CESAR ADOLFO BRAVO TOBAR

Estudo comparativo das características bioquímicas e biológicas do veneno da serpente *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae, Crotalinae) em indivíduos machos e fêmeas irmãos

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

São Paulo
2016

CESAR ADOLFO BRAVO TOBAR

Estudo comparativo das características bioquímicas e biológicas do veneno da serpente *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae, Crotalinae) em indivíduos machos e fêmeas irmãos

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo

Versão Original

São Paulo
2016

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

Reprodução integral

Bravo-Tobar, Cesar Adolfo.

Estudo comparativo das características bioquímicas e biológicas do veneno da serpente *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae, Crotalinae) em indivíduos machos e fêmeas irmãos / Cesar Adolfo Bravo Tobar. – São Paulo, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Venenos de serpentes.

Versão do título para o inglês: Comparative study of the biochemical and biological characteristics of the venom of *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae, Crotalinae) in male and female siblings.

1. Atividade proteolítica 2. *Bothrops atrox* 3. Dimorfismo sexual 4. Proteômica 5. Veneno I. Tanaka Azevedo, Profa. Dra. Anita Mitico II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT III. Título.

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

Candidato: Cesar Adolfo Bravo Tobar

Título da Dissertação: Estudo comparativo das características bioquímicas e biológicas do veneno da serpente *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae, Crotalinae) em indivíduos machos e fêmeas irmãos.

Orientadora: Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado**

() **Reprovado**

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 comparativo das características bioquímicas e biológicas do veneno da serpente *Bothrops atrox* em indivíduos machos e fêmeas", **protocolo nº 1375/15**, sob a responsabilidade de Anita Mitiko Tanaka Azevedo e Cesar Adolfo Bravo Tobar – 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 20/4/2016.

This is to certify that the proposal "Comparative study of the biochemical and biological characteristics of the venom of *Bothrops atrox* in male and female subjects", **protocol nº 1375/15**, under the responsibility of Anita Mitiko Tanaka Azevedo and Cesar Adolfo Bravo Tobar – 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 4/20/2016. 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:	Nº de animais/espécie	Observação
06/2015 - 07/2016 Laboratório de Herpetologia	50 Camundongos Swiss 18-22g (M)	Aditivo de animais - Prorrogação de vigência

São Paulo, 25 de abril de 2016

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

A meu grande tesouro, minha filha Láia, a fonte da minha motivação e autossuperação.

A Angela, pelo amor, companhia, apoio, motivação e paciência nos diversos momentos do nosso caminho percorrido até hoje.

A minha família, mãe, pai e irmão, pelo apoio, compreensão, e pelos ensinamentos que fizeram de mim o que eu sou.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo, pelos ensinamentos e por ter me recebido como seu aluno.

À Dra. Karen Batista de Moraes pela ajuda oferecida durante toda execução do projeto.

Ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por permitir a realização deste trabalho.

À Dra. Kathleen Fernandes Grego, diretora técnica do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela ajuda oferecida em cada ocasião que precisei, além dos espaços de trabalho e lazer.

Ao Dr. Alexandre Keiji Tashima pela análise espectrométrica dos venenos utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna pela sua ajuda na obtenção dos venenos e pelo fornecimento das fotos usadas no trabalho.

Aos colegas do laboratório pela ajuda nos experimentos e as conversas descontraídas.

Ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG), pelo apoio financeiro.

RESUMO

BRAVO-TOBAR, C. A. **Estudo comparativo das características bioquímicas e biológicas do veneno da serpente *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae, Crotalinae) em indivíduos machos e fêmeas irmãos.** 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Devido à natureza tóxica do veneno de serpentes para os humanos, a elucidação das causas da sua variação apresenta importância central para a pesquisa em toxinologia, biotecnologia e farmacologia. Um grande número de espécies de serpentes apresentam mudanças na composição dos venenos relacionadas com o seu desenvolvimento ontogenético e gênero. Assim, o presente projeto visa comparar pela primeira vez as características bioquímicas e biológicas dos venenos da serpente *Bothrops atrox*, em indivíduos machos e fêmeas irmãos, nascidos e mantidos em cativeiro, sob condições controladas, com o propósito de contribuir para o conhecimento das mudanças nas características do veneno de acordo com o sexo. Foram realizados testes com os venenos individuais e com os *pools* de cada sexo. Com relação à caracterização bioquímica, os perfis eletroforéticos tanto das amostras individuais, como dos *pools* de veneno não mostraram diferenças relevantes entre as fêmeas e os machos. Os perfis cromatográficos individuais dos venenos mostraram quatro picos com diferenças de intensidade entre os dois grupos. O *pool* de veneno das fêmeas por análise em nanoESI-qTOF apresentou maior número de proteínas identificadas quando comparado aos machos, sendo que os grupos proteicos mais representativos nos dois grupos de análise foram as metaloproteinases, as serinoproteinases, as fosfolipases A₂ e as lectinas tipo C. Com relação à caracterização biológica, os venenos individuais das fêmeas mostraram maior atividade caseinolítica que os machos. No entanto, nos *pools*, os machos tiveram a média maior que as fêmeas. Os perfis zimográficos, tanto contendo gelatina como caseína, não tiveram diferenças relevantes entre os grupos de análise. A dose mínima coagulante sobre plasma e fibrinogênio do veneno das fêmeas foi maior do que dos machos, tanto para os venenos avaliados individualmente, quanto para os *pools*. Por outro lado, os venenos dos machos, tanto individuais como os *pools*, apresentaram maior atividade fosfolipásica do que o das fêmeas. A atividade de L-aminoácido oxidase não mostrou uma diferença considerável quando os venenos foram analisados individualmente, mas nos *pools* os machos apresentaram cerca de 30% maior comparada à das fêmeas. O *pool* de veneno das fêmeas teve uma maior letalidade do que dos machos. A capacidade hemorrágica do *pool* dos machos foi quase o dobro em relação ao *pool* das fêmeas. A análise estatística, mostrou que, dentro de cada grupo, ocorreram diferenças individuais na concentração de proteínas e na atividade fosfolipásica A₂. Com relação à análise dos *pools* houve diferença na dose mínima coagulante em plasma e fibrinogênio e na atividade L-aminoácido oxidase. Portanto, é possível concluir que existe variação individual em cada grupo de análise, além da diferença na concentração de proteínas, nas atividades fosfolipásica A₂ e L-aminoácido oxidase e na capacidade coagulante entre fêmeas e machos. Os conhecimentos obtidos neste estudo podem auxiliar no caso dos envenenamentos ocasionados por esses animais, bem como no aprimoramento da produção de antisséricos mais efetivos.

Palavras-chave: Atividade proteolítica. *Bothrops atrox*. Dimorfismo sexual. Proteômica. Veneno.

ABSTRACT

BRAVO-TOBAR, C. A. **Comparative study of the biochemical and biological characteristics of the venom of *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae, Crotalinae) in male and female siblings.** 2016. 104 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Due to the toxic nature of the snakes venoms to humans, the elucidation of the causes of its variation has central importance for research in toxinology, biotechnology and pharmacology. A large number of species of snakes have changes in the composition of the venoms related to their ontogenetic development and gender. Thus, this project aims to compare for the first time the biochemical and biological characteristics of the venoms of *Bothrops atrox* snake, male and female individuals, a littermate, born and kept in captivity under controlled conditions, in order to contribute to the knowledge of the changes the poison characteristics according to sex. Tests were performed with single and pools venoms of each sex. Concerning to biochemical characterization, the electrophoretic profiles of both individual, as the venom pool samples showed no significant differences between females and males. The chromatographic profiles of individual venoms showed four peaks with intensity difference between the two groups. The female venom pool by analysis nanoESI-qTOF showed higher number of identified proteins than males, and the most representative protein in both analysis groups were metalloproteinases, serine proteases, phospholipase A₂ and C-type lectins. Regarding the biological characterization, the female individual venoms showed higher caseinolytic activity than males. By contrast, the male pool caseinolytic activity was higher than females. In zimographic profiles, both containing gelatin and casein had no relevant differences between the analysis groups. The minimum coagulant dose of female venoms on plasma and fibrinogen were higher than in males, in both evaluations, individually and pool venoms. On the other hand, venom males, both individual and pools showed higher phospholipase activity than females. The L-amino acid oxidase activity did not show a significant difference when venoms were analyzed individually, but the male pools were approximately 30% higher than to females. The female venom pool had a higher lethality than males. Hemorrhagic capacity of the male pool venom was almost twice of the female pool. Statistical analysis showed that, within each group, there were individual differences in the protein concentration and the phospholipase A₂ activity. Regarding the analysis of the pools there was no difference in minimum coagulant dose in plasma and fibrinogen and L-amino acid oxidase activity. Therefore, we conclude that there is individual variation in each analysis group besides the difference in concentration of proteins, in the phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase activities, and coagulant capacity between females and males. The knowledge obtained in this study may help in case of envenomation caused by these animals, as well as in improving the production of more effective antisera.

