23 proteínas exclusivas do grupo Bm +, enquanto o grupo Bm - apresentou apenas 15 compostos exclusivos. Quanto às famílias às quais pertencem as proteínas encontradas, ambas as amostras apresentaram: PLA₂s, lectinas tipo C, LAAOs, metaloproteases, serinoproteases, CRISPS, CPG e fatores de crescimento neural. Os três últimos foram agrupados na categoria “Outras proteínas” Todos os compostos encontrados em ambas as amostras são detalhados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Identificação dos compostos proteicos do **indivíduo 2 (grupo Bm +)** por espectrometria de massas (Synapt G2 HDMS Waters). Os compostos foram organizados por abundância, com maior quantidade de proteína (fmol) até os compostos que não foram quantificados pelo equipamento. **As proteínas exclusivas deste grupo estão destacadas em negrito.**

	<i>Protein entry</i>	<i>Protein Accession</i>	<i>Família</i>	<i>Protein score</i>	<i>Massa (Da)</i>	<i>Nº peptídeos</i>	<i>Cover (%)</i>	<i>Quantidade (fmol)</i>
1	Q9I834	PA2H2_BOTMO	PLA ₂	17072,35	14685,5085	16	86,07	4262,77
2	Q9I834	PA2H2_BOTMO	PLA ₂	19075,29	14685,5085	16	86,07	3496,77
3	tr	L7VGC1	PLA ₂	10173,36	16364,6979	16	48,18	2950,43
4	P30431	VM3JA_BOTJA	Metaloprotease	2566,678	66150,0424	37	35,2	2673,93
5	Q6TGQ8	OXLA_BOTMO	LAAO	34315,13	54892,8912	40	39,75	2530,78
6	tr	L7VGC1	PLA ₂	12066,03	16364,6979	16	54,01	2516,43
7	Q9I834	PA2H2_BOTMO	PLA ₂	15493,36	14685,5085	16	86,07	2319,31
8	Q6TGQ8	OXLA_BOTMO	LAAO	37896,69	54892,8912	40	50,63	2285,57
9	P86907	PA2A_BOTAM	PLA ₂	1890,622	14666,0531	13	41,8	2073,73
10	B5AR80	OXLA_BOTPA	LAAO	34278,91	57198,7381	45	33,8	1863,60
11	P30431	VM3JA_BOTJA	Metaloprotease	2600,524	66150,0424	37	42,73	1834,13
12	Q98UF9	VM3H3_BOTJA	Metaloprotease	845,6136	69862,4565	38	22,77	1688,19
13	tr	L7VGC1	PLA ₂	8154,845	16364,6979	16	48,91	1673,71
14	B5AR80	OXLA_BOTPA	LAAO	37410,24	57198,7381	45	41,75	1610,70
15	tr	Q7T1T5	Metaloprotease	2356,708	37862,4562	22	51,06	1579,06
16	P30431	VM3JA_BOTJA	Metaloprotease	3703,209	66150,0424	37	38,35	1525,86
17	P85314	VM1BI_BOTMO	Metaloprotease	3156,933	23621,5431	22	39,02	1493,24
18	Q6TGQ8	OXLA_BOTMO	LAAO	30063,71	54892,8912	40	36,19	1486,09
19	P85420	VM11_BOTAT	Metaloprotease	2863,133	23317,3446	17	36,14	1483,35
20	P04971	VSPF_BOTAT	Serinoprotease	1719,177	28872,9522	15	32,16	1452,86
21	P85314	VM1BI_BOTMO	Metaloprotease	3257,652	23621,5431	22	38,05	1402,71
22	P85420	VM11_BOTAT	Metaloprotease	4323,743	23317,3446	17	41,09	1292,95
23	Q6TGQ9	OXLA_BOTJR	LAAO	27438,1	56630,92	42	35,81	1244,89
24	B5AR80	OXLA_BOTPA	LAAO	29536,65	57198,7381	45	33,8	1229,61
25	Q6TGQ9	OXLA_BOTJR	LAAO	28810,16	56630,92	42	42,45	1193,71
26	Q98UF9	VM3H3_BOTJA	Metaloprotease	978,6184	69862,4565	38	27,72	1142,09

27	Q8AXY1	PA2A_BOTJR	PLA ₂	3136,591	16254,0571	14	40,58	1118,11
28	Q5W959	VSP14_BOTJA	Serinoprotease	1462,073	28527,143	14	32,17	1083,69
29	P86974	PA2BD_BOTLC	PLA₂	2180,338	14509,182	13	51,64	1064,94
30	Q5W959	VSP14_BOTJA	Serinoprotease	1380,698	28527,143	14	34,88	1057,91
31	tr	Q7T1T5	Metaloprotease	3087,454	37862,4562	22	52,58	967,83
32	P04971	VSPF_BOTAT	Serinoprotease	1544,22	28872,9522	15	28,24	888,04
33	P85420	VM11_BOTAT	Metaloprotease	4148,593	23317,3446	17	48,51	858,55
34	P85314	VM1BI_BOTMO	Metaloprotease	3194,535	23621,5431	22	35,61	850,43
35	tr	Q7T1T5	Metaloprotease	2937,27	37862,4562	22	53,5	712,90
36	Q5W959	VSP14_BOTJA	Serinoprotease	1568,085	28527,143	14	35,27	648,93
37	P86970	LECG_BOTPA	Lectina tipo C	2076,129	16736,5093	15	66,67	644,02
38	P04971	VSPF_BOTAT	Serinoprotease	2562,845	28872,9522	15	21,96	599,67
39	Q6TGQ9	OXLA_BOTJR	LAAO	22328,61	56630,92	42	32,6	582,77
40	P86970	LECG_BOTPA	Lectina tipo C	2245,124	16736,5093	15	67,41	582,12
41	Q072L6	VSPL_BOTAS	Serinoprotease	631,6545	28703,2317	22	37,07	576,29
42	O93523	VM3BP_BOTJA	Metaloprotease	2562	70437,186	42	36,39	569,84
43	Q072L6	VSPL_BOTAS	Serinoprotease	593,6022	28703,2317	22	30,5	545,63
44	P81824	VSP1_BOTJA	Serinoprotease	1345,055	26426,1835	17	25,32	517,87
45	P81824	VSP1_BOTJA	Serinoprotease	2522,373	26426,1835	17	29,96	504,64
46	Q5XUW8	VM2IA_BOTIN	Metaloprotease	984,8931	54567,6711	33	33,19	483,14
47	tr	F2Q6F6	CRISP	1561,323	27683,861	17	38,75	469,38
48	tr	F2Q6F6	CRISP	2102,078	27683,861	17	27,08	469,12
49	Q8UVG0	VM3BE_BOTER	Metaloprotease	706,4154	70812,8839	41	31,54	455,69
50	P86970	LECG_BOTPA	Lectina tipo C	3379,374	16736,5093	15	63,7	412,02
51	C5H5D4	VM33_BOTAT	Metaloprotease	247,8344	48223,6991	25	25,12	371,95
52	C5H5D4	VM33_BOTAT	Metaloprotease	234,6599	48223,6991	25	21,5	371,78
53	Q072L6	VSPL_BOTAS	Serinoprotease	784,404	28703,2317	22	23,94	366,32
54	Q98SP2	VM2J2_BOTJA	Metaloprotease	1950,857	54752,2081	40	36,69	351,64
55	P20474	PA2B3_BOTAS	PLA ₂	3134,686	16549,8817	13	50,72	340,90
56	Q5XUW8	VM2IA_BOTIN	Metaloprotease	1078,719	54567,6711	33	25,42	337,36
57	Q072L5	VM2_BOTAS	Metaloprotease	2445,056	54818,8587	34	29,35	302,86

58	P0DL30	LECG_BOTPI	Lectina tipo C	1249,267	16630,4256	14	43,7	302,60
59	P81824	VSP1_BOTJA	Serinoprotease	1213,466	26426,1835	17	29,96	265,32
60	Q8UVG0	VM3BE_BOTER	Metaloprotease	779,48	70812,8839	41	34,64	265,30
61	P84907	VM1LA_BOTLC	Metaloprotease	962,858	23361,5015	18	36,63	263,84
62	tr	F2Q6F6	CRISP	1594,97	27683,861	17	16,25	257,75
63	Q8UVG0	VM3BE_BOTER	Metaloprotease	618,1521	70812,8839	41	19,28	250,13
64	P0DL30	LECG_BOTPI	Lectina tipo C	1923,683	16630,4256	14	45,93	250,09
65	Q98UF9	VM3H3_BOTJA	Metaloprotease	697,2106	69862,4565	38	14,85	249,31
66	P00330	ADH1_YEAST	ADH	1501,283	37305,4483	25	54,02	240,00
67	P00330	ADH1_YEAST	ADH	1071,225	37305,4483	25	52,87	240,00
68	P00330	ADH1_YEAST	ADH	1146,398	37305,4483	25	52,59	240,00
69	C5H5D3	VM32_BOTAT	Metaloprotease	423,2665	48299,0039	31	14,59	208,38
70	Q98SP2	VM2J2_BOTJA	Metaloprotease	876,8127	54752,2081	40	32,7	174,22
71	tr	E3UJL5	Metaloprotease	335,8781	37509,6261	23	25,08	166,05
72	Q7T229	VSPH_BOTJR	Serinoprotease	485,9406	29338,4229	19	35,38	160,29
73	P82114	PA2H1_BOTMO	PLA ₂	2422,184	14536,3631	12	54,55	159,98
74	Q7T229	VSPH_BOTJR	Serinoprotease	626,214	29338,4229	19	32,69	159,13
75	P0DL30	LECG_BOTPI	Lectina tipo C	1786,227	16630,4256	14	45,93	144,81
76	Q9YIB5	QPCT_BOTJA	GPC	336,1926	42489,4486	25	45,92	137,87
77	Q072L5	VM2_BOTAS	Metaloprotease	1567,861	54818,8587	34	24,74	137,07
78	Q9YIB5	QPCT_BOTJA	GPC	266,2122	42489,4486	25	35,87	133,09
79	B1A4Q0	PLI10_BOTMO	Inibidor de PLA₂	459,4024	18723,1541	11	35,54	110,63
80	Q8QG89	VM1B_BOTIN	Metaloprotease	1997,911	46727,4993	33	22,49	94,88
81	C5H5D4	VM33_BOTAT	Metaloprotease	144,7711	48223,6991	25	14,98	91,57
82	Q7T229	VSPH_BOTJR	Serinoprotease	989,9744	29338,4229	19	24,62	89,65
83	Q9YIB5	QPCT_BOTJA	GPC	315,7842	42489,4486	25	32,88	78,71
84	Q90W38	NGFV_BOTJR	Fator de crescimento neural	470,2532	27617,8881	21	43,98	69,10
85	tr	E3UJL5	Metaloprotease	242,5654	37509,6261	23	13,48	55,48
86	Q072L5	VM2_BOTAS	Metaloprotease	1499,969	54818,8587	34	27,46	43,10
87	P86975	PA2HB_BOTLC	PLA ₂	11940,27	14515,387	16	72,73	27,33
88	tr	A8I4K2	Inibidor de PLA₂	86,375	23177,6505	14	16	20,11