Keywords: *Bothrops atrox*. Proteolytic activity. Proteomics. Sexual dimorphism. Venom.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da serpente <i>Bothrops atrox</i> na América do Sul..	23
Figura 2 - Espécimes de <i>B. atrox</i> . Fêmea 0601-10 (a) e macho 0601-27 (b) irmãos, nascidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.....	24
Figura 3 - Curva padrão de soro albumina bovina para a dosagem de proteínas dos venenos de <i>B. atrox</i> utilizada no método do ácido bicinconínico.	43
Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (12%) dos venenos de fêmeas de <i>B. atrox</i> (reduzidos).	45
Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (12%) dos venenos de machos de <i>B. atrox</i> (reduzidos).....	45
Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (12%) dos <i>pools</i> de venenos de fêmeas (F) e machos (M) de <i>B. atrox</i> (reduzidos).....	46
Figura 7 - Eletroforese bidimensional em duplicata dos <i>pools</i> de veneno de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i>	47
Figura 8 - Superposição dos perfis eletroforéticos bidimensionais digitalizados dos <i>pools</i> de fêmeas e machos.....	48
Figura 9 - Cromatografia líquida RP-HPLC dos venenos de fêmeas de <i>B. atrox</i>	49
Figura 10 - Cromatografia líquida RP-HPLC dos venenos de machos de <i>B. atrox</i> ..	51
Figura 11 - Relação porcentual das famílias proteicas encontradas nos venenos de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i>	52
Figura 12 - Zimografia dos venenos de fêmeas de <i>B. atrox</i> , contendo gelatina como substrato, em condições não redutoras..	57
Figura 13 - Zimografia dos venenos de machos de <i>B. atrox</i> , contendo gelatina como substrato, em condições não redutoras..	58
Figura 14 - Zimografia dos <i>pools</i> de venenos de fêmeas (F) e machos (M) de <i>B. atrox</i> , contendo gelatina como substrato, em condições não redutoras.....	58
Figura 15 - Zimografia dos venenos de fêmeas de <i>B. atrox</i> , contendo caseína como substrato, em condições não redutoras..	59
Figura 16 - Zimografia dos venenos de machos de <i>B. atrox</i> , contendo caseína como substrato, em condições não redutoras..	60

Figura 17 - Zimografia dos <i>pools</i> de venenos de fêmeas (F) e machos (M) de <i>B. atrox</i> de, contendo caseína como substrato em condições não redutoras.....	60
Figura 18 - Curva padrão para a quantificação da atividade LAAO dos venenos de <i>B. atrox</i>	65
Figura 19 - Curva padrão utilizada para determinar a DMH dos <i>pools</i> de veneno de <i>B. atrox</i>	68
Figura 20 - Atividade hemorrágica dos <i>pools</i> de veneno de <i>B. atrox</i> induzida via i.d.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informação individual das serpentes utilizadas no projeto.	30
Tabela 2 - Curva padrão de soro de albumina bovina em diferentes diluições utilizada no método do ácido bicinconínico, para a quantificação individual e dos pools de veneno.	42
Tabela 3 - Dosagem de proteínas individualmente e dos <i>pools</i> dos venenos de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i> usando o método do ácido bicinconínico.	44
Tabela 4 - Identificação dos compostos proteicos exclusivos nos venenos das fêmeas e dos machos de <i>B. atrox</i> , por espectrometria de massas (nanoESI-qTOF).	54
Tabela 5 - Atividade proteolítica sobre a caseína dos venenos de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i> individualmente e dos <i>pools</i>	56
Tabela 6 - Dose mínima coagulante dos venenos de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i> , usando plasma humano citratado como substrato.	61
Tabela 7 - Dose mínima coagulante dos venenos de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i> , usando fibrinogênio bovino como substrato.	62
Tabela 8 - Dosagem da atividade PLA ₂ dos venenos de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i>	63
Tabela 9 - Curva padrão de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações, para a quantificação da atividade LAAO individual e dos <i>pools</i> de veneno.	64
Tabela 10 - Dosagem da atividade LAAO dos venenos de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i>	66
Tabela 11 - DL ₅₀ dos <i>pools</i> de veneno de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i>	67
Tabela 12 - Curva padrão para a determinação da DMH individual e dos <i>pools</i> de veneno, elaborada a partir do uso de diferentes quantidades de proteína.	67
Tabela 13 - Valores da DMH dos <i>pools</i> de veneno de fêmeas e machos de <i>B. atrox</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	-Acetonitrila
ADH	-Álcool desidrogenasse
BCA	-Ácido bicinconínico
BSA	-Albumina de soro bovino
CEUAIB	-Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
CRISP	-Proteínas secretoras ricas em cisteína
CTL	-Lectinas tipo C
DL ₅₀	-Dose letal 50%
DMC-F	-Dose mínima coagulante em substrato de plasma fibrinogênio
DMC-P	-Dose mínima coagulante em substrato de plasma
DMH	-Dose mínima hemorrágica
DTT	-Ditiotreitol
G	-Gravidade
HCl	-Ácido clorídrico
IAA	-Iodoacetamida
Id	-Intradérmico
IEF	-Focalização isoeletrica
Ip	-Intraperitoneal
LAO	-L-aminoácido oxidase
MA	-Maranhão
nanoESI-qTOF	-nano Electrospray Quadrupole Time Of Flight Hybrid Mass Spectrometer
NGF	-Fator de crescimento neural
NOBA	-Ácido 4-nitro-3-octanoloxo benzoico
OPD	-O-fenilenodiamina
<i>pI</i>	-Ponto isoeletrico
PLA ₂	-Fosfolipase A ₂
RP-HPLC	-Cromatografia liquida de alta eficiencia de fase reversa
SDS	-Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	-Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato sódico
SVMP	-Metaloproteinase de veneno de serpente

SVSP	-Serinoproteinase de veneno de serpente
TCA	-Ácido tricloroacético
Vs	- Versus
v/v	- Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Serpentes no Brasil	17
1.2	O Gênero <i>Bothrops</i>	18
1.3	<i>Bothrops atrox</i>	22
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAIS	30
3.1	Animais	30
3.1.1	Serpentes	30
3.1.2	Camundongos	31
3.2	Venenos	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	Caracterização Bioquímica dos Venenos	32
4.1.1	Dosagem de proteínas utilizando-se o método do ácido bicinconínico (BCA)	32
4.1.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	32
4.1.3	Eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE)	33
4.1.3.1	<i>Primeira dimensão – focalização isoeletrica (IEF)</i>	33
4.1.3.2	<i>Segunda dimensão – SDS-PAGE</i>	33
4.1.4	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)	34
4.1.5	Espectrometria de massas em nanospray (nanoESI-qTOF)	34
4.1.5.1	<i>Digestão em solução das amostras</i>	35
4.1.5.2	<i>Análises por espectrometria de massas em modo “Data Independent Acquisition”</i>	35
4.1.5.3	<i>Identificações das proteínas por busca em banco de dados</i>	36
4.2	Caracterização Biológica dos Venenos	36
4.2.1	Atividade proteolítica sobre a caseína	36
4.2.2	Zimografia	37