89	P86975	PA2HB_BOTLC	PLA ₂	14810,08	14515,387	16	62,81	16,56
90	C5H5D2	VM31_BOTAT	Metaloprotease	188,6063	48310,153	26	11,82	12,15
91	C5H5D2	VM31_BOTAT	Metaloprotease	212,2383	48310,153	26	15,37	11,15
92	Q8QG89	VM1B_BOTIN	Metaloprotease	2622,054	46727,4993	33	15,16	9,82
93	Q7T1T4	VM1B2_BOTJR	Metaloprotease	1078,793	42470,3328	31	21,14	7,00
94	P24605	PA2H2_BOTAS	PLA ₂	12390,91	16307,6712	16	61,31	5,70
95	O13069	VSP2_BOTJA	Serinoprotease	104,4801	28578,758	15	17,51	4,87
96	P86976	VM1B1_BOTBA	Metaloprotease	3478,514	21322,1561	14	21,29	3,80
97	P86976	VM1B1_BOTBA	Metaloprotease	2647,63	21322,1561	14	21,29	3,10
98	O93523	VM3BP_BOTJA	Metaloprotease	2519,962	70437,186	42	24,92	2,21
99	Q6QX33	LECG_BOTIN	Lectina tipo C	3362,892	19149,4378	16	42,41	2,02
100	Q9PRY7	LEC_BOTJA	Lectina tipo C	2054,842	16661,4855	15	52,59	1,73
101	tr	X2L4E2	LAAO	27249,61	56747,8898	46	41,16	
102	P0DI89	OXLA_BOTLC	LAAO	23075,71	3563,7846	3	66,67	
103	P0CC17	OXLA_BOTAT	LAAO	12469,53	13700,2195	11	55,46	
104	P86453	PA2HB_BOTAL	PLA ₂	12375,5	14695,503	16	57,85	
105	P82287	PA2H2_BOTPI	PLA ₂	9929,66	14542,4126	16	66,12	
106	P58399	PA2H1_BOTPI	PLA ₂	9929,66	14527,3979	15	66,12	
107	Q90249	PA2B1_BOTJR	PLA ₂	9929,66	16295,6627	16	58,39	
108	P0C616	PA2HA_BOTAS	PLA ₂	8511,7	16486,7971	14	46,72	
109	P0DMK0	PA2H2_BOTMT	PLA₂	8490,179	3137,5057	3	53,57	
110	tr	I6L8L6	PLA ₂	6094,108	14648,4479	16	72,13	
111	Q9PVE3	PA2H3_BOTAS	PLA ₂	6002,107	16357,7287	16	52,9	
112	Q6JK69	PA2H1_BOTAT	PLA ₂	3712,327	16381,6822	16	55,8	
113	Q9IAT9	PA2H_BOTPA	PLA ₂	3548,857	14412,2225	15	60,83	
114	P81165	PA2H2_CERGO	PLA ₂	3548,331	14512,2888	13	25,62	
115	Q8UVU7	PA2HB_CERGO	PLA ₂	3523,874	16313,569	13	18,25	
116	P82950	PA2HB_ATRNM	PLA₂	3523,874	14510,1874	13	19,01	
117	tr	I2DAL6	PLA ₂	3314,918	16636,1093	18	36,23	
118	Q8QG88	VM36A_BOTIN	Metaloprotease	2551,085	70508,2648	42	33,93	

119	P0DM53	LECG_BOTAT	Lectina tipo C	2011,362	9470,6499	8	50,65	
120	P0DJ86	VSPL_BOTLC	Serinoprotease	1544,22	25107,3853	14	27,71	
121	P31989	VM2JC_BOTJA	Metaloprotease	1288,691	18581,2636	10	16,15	
122	tr	E3UJM0	Metaloprotease	1264,359	35980,9456	18	17,89	
123	Q7T1T4	VM1B2_BOTJR	Metaloprotease	1199,591	42470,3328	31	20,6	
124	P0DL29	VM1_BOTPI	Metaloprotease	1179,818	20367,1337	20	18,69	
125	P83512	VM1B1_BOTAS	Metaloprotease	971,4989	46505,9805	30	25,25	
126	Q5XUW8	VM2IA_BOTIN	Metaloprotease	919,3168	54567,6711	33	9,24	
127	tr	E3UJL3	Metaloprotease	909,0942	27623,0694	19	16,05	
128	Q1PHZ4	VM3B1_BOTJR	Metaloprotease	814,8313	63923,7556	34	9,14	
129	tr	Q7T1T3	Metaloprotease	803,5037	27970,9862	13	13,99	
130	P86092	VM3LB_BOTLC	Metaloprotease	729,4852	38143,8801	23	9,57	
131	B1A4P6	PLI3_BOTMO	Inibidor de PLA₂	459,4024	18741,1932	11	25,3	
132	B1A4P9	PLI8_BOTMO	Inibidor de PLA₂	459,4024	18566,9726	12	27,11	
133	B1A4Q3	PLI6_BOTNU	Inibidor de PLA₂	459,4024	18631,0808	12	16,87	
134	B1A4P8	PLI5_BOTMO	Inibidor de PLA₂	459,4024	18567,9573	12	27,11	
135	B1A4P7	PLI4_BOTMO	Inibidor de PLA₂	459,4024	18716,0385	15	27,11	
136	tr	M9NCD2	GPC	258,3169	40700,5537	21	30,79	
137	tr	M9NCR9	GPC	173,9065	41370,3937	22	18,89	
138	O13069	VSP2_BOTJA	Serinoprotease	132,0687	28578,758	15	10,89	
139	tr	A8I4K5	Inibidor de PLA₂	86,375	23191,634	14	16	
140	tr	A8I4M7	Inibidor de PLA₂	69,837	23201,7159	14	11	
141	tr	A8I4M3	Inibidor de PLA₂	69,837	23147,6242	14	11	
142	tr	X2L4E2	LAAO	21718,74	56747,8898	46	27,11	
143	P0DI89	OXLA_BOTLC	LAAO	18716,46	3563,7846	3	66,67	
144	P86975	PA2HB_BOTLC	PLA ₂	9918,663	14515,387	16	66,94	
145	P86453	PA2HB_BOTAL	PLA ₂	9759,774	14695,503	16	68,6	
146	P24605	PA2H2_BOTAS	PLA ₂	9759,774	16307,6712	16	60,58	
147	P0CC17	OXLA_BOTAT	LAAO	9655,483	13700,2195	11	55,46	
148	P0C616	PA2HA_BOTAS	PLA ₂	7409,33	16486,7971	14	40,15	
149	tr	I6L8L6	PLA ₂	7250,441	14648,4479	16	59,02	

150	Q9PVE3	PA2H3_BOTAS	PLA ₂	7127,757	16357,7287	16	42,75	
151	P82287	PA2H2_BOTPI	PLA ₂	6052,42	14542,4126	16	47,93	
152	P58399	PA2H1_BOTPI	PLA ₂	6052,42	14527,3979	15	47,93	
153	Q90249	PA2B1_BOTJR	PLA ₂	6052,42	16295,6627	16	51,82	
154	P0DMK0	PA2H2_BOTMT	PLA ₂	5110,115	3137,5057	3	53,57	
155	P86976	VM1B1_BOTBA	Metaloprotease	3838,722	21322,1561	14	29,21	
156	Q6JK69	PA2H1_BOTAT	PLA ₂	3709,853	16381,6822	16	49,28	
157	Q8QG88	VM36A_BOTIN	Metaloprotease	3638,236	70508,2648	42	26,23	
158	O93523	VM3BP_BOTJA	Metaloprotease	3638,236	70437,186	42	26,23	
159	Q8UVU7	PA2HB_CERGO	PLA ₂	3420,403	16313,569	13	18,25	
160	Q9IAT9	PA2H_BOTPA	PLA ₂	3420,403	14412,2225	15	53,33	
161	Q9PRY7	LEC_BOTJA	Lectina tipo C	3354,532	16661,4855	15	45,19	
162	P0DM53	LECG_BOTAT	Lectina tipo C	3336,458	9470,6499	8	50,65	
163	tr	I2DAL6	PLA ₂	2976,415	16636,1093	18	36,23	
164	Q8QG89	VM1B_BOTIN	Metaloprotease	2859,669	46727,4993	33	22,25	
165	P83519	LECG_BOTJR	Lectina tipo C	2766,628	19280,5161	16	54,09	
166	P0DJ86	VSPL_BOTLC	Serinoprotease	2562,845	25107,3853	14	20,78	
167	P45881	PA2B2_BOTJR	PLA₂	2180,338	16563,7811	13	45,65	
168	P31989	VM2JC_BOTJA	Metaloprotease	1399,275	18581,2636	10	32,3	
169	tr	E3UJM0	Metaloprotease	1289,802	35980,9456	18	17,89	
170	Q7T1T4	VM1B2_BOTJR	Metaloprotease	1240,522	42470,3328	31	17,62	
171	P0DL29	VM1_BOTPI	Metaloprotease	1229,984	20367,1337	20	15,66	
172	P83512	VM1B1_BOTAS	Metaloprotease	1114,225	46505,9805	30	25,98	
173	Q98SP2	VM2J2_BOTJA	Metaloprotease	1034,021	54752,2081	40	32,7	
174	P86092	VM3LB_BOTLC	Metaloprotease	491,0099	38143,8801	23	8,33	
175	C5H5D3	VM32_BOTAT	Metaloprotease	353,6549	48299,0039	31	1,91	
176	tr	M9NCD2	GPC	274,6013	40700,5537	21	20,9	
177	tr	M9NCR9	GPC	210,3416	41370,3937	22	10,28	
178	tr	X2L4E2	LAAO	25740,29	56747,8898	46	29,52	
179	P0DI89	OXLA_BOTLC	LAAO	22975,28	3563,7846	3	66,67	
180	P86453	PA2HB_BOTAL	PLA ₂	11828,58	14695,503	16	64,46	