4.2.3 Atividade coagulante dos venenos de <i>B. atrox</i> sobre o plasma humano e fibrinogênio bovino	38
4.2.4 Dosagem da atividade fosfolipásica (PLA ₂)	38
4.2.5 Atividade do L-aminoácido oxidase (LAAO)	39
4.2.6 Dose letal media- DL ₅₀	39
4.2.7 Atividade hemorrágica	40
4.3 Análise Estatística	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Dosagem de Proteínas pelo Método do Ácido Bicinconínico (BCA)	42
5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (SDS-PAGE).....	44
5.3 Eletroforese Bidimensional (2D SDS-PAGE).....	47
5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC).....	49
5.5 Espectrometria de Massas (nanoESI-qTOF).....	52
5.6 Atividade Proteolítica Sobre a Caseína	56
5.7 Zimografia.....	57
5.7.1 Utilizando gelatina como substrato	57
5.7.2 Utilizando caseína como substrato	59
5.8 Atividade Coagulante Sobre o Plasma	61
5.9 Atividade Coagulante Sobre o Fibrinogênio	62
5.10 Dosagem da Atividade Fosfolipásica A₂ (PLA₂)	63
5.11 Atividade da L-aminoácido Oxidase (LAAO)	64
5.12 Dose Letal 50% (DL₅₀).....	66
5.13 Dose Mínima Hemorrágica (DMH)	67
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS*	82
APÊNDICE.....	94
A - Registro total dos compostos encontrados nos <i>pools</i> de veneno de machos e Fêmeas, através da análise em nanoESI-qTOF.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes no Brasil

Atualmente, existem aproximadamente 3500 espécies de serpentes no mundo (WALLACH et al., 2014), distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias (FRANÇA; MALAQUE, 2009), das quais somente 410 são consideradas peçonhentas (FRANQUEIRO, 2007), sendo as florestas neotropicais as regiões nas quais concentra-se o maior número de espécies, variando entre cerca de 50 até 130 por região (DOAN; ARIZÁBAL, 2002; SAVAGE, 2002).

A alta riqueza de fauna de serpentes no Brasil contribui com cerca do 10% do total de espécies, representados em 9 famílias e 75 gêneros (FRANÇA; MALAQUE, 2009). As 375 espécies de serpentes destas famílias, torna o Brasil um detentor importante da riqueza de serpentes no mundo (COSTA; BÉRNILS, 2015). As nove famílias encontradas no Brasil correspondem às: Anomalepididae, Typhlopidae, Leptotyphlopidae, Aniliidae, Tropidopheidae, Boidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae. As duas últimas famílias pertencem ao grupo de serpentes peçonhentas, isto é, aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las, ocasionando intoxicações sérias no homem e em outras espécies animais (MELGAREJO, 2009).

Nas Américas, o principal gênero da família Elapidae é o *Micrurus* e são chamadas de serpentes corais, tendo cerca de 22 espécies reconhecidas na fauna brasileira, enquanto, o gênero *Leptomicrurus* possui apenas três representantes no país (DA SILVA Jr.; SITES Jr., 2001).

A família Viperidae possui cerca de 250 espécies distribuídas pelo mundo. No Brasil, a presença dessa família está representada por cinco gêneros constituídos por aproximadamente 30 espécies, que, juntamente com as subespécies, somam cerca de 36 (MELGAREJO, 2009). Dos gêneros registrados no Brasil, os principais são *Crotalus*, representado pelas cascavéis, *Lachesis*, cujas serpentes são conhecidas como surucucus e *Bothrops*, conhecidas popularmente como jararacas

(ALVES, 2007). Além desses, existem também os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias*, restritas à Amazônia e à Mata Atlântica Brasileira.

A grande diversidade de famílias peçonhentas de serpentes favorece a ocorrência de acidentes ofídicos. Estima-se que a maior parte dos acidentes ofídicos no mundo acontecem na zona tropical e subtropical (GUTIÉRREZ et al., 2006), sendo a população rural envolvida na agricultura a mais afetada.

Na América Latina, os envenenamentos por picadas de serpentes constituem um problema relevante de saúde pública, gerando taxas significantes de morbidade e mortalidade (GUTIÉRREZ, 1995; WARRELL, 2004). 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 (MELGAREJO, 2009).

No Brasil, os envenenamentos causados por serpentes compreendem cerca de 29.000 casos por ano, com uma média de 125 mortes (BERNARDE, 2014). De acordo com as notificações, estes envenenamentos correspondem aos acidentes botrópico (87%), crotálico (9%), laquético (3%) e elapídico (1%) (OLIVEIRA et al., 2009).

1.2 O Gênero *Bothrops*

Pertencendo à família Viperidae, o gênero *Bothrops* é considerado o mais diverso, com serpentes distribuídas desde o sul de México até a Argentina, incluindo algumas ilhas do Caribe (GREENE, 1997). Um estudo realizado por Carrasco et al., (2012) identificou e registrou um total de 42 espécies desse gênero na América do Sul. As serpentes deste gênero vivem em áreas de florestas, matas que margeiam os rios e em alguns casos, em áreas abertas, possuindo hábitos principalmente terrícolas e arborícolas e utilizam o envenenamento como ferramenta para subjugar suas presas (MARQUES; SAZIMA, 2009).

As serpentes deste gênero (jararacas) são encontradas em todo o território brasileiro, com uma diversidade de cerca de 24 espécies (MELGAREJO, 2009), o que representa uma grande porcentagem das espécies totais reportadas até hoje. São reconhecidas principalmente por possuírem a cabeça em forma de lança. O país possui espécies insulares (*B. alcatraz*, *B. insularis*) e as continentais, que exibem uma grande diversidade na sua distribuição, com espécies estritas à Mata Atlântica (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. cotiara*, *B. fonsecai*), outras ligadas à Floresta Amazônica (*B. atrox*, *B. brazili*), e aos campos (*B. alternatus*) entre outros ecossistemas habitados por este gênero (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

Devido ao alto grau de ocupação em diversos habitats, as serpentes do gênero *Bothrops* apresentam um alto interesse científico nos estudos da herpetofauna Sul-Americana, pois são as maiores causadoras de acidentes ofídicos nesta zona do mundo (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Assim, são muito importantes nas investigações relacionadas com acidentes ofídicos, geração de antídotos, problemas de saúde pública e de conservação ecológica.

Na América Latina, a maioria dos envenenamentos por picadas de serpentes tem como responsáveis as diferentes espécies do gênero *Bothrops* (CARDOSO; FAN, 1995; RUSSELL et al., 1997). Como exemplo disso, na Argentina foram registradas, pelas autoridades sanitárias, cerca de 10.000 acidentes anuais por animais peçonhentos (GARCÍA, 2003; SEGRE et al., 2000), dos quais 70% dos acidentes foram ocasionados por serpentes e destes, mais do 95% foram causados por espécies do gênero *Bothrops* (GARCÍA, 2003). Fato semelhante ocorre na América Central, sendo as serpentes do gênero *Bothrops* responsáveis pela maioria dos acidentes (ROJAS et al., 1997; RUSSELL et al., 1997; SASA; VAZQUEZ, 2003).

As serpentes peçonhentas possuem um dos venenos mas complexos da natureza. São constituídos por frações inorgânicas como o sódio, zinco, cálcio e outros íons, e de frações orgânicas como as amins biogênicas, aminoácidos, carboidratos, citratos, nucleotídeos, peptídeos e proteínas, as quais representam cerca de 90% do peso seco do veneno (IWANAGA, 1979; MENALDO et al., 2015). Os compostos proteicos podem ser de caráter enzimático como as

metalo proteinases (SVMPs), fosfolipases A₂ (PLA₂s), L-aminoácido oxidases (LAAOs), serinoproteinases (SVSPs) e hialuronidases (MARKLAND, 1998; MEBS, 2001), assim como caráter não enzimático tais como as lectinas tipo C (CTL), proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP), o fator de crescimento neural (NGF), peptídeos potenciadores de bradiquinina, miotoxinas e peptídeos natriuréticos (WIEZEL et al., 2015).