181	P24605	PA2H2_BOTAS	PLA ₂	11828,58	16307,6712	16	56,93	
182	P0CC17	OXLA_BOTAT	LAAO	10229,44	13700,2195	11	55,46	
183	P82287	PA2H2_BOTPI	PLA ₂	8397,59	14542,4126	16	71,07	
184	P58399	PA2H1_BOTPI	PLA ₂	8397,59	14527,3979	15	71,07	
185	Q90249	PA2B1_BOTJR	PLA ₂	8397,59	16295,6627	16	56,93	
186	P0C616	PA2HA_BOTAS	PLA ₂	7969,026	16486,7971	14	49,64	
187	tr	I6L8L6	PLA ₂	7897,988	14648,4479	16	59,02	
188	Q9PVE3	PA2H3_BOTAS	PLA ₂	7815,476	16357,7287	16	48,55	
189	P0DMK0	PA2H2_BOTMT	PLA ₂	6978,525	3137,5057	3	53,57	
190	Q6JK69	PA2H1_BOTAT	PLA ₂	4498,401	16381,6822	16	55,8	
191	Q9IAT9	PA2H_BOTPA	PLA ₂	4384,479	14412,2225	15	59,17	
192	Q8UVU7	PA2HB_CERGO	PLA ₂	4343,837	16313,569	13	18,25	
193	tr	A8E2V7	PLA₂	3270,832	14303,0789	11	12,4	
194	tr	I2DAL6	PLA ₂	3151,562	16636,1093	18	36,23	
195	G3DT18	PA2A_BOTMO	PLA₂	3107,799	16478,1271	13	17,39	
196	P86907	PA2A_BOTAM	PLA ₂	3092,75	14666,0531	13	9,02	
197	Q8QG88	VM36A_BOTIN	Metaloprotease	2519,962	70508,2648	42	24,92	
198	tr	E3UJM0	Metaloprotease	2269,416	35980,9456	18	21,09	
199	Q9PRY7	LEC_BOTJA	Lectina tipo C	2210,773	16661,4855	15	43,7	
200	P0DM53	LECG_BOTAT	Lectina tipo C	2190,39	9470,6499	8	51,95	
201	P31989	VM2JC_BOTJA	Metaloprotease	1929,03	18581,2636	10	22,36	
202	Q1PHZ4	VM3B1_BOTJR	Metaloprotease	1757,041	63923,7556	34	13,16	
203	P0DJ86	VSPL_BOTLC	Serinoprotease	1711,691	25107,3853	14	27,71	
204	P0DL29	VM1_BOTPI	Metaloprotease	1059,19	20367,1337	20	13,64	
205	P83512	VM1B1_BOTAS	Metaloprotease	948,983	46505,9805	30	25,74	
206	tr	E3UJL3	Metaloprotease	941,1866	27623,0694	19	30,86	
207	P86092	VM3LB_BOTLC	Metaloprotease	787,0933	38143,8801	23	9,57	
208	C5H5D2	VM31_BOTAT	Metaloprotease	334,2001	48310,153	26	15,6	
209	tr	M9NCD2	GPC	193,2144	40700,5537	21	24,01	
210	tr	M9NCR9	GPC	114,6682	41370,3937	22	13,33	

Tabela 10 - Identificação dos compostos proteicos do **indivíduo 4 (grupo Bm -)** por espectrometria de massas (Synapt G2 HDMS Waters). Os compostos foram organizados por abundância, com maior quantidade de proteína (fmol) até os compostos que não foram quantificados pelo equipamento. **As proteínas exclusivas deste grupo estão destacadas em negrito.**

	Protein entry	Protein Accession	Família	Score	Massa (Da)	Nº peptídeos	Cover (%)	Quantidade (fmol)
1	P20474	PA2B3_BOTAS	PLA ₂	4994,31	16549,8817	13	35,51	2394,014
2	Q9PVE3	PA2H3_BOTAS	PLA ₂	7616,427	16357,7287	16	72,46	2326,285
3	Q6TGQ8	OXLA_BOTMO	LAAO	15042,78	54892,8912	40	62,13	2036,717
4	tr	Q7T1T5	Metaloprotease	4325,393	37862,4562	22	72,34	1456,446
5	B5AR80	OXLA_BOTPA	LAAO	14286,76	57198,7381	45	52,09	1403,874
6	Q9PVE3	PA2H3_BOTAS	PLA ₂	8670,263	16357,7287	16	84,78	1380,57
7	P85314	VM1BI_BOTMO	Metaloprotease	7784,71	23621,5431	22	54,15	1379,831
8	Q6TGQ8	OXLA_BOTMO	LAAO	11171,38	54892,8912	40	63,6	1342,849
9	tr	Q7T1T5	Metaloprotease	6079,092	37862,4562	22	77,2	1270,308
10	P20474	PA2B3_BOTAS	PLA ₂	5178,208	16549,8817	13	63,04	1174,889
11	Q6TGQ8	OXLA_BOTMO	LAAO	13588,5	54892,8912	40	67,15	1155,03
12	P85314	VM1BI_BOTMO	Metaloprotease	9994,713	23621,5431	22	56,59	1134,474
13	Q072L5	VM2_BOTAS	Metaloprotease	5884,186	54818,8587	34	31,66	1077,274
14	Q9PVE3	PA2H3_BOTAS	PLA ₂	8599,687	16357,7287	16	81,16	1071,159
15	Q98UF9	VM3H3_BOTJA	Metaloprotease	2931,357	69862,4565	38	37,13	1068,157
16	B5AR80	OXLA_BOTPA	LAAO	10399,06	57198,7381	45	53,68	1051,898
17	Q5W959	VSP14_BOTJA	PLA ₂	1933,362	28527,143	14	37,6	1039,972
18	Q6TGQ9	OXLA_BOTJR	LAAO	9893,093	56630,92	42	53,52	995,1887
19	P0DJ86	VSPL_BOTLC	Serinoprotease	2539,489	25107,3853	14	51,08	982,0182
20	P0C6S0	VM1B1_BOTPA	Metaloprotease	1635,234	9685,1272	9	59,04	946,7921
21	Q5W959	VSP14_BOTJA	Serinoprotease	2322,338	28527,143	14	34,11	915,5905
22	Q98UF9	VM3H3_BOTJA	Metaloprotease	1796,743	69862,4565	38	40,26	899,2867
23	P20474	PA2B3_BOTAS	PLA ₂	4346,958	16549,8817	13	78,99	898,709
24	Q98SP2	VM2J2_BOTJA	Metaloprotease	2733,38	54752,2081	40	54,09	882,1069
25	tr	Q7T1T5	Metaloprotease	6388,965	37862,4562	22	72,34	835,0806
26	P85314	VM1BI_BOTMO	Metaloprotease	8019,249	23621,5431	22	56,59	820,7703

27	P81824	VSP1_BOTJA	Serinoprotease	3724,982	26426,1835	17	30,8	818,0203
28	P0DJ86	VSPL_BOTLC	Serinoprotease	1960,61	25107,3853	14	41,13	779,7358
29	P82114	PA2H1_BOTMO	PLA ₂	2154,467	14536,3631	12	90,91	779,5951
30	tr	L7VGC1	PLA ₂	2157,495	16364,6979	16	40,88	740,2714
31	P86092	VM3LB_BOTLC	PLA ₂	2317,126	38143,8801	23	40,43	707,5079
32	Q6TGQ9	OXLA_BOTJR	LAAO	8295,397	56630,92	42	60,36	689,9355
33	B5AR80	OXLA_BOTPA	LAAO	13095,19	57198,7381	45	50,1	653,6777
34	P81824	VSP1_BOTJA	Serinoprotease	4532,454	26426,1835	17	42,62	643,6485
35	Q6TGQ9	OXLA_BOTJR	LAAO	10118,4	56630,92	42	54,93	619,6258
36	Q072L5	VM2_BOTAS	Metaloprotease	6845,085	54818,8587	34	29,77	605,0378
37	Q072L6	VSPL_BOTAS	Serinoprotease	818,1317	28703,2317	22	45,17	593,9424
38	Q072L5	VM2_BOTAS	Metaloprotease	5131,75	54818,8587	34	30,4	580,5728
39	Q98UF9	VM3H3_BOTJA	Metaloprotease	2164,953	69862,4565	38	38,45	575,7016
40	Q072L6	VSPL_BOTAS	Serinoprotease	1009,163	28703,2317	22	51,35	570,9783
41	Q5W959	VSP14_BOTJA	Serinoprotease	2180,731	28527,143	14	38,76	562,001
42	P0DJ86	VSPL_BOTLC	Serinoprotease	2595,565	25107,3853	14	51,08	553,4377
43	Q98SP2	VM2J2_BOTJA	Metaloprotease	2236,2	54752,2081	40	50,1	551,2728
44	P81824	VSP1_BOTJA	Serinoprotease	5067,339	26426,1835	17	47,68	503,7245
45	P86970	LECG_BOTPA	Lectina tipo C	718,1734	16736,5093	15	61,48	486,8954
46	Q98SP2	VM2J2_BOTJA	Metaloprotease	3478,597	54752,2081	40	45,7	485,8924
47	C5H5D4	VM33_BOTAT	Metaloprotease	801,5054	48223,6991	25	28,02	484,8581
48	P86092	VM3LB_BOTLC	Metaloprotease	4083,252	38143,8801	23	46,91	395,7219
49	Q8UVG0	VM3BE_BOTER	Metaloprotease	2642,761	70812,8839	41	38,89	384,6836
50	P86092	VM3LB_BOTLC	Metaloprotease	3057,52	38143,8801	23	48,77	381,1406
51	Q8UVG0	VM3BE_BOTER	Metaloprotease	1358,133	70812,8839	41	29,41	380,7534
52	Q072L6	VSPL_BOTAS	Serinoprotease	906,9098	28703,2317	22	23,94	379,4578
53	tr	F2Q6F6	CRISP	1466,967	27683,861	17	37,92	342,961
54	Q9I9R4	VM1N_BOTPA	Metaloprotease	1692,247	22809,6526	17	34,85	310,6717
55	C5H5D4	VM33_BOTAT	Metaloprotease	1200,73	48223,6991	25	41,55	281,5157
56	tr	L7VGC1	PLA ₂	3023,359	16364,6979	16	54,74	269,8579
57	tr	L7VGC1	PLA ₂	3689,461	16364,6979	16	59,12	266,5723