De modo didático, no veneno botrópico são descritas três atividades fisiopatológicas: proteolítica, mais bem definida como inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica (ROSENFELD, 1971). Essas atividades são extremamente complexas e são atribuídas às várias proteínas que afetam a hemostasia, algumas com atividade enzimática, tais como, PLA₂s, SVMPs e SVSPs, e outras que não possuem atividade enzimática, como as desintegrinas e CTL (BRAUD et al., 2000). No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente e uma única toxina pode apresentar diversas atividades (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

Por exemplo, muitas SVMPs dos venenos de serpentes são responsáveis pelos efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento, originando a hemorragia, consequência da degradação do colágeno e outros componentes da lâmina basal dos vasos capilares, promovendo a ruptura dos capilares, equimoses e sangramentos (ALVES, 2007). Além disso, possuem ação sobre os fatores de coagulação sanguínea, alterando os tempos de coagulação, por atuarem sobre o fibrinogênio, o Fator II, o Fator X (NAHAS et al., 1979) o Fator VIII (NISHIDA et al., 1994), além de inibirem a agregação plaquetária, conduzindo aos sintomas sistêmicos característicos.

Outra manifestação típica da ação dos venenos botrópicos é a aparição de edema local sempre acompanhado de dor, podendo variar sua intensidade. Esta manifestação clínica acontece por uma série provável de elementos, tais como a ação direta do veneno sobre a microvasculatura, junto com a liberação de histamina, prostaglandinas, cianinas, C3a e C5a que são mediadores endógenos (TAMBOURGI et al., 1992). Eventualmente, o edema pode estar acompanhado de elevação da pressão hidrostática nos compartimentos musculares, favorecendo o

dano em artérias, causando por sua vez, trombose, isquemia e necrose futura (ALVES, 2007).

Somada às atividades anteriores, a mionecrose local é uma consequência comum dos venenos botrópicos pela ação das miotoxinas, que são geralmente definidas como componentes proteicos naturais, geralmente pequenos, que induzem danos às fibras musculares (FRANQUEIRO, 2007). As miotoxinas são uma família de proteínas que possuem características de PLA₂s e atuam diretamente sobre a membrana plasmática da célula muscular (GUTIÉRREZ; CERDAS, 1984), originando as denominadas lesões delta. Acredita-se que, por afetarem drasticamente a microvasculatura, essas toxinas impedem a irrigação adequada de sangue, necessária para o processo de regeneração (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

Deste modo, alguns destes complexos enzimáticos ou proteínas presentes nos venenos botrópicos podem ser constituídos por um grupo molecular heterogêneo, com diversas propriedades físicas e bioquímicas, nas quais se encontram as glicoproteínas, com presença ou ausência de atividades enzimáticas (KINI, 1990).

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 PLA₂s, e à estrutura molecular dos precursores de SVMPS, que permite padrões de processamento variáveis e consequentemente, estruturas proteicas variáveis (FOX; SERRANO, 2008; NAKASHIMA et al., 1995). Estas características resultam em proteínas de uma mesma família de toxinas com propriedades biofísicas e bioquímicas diversas e com diferentes atividades biológicas, como ilustrado pela família das SVSPs, que apresenta enzimas com estruturas primárias similares, mas com diferentes níveis de glicosilação, massas moleculares, pontos isoelétricos e especificidades sobre substratos macromoleculares (SERRANO et al., 2005).

Os venenos botrópicos apresentam variações ontogenéticas e interpopulacionais. Estas variações podem estar relacionadas com os hábitos alimentares, sendo um exemplo disso a análise do conteúdo estomacal da *Bothrops atrox* (*B. atrox*), demonstrando a preferência dos filhotes em se alimentar de anfíbios e lagartos (MARTINS; GORDO, 1993). As proteínas do veneno de serpentes estão sujeitas à evolução acelerada (OHNO et al., 1998) e a variabilidade na composição do veneno entre gêneros, espécies, subespécies, populações e indivíduos confere às serpentes a capacidade de se adaptar aos diferentes nichos ecológicos (GIBBS et al., 2011).

1.3 *Bothrops atrox*

Pertencendo ao gênero *Bothrops*, a serpente *B. atrox* é uma serpente terrestre, geralmente noturna e muito adaptável, encontrada em planícies tropicais e florestas tropicais até 1200 metros sobre o nível do mar, do norte da América do Sul ao leste dos Andes, incluindo o sul e o leste da Venezuela, sudeste da Colômbia, leste do Equador, leste do Peru, norte da Bolívia, a metade norte do Brasil, e em toda a Guiana, Suriname e Guiana Francesa (CAMPBELL; LAMAR, 2004) (Figura 1).

A espécie caracteriza-se por ter a cauda curta com uma escama terminal pontiaguda (PATIÑO; BLANCA, 2002), cabeça em forma de ponta de lança, exibindo no dorso um padrão ornamental consistente de blocos retangulares ou trapezoidais, com uma cor que varia de verde-oliva, bege, marrom e cinza (Figura 2). Alimenta-se basicamente de presas pequenas, tais como, roedores e lagartos (CARRILLO; ICOCHEA, 1995). É uma serpente ágil e ativa, cujo comprimento pode superar 1,5 m.

B. atrox é considerada uma espécie muito perigosa e uma das principais causadoras de mortes humanas, mais do que qualquer outro réptil Sul-americano (WARRELL, 2004). Na Colômbia, juntamente com *B. asper*, são causadoras de cerca de 70-90% dos acidentes ofídicos registrados anualmente (SALDARRIAGA et al., 2003; SILVA, 1989). No leste dos Andes, são atribuídos a esta espécie 58% dos acidentes ofídicos (SMALLIGAN et al., 2004). A frequência de encontros acidentais

com *B. atrox* nas florestas tropicais, localizadas na zona leste do Peru, ocorre entre 85 e 90% (OROPEZA et al., 2000; ZAVALITA; SALAS, 1996).

Sendo uma das serpentes mais abundantes no vale amazônico (MELGAREJO, 2009), a *B. atrox* é uma das principais responsáveis pelos acidentes ofídicos nesta região. Sendo o principal responsável pelos quase 3500 acidentes ofídicos registrados anualmente na Amazônia Brasileira (DE OLIVEIRA PARDAL et al., 2004; Ministério da Saúde, 1998). Um levantamento epidemiológico de cerca de 50 anos sobre acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, no Amazonas, mostrou que a serpente *B. atrox* é responsável por cerca de 45% desses acidentes (WALDEZ; VOGT, 2009). A mortalidade estimada entre seringueiros e povos indígenas da floresta amazônica chega a uma taxa de 400 por cada 100.000 habitantes (PIERINI et al., 1996).

Figura 1 - Distribuição geográfica da serpente *Bothrops atrox* na América do Sul. (Fonte: <http://www.bothrops-theultimatepitviper.com/especies/especie-Bothrops-atrox.html>) (área marrom do mapa).

Figura 2 - Espécimes de *B. atrox*. Fêmea 0601-10 (a) e macho 0601-27 (b) irmãos, nascidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. (Fonte: Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna).

O veneno de *B. atrox* possui principalmente uma ação local, compreendendo atividade proteolítica, edema e mionecrose, ao passo que sua ação sistêmica é hipotensora, hemorrágica e coagulante (GUEVARA, 2009). Os principais componentes bioativos isolados dessa serpente apresentam atividades proteolítica, esterásica, fibrinolítica, kininogenásica (LOAYZA et al., 1985; PANTIGOSO et al., 1996), fosfolipásica, 5' nucleotidase (HEREDIA, 1982) e miotóxica (HUATUCO et al., 2004), sendo os responsáveis principais pelos sintomas clínicos do envenenamento.

Alguns trabalhos nos quais foram caracterizadas as atividades biológicas do veneno de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* mostram que a atividade letal difere de acordo com cada espécie (FURTADO et al., 1991; SANCHEZ et al., 1992). No caso do veneno da *B. atrox*, se caracteriza por ter uma menor toxicidade para a atividade letal, mas é um dos mais ativos para a ação coagulante tipo trombina, além de apresentar intensa atividade nas lesões locais (FURTADO et al., 1991), conjuntamente com uma pronunciada atividade hemorrágica e mionecrótica (DE SOUZA, 2008). Além da variação interespecíes, no veneno da *B. atrox* também é possível identificar variações interpopulacionais na atividade letal nos venenos procedentes de Manaus e de Balbina-Brasil (ASSAKURA et al., 1992).

Com relação às análises bioquímicas realizadas com o veneno de *B. atrox*, é possível destacar estudos realizados por Zeller; Maritz (1944), nos quais foi detectada a atividade LAAO. Além disso, outros autores também mostraram o isolamento de algumas proteínas, tais como fosfodiesterases (FRISCHAUF; ECKSTEIN, 1973); batroxobina, que é uma enzima coagulante (STOKER; BARLOW, 1976); trombocetina, a qual promove agregação plaquetária (KIRBY et al., 1979; NIEWIAROWSKI et al., 1979); trombolectina (GARTNER et al., 1980); duas possíveis frações de SVMPs, capazes de ativar o fator X da cascata de coagulação (HOFMANN; BOM, 1987); atroxina, responsável pela hemorragia (PANTIGOSO et al., 1996); NGF (KOSTIZA; MEIER, 1996); descrição da presença de duas formas de uma trombina *símile* no veneno da *B. atrox* capaz de clivar fibrinogênio a fibrina (PETRETSKI et al., 2000); hemorraginas (RODRIGUES et al., 2004); uma miotoxina de 27kDa com diversas atividades biológicas (HUATUCO et al., 2004); purificação e caracterização de duas LAAOs presentes no veneno da *B. atrox* do Peru (MANRIQUE, 2005; GUEVARA, 2009); uma flavoproteína com atividade antimicrobiana (LAZO et al., 2007); uma lectina chamada Galatrox (FRANQUEIRO, 2007); uma LAAO chamada LAAO*Batrox* (ALVES, 2007); Batx-I, uma SVMP com atividade hemorrágica e fibrinogenolítica (PATIÑO et al., 2010); uma SVMP chamada atroxlysin-I (SANCHEZ et al., 2010); Botroxase, uma SVMP com atividade fibrinolítica (CINTRA et al., 2012); a caracterização de uma SVMP PIII chamada Bathroxragina (FREITAS DE SOUSA et al., 2015), entre outras.

Além disso, inúmeros outros estudos foram realizados com o veneno da *B. atrox*. Malaga et al., (2000), analisaram as variações proteicas e enzimáticas do veneno com relação à idade das serpentes; Palacios e Zarta (2009), realizaram um estudo da toxicidade dos venenos de animais mantidos em cativeiro; Neiva et al., (2009), geraram um catálogo dos genes transcritos presentes na glândula de veneno da serpente; e Sandoval et al., (2011), avaliaram a imunogenicidade do veneno. Algumas pesquisas são focadas na ontogenia da espécie, incluindo trabalhos como a variação da atividade trombina *símile* do veneno da *B. atrox* de diversas regiões do Brasil (CAVINATO et al., 1998); a variação ontogênica das SVMPs e da atividade coagulante de espécimes da Amazônia (LÓPEZ-LOZANO et al., 2002); variabilidade ontogênica dos venenos de *B. atrox* e *B. asper* na Colômbia (SALDARRIAGA et al.,

2003); caracterização proteômica do veneno da espécie na Amazônia (GUÉRCIO et al., 2006); a análise venômica e antivenômica de espécimes na Colômbia, Amazônia Brasileira, Equador e Peru (NUÑEZ et al., 2009); e o estudo de Calvete et al., (2011), no qual descreve a variabilidade venômica da espécie, a partir da sua origem geográfica.

A partir destes tipos de análises, foi possível constatar que um grande número de espécies de serpentes apresentam mudanças na composição do veneno relacionadas com o seu desenvolvimento ontogenético (MACKESSY, 1988), gerando uma interessante variação na bioquímica e farmacologia dos venenos (GUTIERRES; CHAVEZ, 1980). Um exemplo disto é o da *Crotalus durissus durissus* (cascavel da América Central), no qual os adultos apresentam ação hemorrágica, mas sem neurotoxicidade, enquanto os recém nascidos tem forte ação neurotóxica e miotóxica, similar ao veneno das *Crotalus durissus terrificus* sul americanas (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1983).

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). A variabilidade na composição química e nas ações biológicas dos venenos pode ter caráter tanto interespecífico como intraespecífico. A caracterização das ações biológicas dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, demonstraram variações interespecíficas (Furtado et al., 1991). Além disso, Meier (1986) e Otero et al., (1992), observaram variações intraespecíficas nas ações biológicas do veneno de *B. atrox*.

A caracterização dos venenos foi descrita não apenas intra e interespecies, mas também de acordo com o sexo, a idade e a distribuição geográfica dos animais, a época do ano, a quantidade de veneno produzido e na maioria dos estudos a dieta das serpentes foi considerada como o fator desencadeador desta variação (OWNBY, 1982; PIMENTA et al., 2007; ZELANIS et al., 2010). Estudos comparativos do veneno de *B. jararaca* mostraram variações na composição e atividades relacionadas ao sexo destes animais, como por exemplo, maior letalidade nos

venenos de machos e maior atividade caseinolítica no das fêmeas (MENEZES et al., 2006; SAAD et al., 2012).

Devido à natureza tóxica do veneno de serpentes para os humanos, a elucidação das causas da sua variação 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 (WARRELL, 1989) 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 nas 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 estes venenos, incluindo as variações ontogenéticas, individuais e geográficas (CHIPPAUX et al., 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 et al., 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).

No caso da *B. atrox*, que é uma serpente que habita o Brasil e causadora de uma alta porcentagem das acidentes ofídicos, até agora não há estudos nos quais descrevam a composição proteica do seu veneno, considerando-se o sexo. Assim, o

presente projeto visa fazer uma comparação das atividades bioquímicas e biológicas dos venenos da serpente *B. atrox* em indivíduos machos e fêmeas, com o propósito de entender a composição dos compostos proteicos e da sua ação sistêmica, contribuindo na formulação de possíveis soluções que permitam o desenho de ações e ferramentas farmacológicas, para a inibição dos efeitos tóxicos dos venenos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os venenos da serpente *B. atrox*, fêmeas e machos irmãos, a partir da comparação das suas características e comportamento bioquímico e biológico.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar e comparar as atividades bioquímicas dos venenos de *B. atrox*, fêmeas e machos por meio quantificação da proteína, elaboração de perfis eletroforéticos (mono e bidimensionais), e análises cromatográficas e espectrométricas.
- ✓ Caracterizar e comparar as atividades biológicas dos venenos de *B. atrox*, fêmeas e machos, através da quantificação das atividades caseinolítica, fosfolipásica, LAAO, perfis zimográficos, capacidade coagulante, letal e hemorrágica.

3 MATERIAIS

3.1 Animais

3.1.1 Serpentes

Foram utilizados os venenos de cinco fêmeas e quatro machos da espécie *B. atrox* irmãos, nascidos em 28/11/2005 no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, cujos progenitores vieram de São Bento–(MA). A Tabela 1 apresenta as informações de cada um dos animais utilizados neste projeto.

Tabela 1 - Informação individual das serpentes utilizadas no projeto.

Número	Sexo	Peso (g)	Comprimento (cm)		Número de Registro
			Até escama cloacal	Total	
Ba1	♀	1660	116	130	0601-06
Ba2	♀	845	102	114,5	0601-10
Ba3	♀	1365	128	145	0601-12
Ba4	♀	1445	120	136	0601-13
Ba5	♀	1695	126	142	0601-20
Ba6	♂	510	87	102	0601-07
Ba7	♂	805	104	119,5	0601-16
Ba8	♂	860	105,5	120	0601-27
Ba9	♂	685	103	119	0601-26

As serpentes foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura e umidade. A temperatura da sala oscila entre 20 e 30 °C, dependendo da estação do ano; a umidade é mantida entre 50 e 75%. As serpentes são alimentadas com roedores (camundongos ou ratos) uma vez por mês, com o equivalente a 20% do peso total da serpente.

3.1.2 Camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, entre 18 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação do protocolo N° 1375/15 pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

3.2 Venenos

Os venenos foram obtidos por meio de extração manual conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

Para aumentar a segurança do extrator, diminuir o estresse dos animais e reduzir o gasto de veneno devido aos botes desnecessários, as serpentes foram expostas, individualmente, a 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 do veneno foi feita diretamente em microtubos de 1,5 mL e imersos em banho de gelo. Após a extração, álcool iodado 2% foi pincelado na boca e presas das serpentes para evitar infecções. O veneno extraído de cada um dos indivíduos foi centrifugado por 15 minutos à 1700 *g* descartado o *pellet*, liofilizados e armazenados a -20 °C até o momento do uso.