58	tr	F2Q6F6	CRISP	1590,036	27683,861	17	51,67	259,4805
59	C9DPL5	PA2A1_BOTPI	PLA₂	2133,094	14434,7232	16	68,03	254,2464
60	C5H5D2	VM31_BOTAT	Metaloprotease	330,9706	48310,153	26	17,97	251,7816
61	Q8UVG0	VM3BE_BOTER	Metaloprotease	1097,431	70812,8839	41	31,21	238,25
62	Q9YIB5	QPCT_BOTJA	GPC	684,8379	42489,4486	25	42,39	223,6474
63	Q7T229	VSPH_BOTJR	Serinoprotease	1021,616	29338,4229	19	48,85	217,5347
64	C5H5D4	VM33_BOTAT	Metaloprotease	879,0256	48223,6991	25	30,68	206,0263
65	Q7T229	VSPH_BOTJR	Serinoprotease	836,9051	29338,4229	19	39,62	204,4481
66	P83512	VM1B1_BOTAS	Metaloprotease	2400,599	46505,9805	30	37,25	199,4122
67	tr	F2Q6F6	CRISP	1668,996	27683,861	17	42,92	196,1146
68	Q9YIB5	QPCT_BOTJA	GPC	705,3961	42489,4486	25	44,29	191,7436
69	P82114	PA2H1_BOTMO	PLA ₂	2968,303	14536,3631	12	80,99	189,3396
70	P83512	VM1B1_BOTAS	Metaloprotease	2460,563	46505,9805	30	37,75	181,4061
71	Q7T1T4	VM1B2_BOTJR	Metaloprotease	3008,357	42470,3328	31	63,96	177,6154
72	C5H5D2	VM31_BOTAT	Metaloprotease	580,4996	48310,153	26	26,24	158,2834
73	C5H5D2	VM31_BOTAT	Metaloprotease	501,0369	48310,153	26	27,66	156,2838
74	P83512	VM1B1_BOTAS	Metaloprotease	2299,78	46505,9805	30	38,73	135,0756
75	Q7T229	VSPH_BOTJR	Serinoprotease	677,1739	29338,4229	19	37,69	130,4662
76	Q7T1T4	VM1B2_BOTJR	Metaloprotease	2572,885	42470,3328	31	54,47	126,2875
77	Q5XUW8	VM2IA_BOTIN	Metaloprotease	1917,102	54567,6711	33	25,42	125,7685
78	tr	K4LLQ2	Metaloprotease	977,8209	28269,0166	23	36,55	122,8856
79	P86907	PA2A_BOTAM	PLA ₂	2153,38	14666,0531	13	51,64	121,4519
80	Q9YIB5	QPCT_BOTJA	GPC	590,9632	42489,4486	25	40,49	121,3001
81	Q9PRY7	LEC_BOTJA	Lectina tipo C	933,9439	16661,4855	15	85,19	116,0215
82	P82114	PA2H1_BOTMO	PLA ₂	2788,044	14536,3631	12	82,64	96,1345
83	tr	E3UJL5	Metaloprotease	303,4391	37509,6261	23	22,57	76,6437
84	tr	E3UJL5	Metaloprotease	113,3373	37509,6261	23	7,84	69,3287
85	P30431	VM3JA_BOTJA	Metaloprotease	553,7942	66150,0424	37	28,9	55,5917
86	Q9I9R4	VM1N_BOTPA	Metaloprotease	1719,351	22809,6526	17	38,38	51,8427
87	P30431	VM3JA_BOTJA	Metaloprotease	483,0009	66150,0424	37	27,32	49,7085
88	tr	E3UJL5	Metaloprotease	251,9734	37509,6261	23	16,3	44,7786

89	Q90W38	NGFV_BOTJR	Fator de crescimento neural	359,1177	27617,8881	21	41,08	42,2954
90	tr	E3UJL9	Metaloprotease	174,1763	34727,1844	25	26,51	37,8679
91	P30431	VM3JA_BOTJA	Metaloprotease	720,6498	66150,0424	37	30,47	37,737
92	Q1PHZ4	VM3B1_BOTJR	Metaloprotease	4290,645	63923,7556	34	20,11	33,0561
93	Q90W38	NGFV_BOTJR	Fator de crescimento neural	371,9622	27617,8881	21	41,91	32,9783
94	O93523	VM3BP_BOTJA	Metaloprotease	720,8644	70437,186	42	25,41	28,1852
95	Q1PHZ4	VM3B1_BOTJR	Metaloprotease	3681,309	63923,7556	34	21,39	26,1064
96	P82287	PA2H2_BOTPI	PLA ₂	2042,016	14542,4126	16	80,99	24,0232
97	Q1PHZ4	VM3B1_BOTJR	Metaloprotease	5060,751	63923,7556	34	16,82	23,2345
98	P0C6S1	VM1B2_BOTPA	Metaloprotease	234,5638	8008,073	8	52,17	21,0519
99	Q8AXY1	PA2A_BOTJR	PLA ₂	1201,79	16254,0571	14	41,3	21,0387
100	P0CG03	VSPBH_BOTAL	Serinoprotease	243,0654	28672,5037	17	21,54	19,7508
101	P0DL30	LECG_BOTPI	Lectina tipo C	340,5126	16630,4256	14	48,15	17,2528
102	P82287	PA2H2_BOTPI	PLA ₂	3076,019	14542,4126	16	77,69	15,9772
103	P0DL30	LECG_BOTPI	Lectina tipo C	326,3782	16630,4256	14	54,81	14,5326
104	P82287	PA2H2_BOTPI	PLA ₂	2526,865	14542,4126	16	82,64	13,9197
105	P0C6S1	VM1B2_BOTPA	Metaloprotease	164,2037	8008,073	8	26,09	13,8202
106	tr	U5YCR8	Serinoprotease	1137,966	28467,2258	15	12,4	13,6123
107	P0CG03	VSPBH_BOTAL	Serinoprotease	409,0502	28672,5037	17	38,85	12,6918
108	tr	I6L8L6	PLA ₂	7603,745	14648,4479	16	72,95	10,0104
109	tr	I6L8L6	PLA ₂	7599,349	14648,4479	16	79,51	9,7316
110	tr	U5YCR8	Serinoprotease	860,7757	28467,2258	15	19,2	8,677
111	Q7T1T4	VM1B2_BOTJR	Metaloprotease	2581,701	42470,3328	31	57,45	5,3617
112	P24605	PA2H2_BOTAS	PLA ₂	5898,958	16307,6712	16	64,96	4,6049
113	tr	E3UJMO	Metaloprotease	3259,301	35980,9456	18	24,28	2,8683
114	P86453	PA2HB_BOTAL	PLA ₂	6038,171	14695,503	16	69,42	2,5491
115	P0CC17	OXLA_BOTAT	LAAO	7228,982	13700,2195	11	55,46	
116	P24605	PA2H2_BOTAS	PLA ₂	6481,458	16307,6712	16	71,53	
117	tr	X2L4E2	LAAO	6375,418	56747,8898	46	45,38	
118	Q9I834	PA2H2_BOTMO	PLA ₂	6093,506	14685,5085	16	59,02	

119	Q6JK69	PA2H1_BOTAT	PLA ₂	5181,956	16381,6822	16	85,51	
120	P0C616	PA2HA_BOTAS	PLA ₂	3703,668	16486,7971	14	50,36	
121	Q90249	PA2B1_BOTJR	PLA ₂	3076,019	16295,6627	16	62,77	
122	P58399	PA2H1_BOTPI	PLA ₂	3073,809	14527,3979	15	76,86	
123	Q9IAT9	PA2H_BOTPA	PLA ₂	3054,577	14412,2225	15	71,67	
124	P0DL29	VM1_BOTPI	Metaloprotease	2886,297	20367,1337	20	38,89	
125	P86975	PA2HB_BOTLC	PLA ₂	2654,173	14515,387	16	59,5	
126	Q8UVU7	PA2HB_CERGO	PLA ₂	2617,71	16313,569	13	24,82	
127	P84907	VM1LA_BOTLC	Metaloprotease	2131,638	23361,5015	18	20,3	
128	P04971	VSPF_BOTAT	Serinoprotease	1960,61	28872,9522	15	40,39	
129	tr	E3UJL3	Metaloprotease	1845,03	27623,0694	19	28,4	
130	P0C7A9	VM1BJ_BOTJA	Metaloprotease	1825,253	7166,2886	6	35	
131	tr	E3UJL4	Metaloprotease	1821,56	27582,9742	18	10,7	
132	P0DI92	PA2H_BOTMA	PLA₂	1387,063	3619,2098	3	66,67	
133	C9DPL5	PA2A1_BOTPI	PLA ₂	1190,542	14434,7232	16	27,05	
134	Q8QG88	VM36A_BOTIN	Metaloprotease	720,8644	70508,2648	42	25,41	
135	tr	M9NCD2	GPC	578,9258	40700,5537	21	29,1	
136	P0C6S1	VM1B2_BOTPA	Metaloprotease	564,5326	8008,073	8	23,19	
137	C5H5D3	VM32_BOTAT	Metaloprotease	443,1068	48299,0039	31	1,91	
138	tr	M9NCR9	GPC	439,8167	41370,3937	22	21,39	
139	P0CC17	OXLA_BOTAT	LAAO	10570	13700,2195	11	55,46	
140	tr	X2L4E2	LAAO	5805,797	56747,8898	46	48,39	
141	Q9I834	PA2H2_BOTMO	PLA ₂	5780,485	14685,5085	16	55,74	
142	P86453	PA2HB_BOTAL	PLA ₂	5740,322	14695,503	16	61,98	
143	tr	E3UJM0	Metaloprotease	5541,07	35980,9456	18	23,96	
144	Q6JK69	PA2H1_BOTAT	PLA ₂	5115,108	16381,6822	16	69,57	
145	tr	Q7T1T3	Metaloprotease	4997,881	27970,9862	13	19,75	
146	P0C616	PA2HA_BOTAS	PLA ₂	4039,885	16486,7971	14	41,61	
147	P04971	VSPF_BOTAT	Serinoprotease	2595,565	28872,9522	15	48,24	
148	P84907	VM1LA_BOTLC	Metaloprotease	2539,28	23361,5015	18	19,8	
149	Q90249	PA2B1_BOTJR	PLA ₂	2526,865	16295,6627	16	70,8	