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização Bioquímica dos Venenos

4.1.1 Dosagem de proteínas utilizando-se o método do ácido bicinconínico (BCA)

A quantificação pelo ácido bicinconínico (BCA) é um método colorimétrico de alta sensibilidade em que é quantificada a produção do íon cuproso, que forma-se na presença de proteína em um meio alcalino. Foram dosados os conteúdos proteicos dos venenos *in natura* dos venenos individuais e dos *pools* de veneno de cada um dos grupos de interesse utilizando-se BCA de acordo com Smith et al. (1985). Os venenos *in natura* foram diluídos em solução salina 0,85% a uma relação de 1:800. Para os *pools*, foram diluídos 1 mg do veneno liofilizado em 1 mL de solução salina 0,85%. Em uma placa de microtitulação, 10 μ L das amostras foram incubadas com 200 μ L de mistura reativa, composta por um volume de solução de sulfato de cobre 4% (Sigma) para 50 volumes de solução de BCA (Sigma), por 25 segundos em microondas, em potência máxima. A leitura foi realizada a 570 nm em leitor de placas Epoch (Biotek). A determinação da concentração de proteínas foi realizada por meio de uma curva padrão, utilizando-se uma diluição seriada de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) como padrão. As amostras foram analisadas em triplicata.

4.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Um miligrama dos venenos liofilizados individualmente e dos *pools* foram diluídos em 1mL de solução salina 0,85% e alíquotas desta solução foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 12%, de acordo com Laemmli (1970). Por canaleta, foram aplicados 30 μ g de proteína na presença de β -mercaptoetanol 0,5% para atingir condições redutoras. As amostras foram aquecidas a 100 °C por sete minutos e, em seguida, centrifugadas rapidamente. Paralelamente, foi utilizado um padrão de massa molecular de 25 a 250 kDa, Dual Color Precision Plus (Bio-Rad). Finalmente, os géis foram submetidos a amperagem constante de 30 mA no equipamento Electrophoresis Power Supply–EPS 601 (GE Healthcare). Após a corrida, os géis foram corados utilizando-se

Coomassie Blue R350, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

Os géis dos *pools* foram submetidos à densitometria, utilizando-se o programa de computação ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA). As imagens foram tratadas e os *spots* analisados.

4.1.3 Eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE)

4.1.3.1 Primeira dimensão – focalização isoeletrica (IEF)

Um miligrama de cada *pool* de veneno liofilizado foi diluído em 1 mL de água MilliQ. Seguindo o protocolo proposto por O'Farraell (1975), 70 µg dos venenos foram misturados com solução de reidratação *DeStreak* (GE Healthcare) e tampão IPG Buffer pH 3-10 0,9% (GE Healthcare) obtendo um volume total de 125 µL de amostra. Em seguida, as amostras foram aplicadas em fitas *Immobiline DryStrip* linear de 7 cm com *pI* de 3 a 10 (GE Healthcare), as quais foram reidratadas por 14 horas em temperatura ambiente no IPGbox (GE Healthcare). Em seguida, as mesmas foram submetidas à focalização isoeletrica (IEF) utilizando-se o equipamento PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad). Inicialmente, foi aplicada uma voltagem constante de 100 V por 4 h, seguida de uma voltagem de 300 V até acumular 200 volts hora (V/h), seguido de um gradiente de 300 a 1000 V até acumular 300 V/h e novamente um gradiente foi realizado até acumular 4000 V/h. Finalmente, foi aplicada uma voltagem constante de 5000 V até acumular 1250 V/h.

4.1.3.2 Segunda dimensão – SDS-PAGE

Antes de serem aplicadas à segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em 2,5 mL de solução de equilíbrio (tampão tris-HCl 75 mM, pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 29,3%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,002%) contendo ditioneitol (DTT) 0,26 mM (Bio-Rad), sob agitação, durante 15 minutos. Após esse período, as fitas foram transferidas para uma segunda solução (composta pela mesma solução de equilíbrio), sem DTT, contendo iodoacetamida (IAA) 0,54 mM (Bio-Rad) e agitadas por 15 minutos. Na segunda dimensão, as fitas contendo as proteínas separadas

pela IEF foram submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE a 15% com 1,5 mm de espessura. As fitas foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida polimerizado, juntamente com um padrão proteico de massa molecular de 25 a 250 kDa, Dual Color Precision Plus (Bio-Rad). Foi aplicada uma corrente constante de 30 mA durante aproximadamente 3 horas no equipamento Electrophoresis Power Supply–EPS 601 (GE Healthcare). Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Coomassie Blue R350, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). As amostras foram analisadas em duplicata técnica.

Por último, os géis foram digitalizados e o comportamento dos *spots* presentes nestes, foram descritos a partir observação direta.

4.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) é uma técnica que permite a separação física dos componentes da amostra de interesse a partir da polaridade e as interações hidrofóbicas formadas entre a matriz e as moléculas diluídas. Um mg de cada um dos venenos liofilizados foram diluídos em 150 μ L da solução A (ácido tricloroacético 0,1% e acetonitrila 5%) e centrifugados a 10000 g por 10 minutos. De acordo com Calvete et al., (2011), o sobrenadante foi aplicado em uma coluna C-18 de fase reversa (Teknokroma Europa 300 25 x 0,4 mm), equilibrada previamente com solução A, utilizando-se cromatógrafo ÄKTA Purifier UPC10 (GE Healthcare). As amostras adsorvidas à coluna foram eluídas por meio de uma gradiente de solução B (ácido tricloroacético 0,1% e acetonitrila 95%) nas seguintes faixas: 5% por 20 minutos, continuando de 5-15% por 40 minutos, seguido de 15-45% por 170 minutos, e finalmente 45-70% por 50 minutos, em um fluxo de 0,5 mL/min, a temperatura ambiente. A absorbância foi monitorada em A_{215} e A_{280} nm e foram coletadas frações de 1 mL.

4.1.5 Espectrometria de massas em nanospray (nanoESI–qTOF)

A espectrometria de massas em nanospray (nanoESI–qTOF) é uma técnica que produz íons através da excitação e fragmentação da amostra, o que permite determinar com muita precisão a composição das moléculas presentes na amostra

em função da relação massa/carga. A metodologia foi realizada segundo Zelanis et al., (2010), com algumas modificações.

4.1.5.1 *Digestão em solução das amostras*

Um miligrama de veneno liofilizado de cada um dos *pools* foram diluídos em 1 mL de solução salina 0,85%. Cem µg de proteínas foram incubados com solução de bicarbonato de amônio 50 mM contendo DTT 5 mM por 25 minutos a 56 °C, em seguida, com solução de bicarbonato de amônio 50 mM contendo IAA 14 mM, a temperatura ambiente por 30 minutos. Na sequência, as amostras foram incubadas novamente com solução de bicarbonato de amônio 50 mM contendo DTT 5 mM a temperatura ambiente por 15 minutos. Foi então adicionado cloreto de cálcio 1 mM e 20 µg de tripsina (Sigma) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram incubadas por 16 horas a 37 °C. Após a incubação, foi acrescentado ácido fórmico 0,4% (v/v) e as amostras foram centrifugados a 2500 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Os sobrenadantes resultantes foram secos em concentrador (miVac–Gene Vac, Ipswich Suffolk) e armazenados a -20°C.

4.1.5.2 *Análises por espectrometria de massas em modo “Data Independent Acquisition”*

Os peptídeos foram então ressuspensos em ácido fórmico 0,1% (v/v) e contaminados com álcool desidrogenase–ADH a uma concentração de 80 fmol/µL (Waters MassPrep, P00330).

Alíquotas de 5 µg dos peptídeos digeridos de cada amostra foram aplicados em um sistema de cromatografia nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas. As amostras foram injetadas em uma coluna *trap* (coluna C18 nanoAcquity trap Symmetry de 180 µm x 20 mm, Waters) com 0,1% de ácido fórmico. Os peptídeos foram eluídos em uma coluna analítica capilar (coluna C18 nanoAcquity BEH 75 µm x 200 mm, 1,7 µm) usando um gradiente de 93% da solução A (0,1% ácido fórmico) e 7% da solução B (99,9% ACN, 0,1% ácido fórmico) até atingir 35% da solução B 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 (4 eV) e de alta energia de colisão com rampa de 19-45 eV a cada 1,25 segundos. O espectrômetro de massas foi calibrado previamente ao uso e durante a corrida analítica a cada intervalo de 30 segundos utilizando a fonte nanoLockSpray com o peptídeo GFP-b (glufibrinopeptídeo, Waters). Todas as amostras foram analisadas em triplicata técnica.

4.1.5.3 Identificações das 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 e alta energia e de intensidade de 50 e 750 e 1200, respectivamente, resolução do tempo de voo e largura dos picos automáticas e m/z do calibrante para carga +2 de 785,8426 com janela de 0,2 Da. As buscas em banco de dados foram realizadas com as sequências do gênero *Bothrops* obtidas do Uniprot (www.uniprot.org, 1250 sequências) com os seguintes parâmetros: carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa, oxidação das metioninas, acetilação dos N-terminais e deamidação das asparaginas e glutaminas como modificações variáveis, perda de até duas clivagem da tripsina e a 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.

4.2 Caracterização Biológica dos Venenos

4.2.1 Atividade proteolítica sobre a caseína

Para a determinação da atividade caseinolítica do veneno foi utilizado o método descrito por Menezes et al., (2006), que utiliza a caseína como substrato e que define uma unidade de atividade como a quantidade de veneno requerido para produzir um aumento de uma unidade de absorbância por minuto, medido por A₂₈₀ nm.

Os venenos liofilizados individualmente, os *pools* e a caseína dimetilada foram diluídos em tampão Tris HCl 100 mM, contendo cloreto de cálcio 10 mM, pH 8,8. A 10 µg de cada veneno foram adicionados 490 µL de tampão Tris HCl 100 mM, cloreto de cálcio 10 mM, pH 8,8 e 500 µL de solução de caseína 2%; como controle foram incubados 500 µL de caseína e 500 µL de tampão Tris HCl. Todas as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37 °C. Após esse intervalo, a reação foi interrompida pela da adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, ficando em repouso por 10 minutos a 4 °C; em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1400 g por 15 minutos a 4 °C. Por último, as absorbâncias dos sobrenadantes foram submetidas a leitura A₂₈₀ nm em leitor de placas Epoch (Biotek). As amostras foram analisadas em triplicata técnica.

De acordo com Friederich e Tu (1971) a atividade proteolítica foi calculada por meio da formula:

$$U/mg = \left(\frac{\frac{A_{280} \text{ amostra} - A_{280} \text{ caseína}}{\text{min}}}{\text{mg amostra}} \right) \times 1000$$

4.2.2 Zimografia

Com a finalidade de avaliar a atividade proteolítica dos venenos e as massas moleculares das proteínas responsáveis por esta atividade, realizou-se a zimografia em gel utilizando o método descrito por Heussen; Dowdle (1980), com algumas modificações. Os venenos individuais e os *pools* foram diluídos em solução salina 0,85% e submetidos à eletroforese SDS-PAGE 12% contendo gelatina ou caseína (Sigma) como substratos, na concentração final de 1 mg/mL. Trinta µg de cada veneno contendo tampão de amostra (Tris 124,6 mM, glicerol 20%, SDS 138,7 mM e azul de bromofenol 1%) sem β-mercaptoetanol foram aplicados em cada canaleta. Paralelamente, foi utilizado um padrão de massa molecular de 25 a 250 kDa, Dual Color Precision Plus (Bio-Rad). Finalmente, os géis foram submetidos à amperagem constante de 30 mA no equipamento Electrophoresis Power Supply–EPS 601 (GE Healthcare). Após a corrida, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em detergente Triton X-100 2,5%, para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida, os géis foram lavados com água MilliQ para a remoção do Triton X-100. Por último,

os géis foram incubados com tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,4 contendo NaCl_2 200 mM e NaN_3 0,02% durante 18 horas a 37 °C. Os géis foram então submetidos ao processo de coloração utilizando-se Coomassie Blue R350, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

4.2.3 Atividade coagulante dos venenos de *B. atrox* sobre o plasma humano e fibrinogênio bovino

A dose mínima coagulante (DMC) é definida como a menor quantidade de veneno que coagula o plasma ou o fibrinogênio em 60 segundos, a 37 °C. A atividade coagulante dos venenos sobre o plasma humano citratado e o fibrinogênio bovino foi determinada de acordo com o método descrito por Theakston e Reid (1983). Os venenos individuais e os *pools* dos grupos de interesse foram diluídos em solução salina 0,85% em diferentes concentrações, e os tempos de coagulação foram obtidos adicionando-se 100 μL de cada solução de veneno às alíquotas de 200 μL de plasma ou fibrinogênio (2 mg/mL) e mantidas a 37 °C. O tempo de coagulação foi cronometrado imediatamente após a adição da solução de veneno. Este teste foi realizado em coagulômetro Quick Timer (Drake). A determinação da DMC dos venenos foi realizada a partir de curvas padrão obtidas dos tempos da formação do coagulo em função das diferentes concentrações de veneno, utilizando plasma ou fibrinogênio como substrato. As amostras foram analisadas em triplicata técnica.

4.2.4 Dosagem da atividade fosfolipásica (PLA_2)

Para a mensuração da atividade fosfolipásica foi empregado o método de Holzer e Mackessy (1996), o qual utiliza como princípio a clivagem do substrato ácido *4-nitro-3-octanoyloxy benzoico* (NOBA) na presença de fosfolipases, liberando um produto cromogênico que vai ser medido posteriormente a $A_{425\text{ nm}}$.

Os venenos liofilizados individuais e os *pools* foram diluídos em solução salina 0,85% a uma concentração de 2 mg/mL. Em microplacas de polipropileno de 96 “well” (Sarsted), foram pipetados 20 μL de água deionizada, 20 μL de NOBA em acetonitrila a uma concentração de 3 mM, 200 μL de tampão Tris 10 mM pH 8,0

contendo CaCl_2 10 mM e NaCl 100 mM e 40 μg dos venenos. A placa foi incubada por 20 minutos a 37 °C e levada para leitura a A_{425} nm. De acordo Holzer e Mackessy (1996), 0,1 unidades de absorbância em A_{425} é equivalente a liberação de 25,8 nmoles de cromóforo. As amostras foram analisadas em triplicata técnica.

Assim, a atividade fosfolipásica foi expressa como nano moles do cromóforo produzidos no tempo por miligrama de veneno e calculada através da formula:

$$\text{nmol/min/mg} = \frac{A_{425} \text{ amostra} \times 25.8 \text{ nmol} / 0.1 \text{ U}}{20 \text{ min}} \div \text{mg proteína}$$

4.2.5 Atividade do L-aminoácido Oxidase (LAAO)

A atividade de LAAO dos venenos foi determinada usando o método descrito por Kishimoto e Takahashi (2001), em que é analisada a quantidade peróxido de hidrogênio liberado da reação entre as LAAOs presentes no veneno e a mistura reativa. É definida que uma unidade da atividade LAAO é a quantidade de enzima requerida para produzir 1 μmol de peróxido de hidrogênio por minuto.

Os venenos liofilizados individuais e os *pools* foram diluídos em solução salina 0,85% a uma concentração de 2 mg/mL. Cinco μg das amostras foram incubadas em microplacas de polipropileno (Sarsted) com 90 μL com mistura reativa tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo L-metionina 250 mM, o-fenilendiamina 2 mM (OPD) e peroxidase de rábano 0,8 U/mg, por uma hora a 37 °C. Posteriormente, a reação foi interrompida adicionando-se 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 M e a leitura foi realizada a A_{492} nm em Epoch (Biotek). A determinação da atividade da LAAO foi realizada através de uma curva padrão utilizando-se uma diluição seriada de peróxido de hidrogênio como padrão. As amostras foram analisadas em triplicata técnica.

4.2.6 Dose letal media- DL_{50}

A dose letal média (DL_{50}) é definida como a dose do veneno capaz de causar a mortalidade do 50% da população de análise. Para a determinação da DL_{50} foi

preparada uma diluição seriada de cinco concentrações dos *pools* de venenos liofilizados em solução salina 0,85%. De acordo com Villarroel et al., (1978) foram inoculados 0,5 mL de cada diluição via intraperitoneal (i.p.) em grupos de cinco camundongos machos *Swiss* de 18 a 22 g. Como controle negativo, um grupo de cinco camundongos foram injetados i.p. com 0,5 mL de solução salina 0,85%. A quantidade de animais mortos para cada dose dos venenos foi observada em um período de 48 horas.