150	Q9IAT9	PA2H_BOTPA	PLA ₂	2526,865	14412,2225	15	80,83	
151	P58399	PA2H1_BOTPI	PLA ₂	2520,381	14527,3979	15	81,82	
152	P0DL29	VM1_BOTPI	Metaloprotease	2484,635	20367,1337	20	45,45	
153	Q5XUW8	VM2IA_BOTIN	Metaloprotease	2400,802	54567,6711	33	18,49	
154	P81165	PA2H2_CERGO	PLA ₂	2372,067	14512,2888	13	25,62	
155	P86975	PA2HB_BOTLC	PLA ₂	2368,23	14515,387	16	68,6	
156	Q8UVU7	PA2HB_CERGO	PLA ₂	2335,097	16313,569	13	24,09	
157	tr	E3UJL3	Metaloprotease	2301,739	27623,0694	19	23,87	
158	Q9I8F8	PA2A_BOTPC	PLA₂	2090,143	14530,7277	12	9,02	
159	tr	I2DAL6	PLA ₂	1673,463	16636,1093	18	27,54	
160	tr	E3UJL4	Metaloprotease	1593,386	27582,9742	18	6,58	
161	P0C7A9	VM1BJ_BOTJA	Metaloprotease	1452,463	7166,2886	6	30	
162	P0DI92	PA2H_BOTMA	PLA ₂	1020,799	3619,2098	3	66,67	
163	Q8QG88	VM36A_BOTIN	Metaloprotease	472,4855	70508,2648	42	17,54	
164	O93523	VM3BP_BOTJA	Metaloprotease	472,4855	70437,186	42	17,54	
165	tr	M9NCD2	GPC	467,8899	40700,5537	21	25,14	
166	tr	M9NCR9	GPC	306,5212	41370,3937	22	17,5	
167	Q8QG89	VM1B_BOTIN	Serinoprotease	229,9149	46727,4993	33	13,2	
168	P0CG03	VSPBH_BOTAL	Metaloprotease	216,03	28672,5037	17	24,23	
169	C5H5D3	VM32_BOTAT	Metaloprotease	174,7268	48299,0039	31	1,91	
170	P0CC17	OXLA_BOTAT	LAAO	12539,2	13700,2195	11	55,46	
171	tr	I6L8L6	PLA ₂	6487	14648,4479	16	76,23	
172	tr	X2L4E2	LAAO	5133,889	56747,8898	46	45,18	
173	P24605	PA2H2_BOTAS	PLA ₂	4943,109	16307,6712	16	59,12	
174	tr	E3UJM0	Metaloprotease	4861,899	35980,9456	18	17,25	
175	Q9I834	PA2H2_BOTMO	PLA ₂	4637,81	14685,5085	16	55,74	
176	P86453	PA2HB_BOTAL	PLA ₂	4605,877	14695,503	16	52,07	
177	Q6JK69	PA2H1_BOTAT	PLA ₂	4463,796	16381,6822	16	64,49	
178	P0C616	PA2HA_BOTAS	PLA ₂	3218,875	16486,7971	14	41,61	
179	P84907	VM1LA_BOTLC	Metaloprotease	3212,313	23361,5015	18	17,82	
180	Q5XUW8	VM2IA_BOTIN	Metaloprotease	3199,378	54567,6711	33	24,58	

181	tr	E3UJL3	Metaloprotease	3045,674	27623,0694	19	15,23	
182	P04971	VSPF_BOTAT	Serinoprotease	2539,489	28872,9522	15	47,45	
183	tr	E3UJL4	Metaloprotease	2476,66	27582,9742	18	4,53	
184	P0C7A9	VM1BJ_BOTJA	Metaloprotease	2476,66	7166,2886	6	18,33	
185	P0DL29	VM1_BOTPI	Metaloprotease	2416,723	20367,1337	20	37,37	
186	tr	I2DAL5	PLA₂	2042,167	16203,8081	13	21,01	
187	Q90249	PA2B1_BOTJR	PLA ₂	2042,016	16295,6627	16	65,69	
188	P58399	PA2H1_BOTPI	PLA ₂	2038,526	14527,3979	15	80,17	
189	Q8QG87	PA2A_BOTIN	PLA₂	2037,136	16557,3815	17	32,61	
190	P86389	PA2A2_BOTAS	PLA₂	2037,136	14992,4448	17	25	
191	Q9IAT9	PA2H_BOTPA	PLA ₂	2010,083	14412,2225	15	71,67	
192	P86975	PA2HB_BOTLC	PLA ₂	1736,716	14515,387	16	62,81	
193	Q8UVU7	PA2HB_CERGO	PLA ₂	1706,917	16313,569	13	24,82	
194	tr	I2DAL6	PLA ₂	1587,448	16636,1093	18	34,06	
195	Q9PRY7	LEC_BOTJA	Lectina tipo C	662,4908	16661,4855	15	40,74	
196	tr	M9NCD2	GPC	598,7036	40700,5537	21	25,14	
197	Q8QG88	VM36A_BOTIN	Metaloprotease	542,1469	70508,2648	42	20,98	
198	O93523	VM3BP_BOTJA	Metaloprotease	542,1469	70437,186	42	20,98	
199	P0DI92	PA2H_BOTMA	PLA ₂	508,3299	3619,2098	3	66,67	
200	tr	M9NCR9	GPC	500,299	41370,3937	22	17,5	

Após a análise dos resultados obtidos, foi feita a quantificação dos compostos encontrados em ambas as amostras. A figura 17 mostra a distribuição qualitativa das proteínas presentes no veneno do grupo Bm +. Para tal, foram utilizadas todas as proteínas que apresentaram valores quantitativos obtidos pelo equipamento. E a figura 19 mostra os dados referentes aos resultados obtidos para a amostra do grupo Bm -.

Figura 17 - Composição proteica do veneno de *B. moojeni* do grupo Bm +.

Figura 19 - Composição proteica do veneno de *B. moojeni* do grupo Bm -.

Os valores (em fmol) dos compostos que foram quantificados pelo equipamento estão descritos resumidamente na tabela 11. Com isso, podemos verificar que o indivíduo do grupo Bm + apresenta uma maior quantidade de todas as proteínas descritas até aqui, e também é o único a apresentar inibidores de fosfolipase em sua composição.

Tabela 11 - Distribuição da composição proteica dos venenos dos dois indivíduos (Bm + e Bm -) de *B. moojeni* analisados por espectrometria de massas (Synapt G2 HDMS Waters).

	fmol			
	Bm2 (+)	%	Bm4 (-)	%
Fosfolipase A ₂	22026,66	29,82	13812,42	25,79
Inibidor de Fosfolipase	130,73	0,18	-	-
Lectina Tipo C	2339,40	3,17	634,70	1,19
L-Aminoácido Oxidase	14027,72	18,99	9948,73	18,57
Metaloprotease	24798,01	33,57	19844,60	37,05
Serinoprotease	8921,10	12,08	7909,73	14,77
Outros compostos	1615,02	2,19	1410,52	2,63
Total	73858,64	100	53560,70	100

Também foram realizadas as análises por espectrometria de massas das regiões por volta de 25 kDa das amostras de plasma dos indivíduos, com o intuito de descobrir a composição das proteínas plasmáticas que apresentaram reação com proteínas do veneno dos indivíduos do grupo Bm+ no teste de *Western blotting*. Nesta região foram identificados inibidores de fosfolipases tipo gama, como anteriormente descrito na literatura (SOARES et al., 2003). Os resultados também mostraram a identificação de um fator anti-hemorrágico, o BJ46a (FTE46_BOTJA). Tal fator já foi descrito anteriormente no veneno de *B. jararaca* (VALENTE et al., 2001), mas até o momento não foi encontrado em serpentes da espécie *B. moojeni*.

5 Discussão

Entender completamente como funciona o mecanismo de defesa contra o envenenamento por acidentes ofídicos pode ser uma tarefa complicada. Devido à variedade de proteínas presentes no veneno e seus inúmeros mecanismos de ação, relacionar todas essas variáveis em ação com um organismo vivo é extremamente complexo. Todos os testes utilizados até o momento tiveram como objetivo a caracterização do veneno de *B. moojeni*, e isso pode ajudar a entender como a ação do veneno seria prejudicial aos indivíduos dessa mesma espécie, já que seria natural esperar que os mesmos possuísem defesa contra os compostos produzidos por eles mesmos.

Antes de analisar e discutir os resultados obtidos, é importante ressaltar a alta variabilidade individual que ocorre em indivíduos desta espécie. Alguns dos resultados apresentam flutuações marcantes entre os indivíduos, e como o método de agrupamento dos mesmos para discussão dos resultados se dá por uma maneira, de certa forma, arbitrária (resultado do *overlay*), pode-se observar que, em alguns casos, o desvio padrão do grupo aparece até mesmo maior do que a própria média (como é o caso da DMH do grupo Bm +, em que a média é de 23,24 µg de proteína e seu desvio padrão é de 25,80 µg). Foram usados alguns testes estatísticos, porém o grupo amostral não se encaixa em nenhum caso, o que faz com que a matemática indique que os resultados não apresentam diferença estatística significativa, caso que é observado nos dados a seguir.

A dosagem de proteínas feita pelo método de A₂₈₀ nm mostrou, tanto para as amostras de veneno quanto de plasma, uma homogeneidade na concentração proteica entre todos os indivíduos. Pode-se constatar que o conteúdo proteico total se mantém estável, mesmo que quantidades de uma mesma proteína possam variar de indivíduo para indivíduo, como foi constatado por outros resultados.

O perfil eletroforético das amostras de veneno dos 13 indivíduos utilizados nesse trabalho mostra certa variabilidade na composição proteica dos mesmos, apresentando padrão de bandas repetidas com algumas bandas exclusivas em alguns espécimes (figuras 2 e 3). Como por exemplo, na região de 25 kDa existe uma banda de alta concentração para o indivíduo 3 que não aparece nos outros venenos. Do mesmo modo, uma banda inferior a essa aparece quase que imperceptível neste indivíduo, enquanto se

mostra presente em todos os outros. Também pode-se observar duas intensas bandas com massa molecular por volta de 50 kDa nos indivíduos 2 e 6. Essas bandas são menos evidentes nas outras amostras, mostrando as variações intraespecíficas existentes nesses animais. Esses resultados corroboram trabalhos que mostram que, mesmo comparando indivíduos de uma mesma espécie, podem existir ausências de certas proteínas ou mesmo adição de outras na composição do veneno das serpentes (BORDON et al., 2015). Realmente, as peçonhas das serpentes sofrem inúmeras adaptações em sua composição, com o intuito de tornar a mistura proteica melhor adaptada para o tipo de presa e ambiente em que as serpentes estão inseridas (PRIOR; GIBBS; WEATHERHEAD, 1997). A composição quantitativa e qualitativa das peçonhas está ligada a vários fatores e não pode-se relacionar essa variação diretamente a apenas um fator isolado, como ambiente, sexo, idade ou alimentação (MELGAREJO; CARDOSO; FRANÇA, 2003).

A imunodeteção de proteínas presentes no plasma e veneno, realizada a partir do teste de *Western blotting*, mostrou uma zona de interação peculiar em algumas das amostras testadas. Uma região bem nítida por volta de 25 kDa foi observada nos indivíduos Bm2, Bm6, Bm7, Bm8, Bm9 e Bm13. Extraíndo as bandas dessa região nos géis com amostras de plasma desses indivíduos, a análise por espectrometria de massas as identificou como sendo inibidores de fosfolipases do tipo gama, que são os tipos de inibidores de fosfolipases mais abundantes encontrados em algumas serpentes (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008). Outros indivíduos não apresentaram tal interação, o que permite supor que essas últimas serpentes não apresentam, na composição do seu veneno, fosfolipases que possam interagir com os inibidores presentes no plasma. Quando repetiu-se o mesmo teste, mas cruzando as amostras de plasma com veneno (ou seja, utilizando-se do plasma de um indivíduo com o veneno de outro) pode-se notar que o plasma daqueles indivíduos que anteriormente apresentaram a interação, quando incubados com veneno de um indivíduo Bm -, não mostravam mais tal interação. Logo, pode-se deduzir que o veneno desses indivíduos (que consideramos o grupo Bm +) apresenta fosfolipases exclusivas em sua composição, que por sua vez não estão presentes nos representantes do grupo denominado Bm -. Esse fato leva a acreditar que indivíduos pertencentes ao grupo Bm + teriam um veneno com ação mais potente por possuir proteínas que não estão presentes no veneno de indivíduos do grupo Bm-,

devido a presença de proteínas distintas que reagiram com proteínas do plasma durante este teste.

Para tentar confirmar a hipótese de que haveria na composição desses venenos proteínas distintas que seriam responsáveis por causar a morte dos outros indivíduos em caso de envenenamentos acidentais, foi realizada uma cromatografia líquida de alta performance – fase reversa, utilizando os seguintes venenos: Bm2, pertencente ao grupo Bm +, e Bm4, indivíduo representante do grupo Bm -, com o intuito de comparar o perfil de ambos e verificar a diferença na composição proteica desses venenos. Como foi observado na figura 16, os perfis cromatográficos se mostraram semelhantes apresentando diferenças apenas na altura dos picos, o que mostra quantidades diferentes de proteínas entre os dois venenos testados. Isso leva a sugerir que indivíduos pertencentes ao grupo Bm -, por possuírem pouca quantidade de algumas proteínas teriam uma peçonha menos eficiente quando comparados com algum indivíduo do grupo Bm +. Existem vários trabalhos que abordam a existência e funcionalidade de inibidores de proteínas do veneno em plasmas de várias serpentes de espécies distintas (INOUE et al., 1997; LIZANO et al., 1997; NAHAS et al., 1973; OLIVEIRA et al., 2008, 2011). Porém, neste caso, a presença de uma concentração maior de enzimas poderia superar a presença de inibidores presentes no plasma dos mesmos. Este fato possivelmente contribui para que alguns indivíduos da espécie *B. moojeni* tenham apresentado casos de envenenamento causados por outras serpentes da mesma espécie.

Antes de submeter duas amostras de veneno à digestão por tripsina e análise por espectrometria de massas, foi feita a dosagem de proteínas das amostras pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Esse método foi utilizado devido à sua alta sensibilidade e rapidez, quando comparado a outros métodos colorimétricos (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). Os resultados da espectrometria de massas mostraram uma quantidade maior de compostos para o veneno do grupo Bm + quando em comparação a amostra do grupo Bm -. Sobre esses compostos exclusivos, foram encontrados PLA₂s, metaloproteases, lectinas tipo C, GPCs e CRISPS. Ainda, no grupo Bm + foi observado a presença de inibidores de PLA₂. Em relação aos compostos exclusivos, foram encontradas 23 proteínas no veneno do grupo Bm +. Destas 23, 10 são descritas como inibidores de PLA₂ (quase metade de todo o conteúdo proteico exclusivo). Mesmo não sendo usual, alguns trabalhos já focaram seus estudos em mostrar a presença de inibidores também no veneno, e não só no plasma das serpentes (CASTRO;

FERNANDES; ZINGALI, 1999; DA SILVA, 2006; LIMA et al., 2011; MAGRO et al., 2004; ROKYTA et al., 2012; ZINGALI et al., 1993). No entanto, o papel desses inibidores no veneno não está esclarecido. Enquanto isso, a amostra de veneno do grupo Bm – apresentou na sua exclusividade algumas metaloproteases, PLA₂s e serinoproteases. Contudo, neste grupo não foi identificado nenhum tipo de inibidor. Tal característica pode ser um fator crucial para justificar os acidentes ocorridos até o momento, sendo que indivíduos do grupo Bm - realmente não possuiriam defesa contra proteínas envolvidas com processos causadores de edemas e hemorragias. A presença de inibidores de PLA₂ no veneno da amostra do grupo Bm + e sua ausência no veneno do grupo Bm - também enaltece a diferença entre os venenos dos grupos testados. Também foi observada uma maior variabilidade de proteínas no grupo Bm + quando em comparação ao grupo Bm -. A alta variabilidade destes compostos também pode justificar os efeitos de envenenamento, já que mesmo que o indivíduo acidentado possua inibidores para esses compostos, se forem inoculados com grande quantidade de veneno, maior do que os inibidores poderiam conter, o efeito do envenenamento aconteceria do mesmo modo.

A atividade caseinolítica mostrou a ação proteolítica dos venenos sobre um substrato (caseína). Os resultados mostram que os indivíduos do grupo Bm + possuem uma atividade proteolítica mais elevada que os indivíduos do grupo Bm -. Esses resultados estão em concordância com os obtidos pela espectrometria de massas, uma vez que foi observada uma maior quantidade de proteases no veneno do grupo Bm +. Foi descrito que a *B. moojeni* possui uma atividade proteolítica alta em comparação às outras serpentes do gênero *Bothrops* (ASSAKURA et al., 1985), que corrobora os resultados desse trabalho, já que também foi testado um veneno de *B. jararaca* durante as mesmas análises, com atividade caseinolítica de 494,45 U/min/mg, cerca de 11% inferior ao valor de 558,15U/min/mg obtido para o grupo Bm +.

As zimografias, contendo como substrato tanto a gelatina como a caseína, também corroboram os resultados anteriormente obtidos. Pode-se notar intensas áreas de degradação do gel na região por volta de 30 kDa para todos os venenos analisados. Em especial, uma região de 70 kDa no veneno Bm3 e uma de 45 kDa no veneno Bm5 mostraram-se distintas de todos os outros perfis. Para identificar a qual família pertencem as proteínas com atividade proteolítica, foram utilizados inibidores de proteases (EDTA para metaloproteases e PMSF para serinoproteases) no preparo das

amostras de veneno. Como mostra a figura 8, foi possível observar as mesmas regiões de degradação do substrato. Com isso, é possível concluir que nessas regiões temos a presença tanto de serinoproteases quanto metaloproteases. Devido à massa molecular dessas bandas, possivelmente foram observadas, nessas regiões, metaloproteases do tipo I e serinoproteases (zona de 30 kDa), metaloproteases tipo III (70 kDa no indivíduo Bm3) e tipo II (45 kDa no indivíduo Bm5). Os dados da espectrometria de massas confirmam essa hipótese: ambos os venenos analisados apresentaram quantidades significativas de metaloproteases e serinoproteases em sua composição. Quando observado o padrão de degradação das amostras de *B. moojeni* com a amostra de *B. jararaca* notou-se que a primeira espécie possui uma maior atividade proteolítica. Essa diferença já havia sido observada anteriormente (CAMPOS et al., 2013).

Campos e colaboradores (2013) também compararam as atividades fosfolipásicas e de L-aminoácido oxidases em venenos de *B. moojeni* com as de outras serpentes do mesmo gênero. Esse estudo mostrou que o veneno de *B. moojeni* possui maiores atividades fosfolipásica e de L-aminoácido oxidase que outras espécie desse mesmo gênero. Esse estudo mostrou dados que corroboram este trabalho, em que mais de 50% dos indivíduos de *B. moojeni* mostraram maior atividade fosfolipásica quando comparado aos de *B. jararaca*. E quanto à atividade de LAAO, todos os indivíduos de *B. moojeni* apresentaram maior atividade dessa enzima do que o do veneno de *B. jararaca*, como pode ser observado nas tabelas 6 e 10. As LAAOs atuam como adjuvantes no envenenamento: a liberação de H_2O_2 causa um efeito citotóxico, aumentando a ação de outras proteínas presentes no veneno. São responsáveis por diversas atividades biológicas, incluindo citotoxicidade, necrose tecidual, indução de apoptose, indução e/ou inibição de agregação plaquetária, causando distúrbios hemostáticos. Todas estas atividades estão intimamente relacionadas aos casos de hemorragia, importante no processo de envenenamento (BREGGE-SILVA et al., 2012; IZIDORO et al., 2014; NAUMANN et al., 2011; SOUZA et al., 1999). As fosfolipases, que atuam na bicamada lipídica, desconstruindo a membrana celular, também têm atividades como efeitos neurotóxicos (pré ou pós sinápticos), miotoxicidade, inibição da agregação plaquetária, edema, hemólise, anticoagulação, convulsão e hipotensão (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; OWNBY, 1998). A alta concentração de ambas proteínas está intimamente ligada a alta atividade

hemorrágica presente em alguns indivíduos de *B. moojeni*, principalmente em alguns dos indivíduos do grupo Bm +.

As atividades individuais discutidas acima concordam com os resultados de Dose Mínima Coagulante – Plasma/Fibrinogênio, nos quais foi possível observar (tabelas 2 e 3) que grande parte dos indivíduos do grupo Bm +, que possuem maior quantidade de metaloproteases, serinoproteases, PLA₂s, LAAOs e lectinas tipo C, possuem uma dose mínima coagulante inferior quando comparada aos resultados de alguns dos indivíduos do grupo Bm -. São necessários, em média 23,24 µg/mL de veneno de *B. moojeni* do grupo Bm + para coagular uma amostra de plasma em 60 segundos, enquanto para o grupo Bm - são necessários 58,32 µg/mL. Em contrapartida, a DMC para o fibrinogênio do Bm + foi de 18,42 µg/mL, enquanto o grupo Bm - teve uma dose mais baixa (10,60 µg/mL). Tendo em consideração que ambos os testes têm como princípio a formação de um coágulo de fibrina, que vem da degradação do fibrinogênio pela trombina no último passo da cascata de coagulação sanguínea (THEAKSTON; REID, 1983a), no teste com a solução de plasma proteínas do veneno podem atuar em várias etapas da cascata de coagulação sanguínea. Enquanto com a solução de fibrinogênio apenas o último passo da cascata, ou seja, a degradação do fibrinogênio em fibrina que forma o coágulo em si, sendo por isso mais provável que no segundo caso obtenham-se tempos de coagulação mais curtos. O que poderia explicar o fato de muitos indivíduos do grupo Bm - possuírem menor DMC-F, em comparação a outros indivíduos do grupo Bm +, seria a presença majoritária de proteases tipo trombina (principalmente serinoproteases), que agem diretamente na degradação do fibrinogênio em fibrina, e não em outras etapas da cascata de coagulação.

Ao comparar os resultados obtidos pelos testes de DL50 e DMH, foi possível observar que, enquanto um veneno possui uma dose letal maior e uma menor dose hemorrágica, o inverso foi observado no outro indivíduo que apresentou uma menor dose letal e uma maior dose hemorrágica. Em 2012, Massey e colaboradores (MASSEY et al., 2012) realizaram um estudo em que foi avaliada a variabilidade e severidade do envenenamento por serpentes da espécie *Crotalus scutulatus scutulatus* da região do Arizona, no estado do Texas. Neste estudo foram analisadas amostras de veneno de serpentes de diferentes localidades e foi observado que a letalidade do veneno diminuía quando observados os resultados das amostras da região central para a sudeste. Também foi observado que a composição do veneno desses indivíduos variava

consideravelmente em relação à região da qual eram provenientes, os que pertenciam a região central tinham uma menor concentração de metaloproteases do tipo PI e PIII, enquanto a situação se invertia com os indivíduos da região sudoeste, que apresentavam maiores concentrações dessas proteínas na composição do seu veneno. De uma maneira mais simplificada, venenos com maior concentração de metaloproteases na sua composição se mostram menos letais, enquanto venenos com menores quantidades dessa proteína se mostram mais letais. Considerando-se os resultados obtidos por espectrometria de massas nesse trabalho, pode-se observar que o veneno que apresentou uma DL50 mais efetiva, o *Bm* +, tem uma menor relação total de metaloproteases (33% do veneno bruto) em comparação ao veneno do grupo *Bm* – (37%). Como as metaloproteases estão intimamente relacionadas aos distúrbios hemostáticos, como hemorragias, os venenos que possuem uma maior concentração dessas proteínas apresentam uma atividade hemorrágica mais potente. Essa afirmação concorda com os resultados desse trabalho, em que o indivíduo do grupo *Bm* + teve uma dose letal mais efetiva e uma dose hemorrágica menos eficaz, e o grupo *Bm* – uma dose letal maior, sendo assim menos efetiva, e uma dose hemorrágica com maior eficácia.

Essa variação nas propriedades letais e hemorrágicas do veneno encontrado em *B. moojeni* já foi comprovada por outros estudos (DE ROODT; LITWIN; VIDAL, 2003; MAMEDE et al., 2016; SANCHEZ et al., 1992), ocorre com serpentes de outros gêneros (MENEZES et al., 2006; TANAKA et al., 2010) e também em outras serpentes do gênero *Bothrops* (MENEZES et al., 2006). A *B. jararaca*, por exemplo, apresenta também essa variação quando analisados os venenos de indivíduos adultos e filhotes (GUTIÉRREZ; CHAVES; BOLAÑOS, 1980; SALDARRIAGA et al., 2003). Essa alteração se deve ao fato que o efeito hemorrágico causado por esses venenos é uma característica de metaloproteases do tipo P-III, que são mais abundantes nesses indivíduos em sua fase adulta. O mesmo é observado neste trabalho, em que uma maior quantidade de metaloproteases é encontrada no veneno do grupo *Bm* –, tornando-o assim mais hemorrágico que o outro grupo.

6 Conclusão

As análises bioquímicas e biológicas realizadas neste trabalho mostraram diferenças na composição proteica entre os venenos dos indivíduos pertencentes aos grupos Bm + e Bm -, em que indivíduos do primeiro grupo, em sua maioria, apresentam maior diversidade de proteínas em sua composição, em comparação com indivíduos do segundo grupo. Essa alta variabilidade individual encontrada nesta espécie sugere que alguns indivíduos estão mais suscetíveis aos efeitos causados pelo envenenamento acidental do que outros.

Referências*

- ALAPE-GIRÓN, A. et al. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 8, p. 3556–3571, 2008.
- ANDE, S. R. et al. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, n. 8, p. 1439–1451, 2006.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; DOS SANTOS, M. C. Is the venom related to diet and tail color during *Bothrops moojeni* ontogeny? **Journal of Herpetology**, p. 285–288, 1996.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A 2—a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827–841, 1996.
- AROCAS, V. et al. Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor. **Biochemistry**, v. 35, n. 28, p. 9083–9089, 1996.
- ASSAKURA, M. T. et al. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 691–706, 1985.
- BERNARDE, P. S. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. São Paulo: Anolis Books, 2014. 389 p.
- BERNARDES, C. P. et al. Isolation and structural characterization of a new fibrin (ogen) olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 574–584, 2008.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. [21] Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. **Methods in enzymology**, v. 248, p. 345–368, 1995.
- BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758–1776, 2010.
- BORDON, K. C. F. et al. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, p. 0, 2015.
- BORGES, M. H. et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1863–1869, 2001.
- BORGES, R. C.; ARAÚJO, A. F. B. Seleção de hábitat em duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. neuwiedi* Wagler)(Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, p. 591–601, 1998.
- BRADFORD, M. M. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.
- BREGGE-SILVA, C. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1263–1276, 2012.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BUSBY, W. H. et al. An enzyme (s) that converts glutaminy-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p. 8532–8536, 1987.
- CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063–1074, 2005.
- CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 2009a.
- CALVETE, J. J. et al. Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 1, p. 528–544, 2009b.
- CALVETE, J. J. et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 4, p. 510–527, 2011.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics . Strategy and applications. n. July, p. 1405–1414, 2007.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. [s.l.] Comstock Pub. Associates Ithaca, 2004. v. 1
- CAMPOS, L. B. et al. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 1–10, 2013.
- CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2 ed, 412 p. São Paulo: Sarvier, 2009.
- CASTRO, H. C.; FERNANDES, M.; ZINGALI, R. B. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. **Toxicon**, v. 37, n. 10, p. 1403–1416, 1999.
- CHIPPAUX, J.-P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279–1303, 1991.
- CHU, C.-W. et al. Prey envenomation does not improve digestive performance in Taiwanese pit vipers (*Trimeresurus gracilis* and *T. stejnegeri stejnegeri*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 152, n. 4, p. 579–585, 2009.
- CLEMETSON, K. J. et al. Multifunctional snake C-type lectins affecting platelets. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 31, n. 3-6, p. 148–154, 2001.
- DA SILVA, L. M. **Moojenina'DM INIBIDOR PROTÉICO DA TROMBINA ISOLADO DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops moojeni***. Dissertação (Mestrado em Ciências). UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, , 2006.
- DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 537–540, 1996.
- DE ROODT, A. R.; LITWIN, S.; VIDAL, J. C. Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 949–958, 2003.

- DENNIS, E. A. et al. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 7, p. 2068–2077, 1991.
- DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A 2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 12 out. 2011.
- DOMONT, G. B.; PERALES, J.; MOUSSATCHÉ, H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 29, n. 10, p. 1183–94, jan. 1991.
- DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J. biol. Chem**, v. 263, n. 20, p. 9557–9560, 1988.
- DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002.
- ESTEVAO-COSTA, M. I. et al. Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A(2) inhibitors in Brazilian Bothrops snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 52, n. 1, p. 122–129, jul. 2008.
- FINNEY, D. J. **Probit Analysis: 3. ed.** Cambridge University Press, London 333, 1971.
- 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.
- 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.
- FRANÇA, F. O. DE S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, p. 72–86, 2003.
- FRY, B. G. et al. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 18, p. 2047–2062, 2003.
- FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, v. 15, n. 3, p. 403–420. 2005.
- FRY, B. G.; WÜSTER, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 5, p. 870–883, 2004.
- FURTADO, M. F. **Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* em função da idade das serpentes.** 1987. 118 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.
- GIBBS, H. L. et al. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 2169–2179, 2011.
- GILLISSEN, A. et al. Neurotoxicity, haemostatic disturbances and haemolytic anaemia after a bite by a Tunisian saw-scaled or carpet viper (*Echis “pyramidum”*-complex): failure of antivenom treatment. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 937–944, 1994.

- GUTIÉRREZ, J. et al. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 887–893, 1985.
- GUTIÉRREZ, J. et al. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. **Toxicon**, v. 28, n. 4, p. 419–426, 1990.
- GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. Phospholipase A 2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405–1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper* [culebra, Costa Rica].; Comparative studies of the venom of newborn and adult specimens of *Bothrops asper* [snake, Costa Rica]. **Revista de Biología Tropical (Costa Rica)**..(Dic, v. 28, n. 2, p. 341–351, 1980.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 841–850, 2000.
- HANNA, S. L. et al. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2495–2508, 2000.
- HARLOW, E. D. et al. **Antibodies: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 579 p.
- HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 196–202, fev. 1980.
- HITE, L. A. et al. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, n. 1, p. 182–191, 1994.
- HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 34, n. 10, p. 1149–55, out. 1996.
- INOUE, S. et al. Specificity of two types of phospholipase A2 inhibitors from the plasma of venomous snakes. **IUBMB Life**, v. 41, n. 3, p. 529–537, 1997.
- IZIDORO, L. F. M. et al. Snake venom l-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed research international**, v. 2014, p. 302–321, 2014.
- JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics: Characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 327–338, 2004.
- KAMIGUTI, A. S.; SILVA, M. V; CARDOSO, J. L. C. Destibrinacao do sangue no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 19, n. suppl., p. 28, 1986.
- KELLAWAY, C. H. **The immunity of Australian snakes to their own venoms**. Med. J. Aust, v. 11, p. 35–52, 1931.
- KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. **Analytical biochemistry**, v. 298, n. 1, p. 136–139, 2001.

- KOCHVA, E.; NAKAR, O.; OVADIA, M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **American Zoologist**, v. 23, n. 2, p. 427–430, 1983.
- KONDO, H. et al. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese journal of medical science and biology**, v. 13, n. 1-2, p. 43–51, 1960.
- KOPPERS, A. J.; REDDY, T.; O'BRYAN, M. K. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. **Asian Journal Andrology**, v. 13, n. 1, p. 111–117, 2011.
- KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A 2 enzymes. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 68, p. 3–58, 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.
- LEE, M. L. et al. Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 237–242, 2011.
- LIMA, R. M. et al. Phospholipase A2 inhibitors (β PLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (Crotalinae, Viperidae) snakes. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 57, n. 1, p. 5-172, jan. 2011.
- LIZANO, S. et al. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. **Biochemical Journal**, v. 326, p. 853–859, 1997.
- LIZANO, S. et al. Two Phosphlipases A2 inhibitors from the plasma of cerrophidion (*Bothrops*) godmani which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation molecular cloning and biological properties. **Biochemical Journal**, v. 639, p. 631–639, 2000.
- LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A 2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963–977, 2003.
- MACKESSY, S. P. Fractionation of red diamond rattlesnake (*Crotalus ruber ruber*) venom: protease, phosphodiesterase, L-amino acid oxidase activities and effects of metal ions and inhibitors on protease activity. **Toxicon**, v. 23, n. 2, p. 337–340, 1985.
- MACKESSY, S. P. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. **Copeia**, p. 92–101, 1988.
- MACKESSY, S. P. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern Pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 181–189, 1993.
- MACKESSY, S. P. et al. Venom of the Brown Treesnake, *Boiga irregularis*: ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 537–548, 2006.
- MAGRO, A. J. et al. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A 2 in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 323, n. 1, p. 24–31, 2004.
- MAMEDE, C. C. N. et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops*

- alternatus and Bothrops moojeni snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, v. 117, p. 37–45, 2016.
- MARCUSSI, S. et al. Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, v. 65, p. 9–14, 2013.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749–1800, 1998.
- MASSEY, D. J. et al. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2576–2587, 2012.
- MEBS, D. Snake venom composition and evolution of Viperidae. **Kaupia**, v. 8, p. 145–148, 1999.
- MEBS, D. Toxicity in animals. Trends in evolution? **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 87–96, 2001.
- MELGAREJO, A. R.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S. Serpentes peçonhentas do Brasil. **Cardoso, LC et al. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Savier**, p. 33–61, 2003.
- MENEZ, A. Functional diversification of animal toxins by adaptative evolution. In: MENEZ, A. (ed.). **Perspectives in Molecular Toxinology**. New York: John Wiley & Sons, 2002. p. 401–419.
- MÉNEZ, A.; STÖCKLIN, R.; MEBS, D. “Venomics” or: the venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 255–259, 2006.
- MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304–312, 2006.
- MODAHL, C. M.; DOLEY, R.; KINI, R. M. Venom analysis of long-term captive Pakistan cobra (*Naja naja*) populations. **Toxicon**, v. 55, n. 2, p. 612–618, 2010.
- NAHAS, L. et al. Blood coagulation inhibitor in a snake plasma (*Bothrops jararaca*). **Thrombosis et diathesis haemorrhagica**, v. 30, n. 1, p. 106, 1973.
- NAKASHIMA, K. et al. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 12, p. 5605–5609, 1995.
- NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1810, n. 7, p. 683–694, 2011.
- NOGUCHI, H. **Natural immunity of certain animals from snake venom**. Washington, DC: Carnegie Institute, 1909. 268 p.
- NOGUEIRA, C; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 4, p. 653–659, 2003..
- OHNO, M. et al. Molecular Evolution of Snake Toxins: Is the Functional Diversify of Snake Toxins Associated with a Mechanism of Accelerated Evolution? **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 59, p. 307–364, 1997.

OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v. 41, n. 48, p. 14248–14254, 2002.

OLIVEIRA, C. Z. et al. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1, p. 213–216, 2005.

OLIVEIRA, C. Z. et al. An α -type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, n. 10, p. 1506–1514, 2008.

OVADIA, M.; KOCHVA, E.; MOAV, B. The neutralization mechanism of *Vipera palaestinae* neurotoxin by a purified factor from homologous serum. **Biochimica et biophysica acta**, v. 491, n. 2, p. 86–370. 1977.

OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **Toxin Reviews**, v. 17, n. 2, p. 213–238, 1998.

PÉREZ, J. C.; SÁNCHEZ, E. E. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 5, p. 703–28, maio 1999.

PRIOR, K. A.; GIBBS, H. L.; WEATHERHEAD, P. J. Population genetic structure in the black rat snake: implications for management. **Conservation Biology**, v. 11, n. 5, p. 1147–1158, 1997.

RAW, I. ET AL. Antivenoms in Brazil: preparation, in Handbook of Natural Toxins. **A. T. T. Tu, Editor**, v. Marcel Dek, p. 557–581, 1991.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545–1564, 2006.

RIBEIRO DE QUEIROZ, M. et al. Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 44, n. 4, p. 143–145, 1989.

RICHARDS, D. P.; BARLOW, A.; WÜSTER, W. Toxicon Venom lethality and diet: Differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (*Echis*). **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 110–116, 2012.

RODRIGUES, R. S. et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, n. 4, p. 490–501, 2009.

ROKYTA, D. R. et al. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC genomics**, v. 13, p. 312, jan. 2012.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. **Venomous animals and their venoms**, v. 2, p. 345–384, 1971.

- SALDARRIAGA, M. M. et al. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 405–411, 2003.
- SANCHEZ, E. F. et al. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95–103, 1992.
- SANTOS-FILHO, N. A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908–917, 2008.
- SANZ, L. et al. Venom proteomes of closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent diets. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 9, p. 2098–2112, 2006.
- SASA, M. Diet and snake venom evolution: can local selection alone explain intraspecific venom variation? **Toxicon-Oxford**, v. 37, p. 249–252, 1999.
- 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. 501–510, fev. 2005.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 1115–32, 15 jun. 2005.
- SILLES VILLARROEL, M. Padronização da Titulação da Atividade Tóxica de Venenos Botrópicos em camundongos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 42, p. 311–323, 1978.
- SO, S. et al. Identification of the B Subtype of γ -phospholipase A₂ inhibitor from *Protobothrops flavoviridis* serum and molecular evolution of snake serum phospholipase A₂ inhibitors. **Journal of molecular evolution**, v. 66, n. 3, p. 298–307, 2008.
- SOARES, A. M. et al. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 302, n. 2, p. 193–200, 2003.
- SOUZA, D. H. F. et al. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 368, n. 2, p. 285–290, 1999.
- STÁBELI, R. G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 41, n. 2, p. 132–140, 2007.
- STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, n. 9, p. 1129–1141, 1991.
- STOSCHECK, C. M.; DEUTSCHER, M. P. **Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification**. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1990. v 182, p. 50–68.
- SUHR, S.-M.; KIM, D.-S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 224, n. 1, p.

134–139, 1996.

SUN, M.-Z. et al. Biochemical, functional and structural characterization of Akbul-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 343–349, 2010.

SUNTRAVAT, M.; NUCHPRAYOON, I.; PÉREZ, J. C. Comparative study of anticoagulant and procoagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X). **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 4, p. 544–553, 4 jun. 2010.

TAN, N.-H.; FUNG, S.-Y. Snake venom L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2008.

TANAKA, G. D. et al. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e622, 2010.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **International journal of experimental pathology**, v. 86, n. 2, p. 107–115, 2005.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 949, 1983a.

THEAKSTON, R. D.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 949–56, jan. 1983b.

THOMAS, R. G.; POUGH, F. H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon**, v. 17, n. 3, p. 221–228, 1979.

VALENTE, R. H. et al. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 10, p. 3042–52, maio 2001.

VILCA-QUISPE, A. et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 745–753, 2010.

WARRELL, D. A. Snake venoms in science and clinical medicine. 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 732–40, 1989.

WHITE, J.; MEIER, J. **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Boca Raton: CRC Press, 1995. v. 236, p. 768.

WITTCOFF, H. **The phosphatides**. New York, NY: Reinhold Publishing Corporation, 1951. 638 p.

WÜSTER, W. et al. Population systematics of Russell's viper: a multivariate study. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 47, n. 1, p. 97–113, 1992.

WÜSTER, W. Venomous snake systematics: implications for snakebite treatment and toxinology. **Toxicon**, v. 2, n. 34, p. 143, 1996.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 227–231, 2004.

YAN, J. X. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090–1094, 1995.

Z. OLIVEIRA, C. et al. Structural and Functional Characterization of a γ -Type Phospholipase A2 Inhibitor from Bothrops jararacussu Snake Plasma. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 2509–2519, 1 out. 2011.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of Bothrops jararaca reveals different strategies to deal with prey. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2278–2291, 2010.

ZINGALI, R. B. et al. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from Bothrops jararaca venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, n. 40, p. 10794–10802, 1993.

ZINGALI, R. B.; BIANCONI, M. L.; MONTEIRO, R. Q. Interaction of bothrojaracin with prothrombin. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 31, n. 3-6, p. 273–278, 2001.