A DL_{50} foi calculada pela análise de Probitos (FINNEY, 1971), utilizando-se o número total de camundongos mortos por dose dos venenos durante o período de observação.

4.2.7 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica é expressa como Dose Mínima Hemorrágica (DMH), que é a dose mínima de veneno capaz de produzir uma lesão hemorrágica subcutânea com um diâmetro de 10 mm, em um tempo de 2 horas. Foi preparada uma diluição seriada dos *pools* de venenos liofilizados em solução salina 0,85%. Grupos de cinco camundongos *Swiss* machos de 18 a 22 g foram inoculados via intradérmica (i.d.), na região do abdômen com 0,1 mL com cada uma das diferentes concentrações. Segundo De Moura et al., (2015), após duas horas da inoculação, os animais foram eutanaziados em câmara de gás carbônico, a pele foi removida e o halo desenhado ser digitalizado e analisado pelo software ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA), obtendo o valor da área do halo hemorrágico em centímetros. Como controle negativo, um grupo de cinco camundongos foram injetados i.d. com 0,5 mL de solução salina 0,85%.

O cálculo do diâmetro do halo hemorrágico foi feito através da equação a seguir:

$$D = \sqrt{\frac{A}{\pi}} \times 2$$

4.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para a análise estatística foram feitas as provas de normalidade para cada um dos ensaios quantitativos, antes da aplicação do teste estatístico. Quando os dados estavam fora da normal, foi aplicado o teste não paramétrico Kolmogórov-Smirnov. Quando os dados estavam dentro da normal foi utilizado o teste paramétrico t de Student. As análises estatísticas foram determinadas com o programa Past 2.17c (HAMMER et al., 2001). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS

5.1 Dosagem de Proteínas pelo Método do Ácido Bicinconínico (BCA)

A quantificação das proteínas presentes no veneno das serpentes *B. atrox* foi realizada utilizando-se o método do BCA em dois momentos diferentes: o primeiro foi no veneno *in natura*, em que os venenos foram analisados individualmente; e o segundo, após a liofilização dos venenos, sendo analisados os *pools* de veneno dos dois grupos de interesse. O cálculo das quantidades de proteína foi feito utilizando uma curva padrão, a qual foi obtida a partir de diferentes diluições de soro albumina bovina (0-1000 µg/mL) (Figura 3 e Tabela 2).

Tabela 2 - Curva padrão de soro de albumina bovina em diferentes diluições utilizada no método do ácido bicinconínico, para a quantificação individual e dos pools de veneno.

BSA (ug/ml)	Curva padrão para a análise	Curva padrão para a análise
	individual (A_{570})	dos <i>pools</i> (A_{570})
0	0	0
15,625	0,001	0,0003
31,25	0,005	0,005
62,5	0,009	0,011
125	0,010	0,029
250	0,022	0,066
500	0,043	0,123
750	0,058	0,169
1000	0,092	

Figura 3 - Curva padrão de soro albumina bovina para a dosagem de proteínas dos venenos de *B. atrox* utilizada no método do ácido bicinconínico. (A) Para a quantificação individual dos venenos; (B) Para a quantificação dos *pools* de veneno.

Após a elaboração da curva padrão, a equação da reta foi utilizada para calcular a dosagem de proteínas dos venenos. Os valores obtidos dos venenos das serpentes *B. atrox* fêmeas oscilaram entre 422,5 e 701 mg/mL com uma média de $499,6 \pm 131,6$ mg/mL. Para os machos, os valores estiveram entre 632,9 e 742,5 mg/mL, com uma média de $684 \pm 49,6$ mg/mL (Tabela 3). O teste t de Student indicou diferença significativa ($p = 0,0006$) para dosagem de proteínas pelo método de BCA dos venenos *in natura* para os dois grupos analisados.

Com relação à quantificação de proteína dos *pools*, foram as fêmeas que apresentaram uma maior quantidade de proteínas com uma média de $0,88 \pm 0,06$ mg/mL, cerca de 17% superior ao *pool* de veneno dos machos ($0,73 \pm 0,1$ mg/mL)

(Tabela 3). Apesar desta diferença, o teste t de Student não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,1$).

Tabela 3 - Dosagem de proteínas individualmente e dos *pools* dos venenos de fêmeas e machos de *B. atrox* usando o método do ácido bicinonínico.

Serpente	Quantificação Individual		Quantificação dos <i>pools</i> (mg/mL)
	mg/mL	Média±DP	Média±DP
Ba1	422,5	499,6±131,6	0,88±0,06
Ba2	496,6		
Ba3	304		
Ba4	701		
Ba5	573,6		
Ba6	692,2	684±49,6	0,73±0,1
Ba7	742,5		
Ba8	668,4		
Ba9	632,9		

5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS (SDS-PAGE)

O perfil proteico dos venenos liofilizados foram analisados por meio de SDS-PAGE 12% com redução pelo uso do β -mercaptoetanol.

De modo geral, os perfis eletroforéticos entre os venenos individuais e os *pools* apresentaram semelhanças. São visíveis bandas de maior intensidade entre 10 e 15 kDa, entre 20 e 25 kDa e de 50 kDa. Além dessas, é possível observar bandas de menor intensidade entre 25 e 50 kDa e na cima de 100 kDa (Figura 4, Figura 5 e Figura 6).

Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (12%) dos venenos de fêmeas de *B. atrox* (reduzidos). Foram usados 30 µg de proteína de cada veneno por canaleta. Ba1 até Ba5, corresponde aos venenos das fêmeas usadas no estudo. A região em destaque mostra uma banda presente em todos os venenos das fêmeas e ausente na maioria dos venenos dos machos.

Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (12%) dos venenos de machos de *B. atrox* (reduzidos). Foram usados 30 µg de proteína de cada veneno por canaleta. Ba6 até Ba9, corresponde aos venenos dos machos usados no estudo. A seta indica a presença de uma proteína presente somente no veneno Ba7 entre os machos.

Mesmo a presença dessas semelhanças em cada um dos perfis eletroforéticos, a análise individual das fêmeas mostrou uma banda de 37 kDa comum entre esses venenos (indicado pela caixa) (Figura 4), que só está presente num veneno dos machos (Ba7) (indicado pela seta) (Figura 5). Isto é confirmado pela análise eletroforética dos *pools*, sendo que a intensidade dessa banda é maior no *pool* de veneno das fêmeas (indicada pela letra a) em comparação com os machos (Figura 6), devido à maior quantidade desse grupo de proteínas nos venenos das fêmeas, uma vez que entre no *pool* dos machos só um dos venenos apresenta tal banda.

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (12%) dos *pools* de venenos de fêmeas (F) e machos (M) de *B. atrox* (reduzidos). Foram usados 30 µg de proteína de cada *pool* por canaleta.

Paralelamente a estes resultados, a análise densitométrica feita do perfil eletroforético dos *pools*, mostrou áreas similares para a maioria das bandas identificadas. Porém, duas bandas (indicados com as letras a e b) apresentaram diferenças quantitativas na área entre os grupos da análise. Para o *pool* dos venenos das fêmeas a banda “a” teve uma área de 753 px e o *pool* de macho foi de 308 px. Enquanto a banda “b”, no *pool* das fêmeas a área foi de 484 px e no *pool* dos machos foi de 1433 px. Isto poderia estar relacionado com uma maior ou menor quantidade proteína presente em cada um dos *pools*.

5.3 Eletroforese Bidimensional (2D SDS-PAGE)

Os venenos de *B. atrox* fêmeas e machos foram avaliados por meio de 2D SDS-PAGE, através de uma análise em duplicata de cada uma das amostras, totalizando 4 géis (Figura 7).

Figura 7 - Eletroforese bidimensional em duplicata dos *pools* de veneno de fêmeas e machos de *B. atrox*. 70 µg de cada *pool* foi diluído em DeStreak e IPG Buffer foram aplicados nos DryStrip (pI 3-10) seguido por SDS-PAGE 15%.

A comparação entre os géis de cada um *pools* de veneno, a partir da superposição das imagens digitalizada do *pool* de veneno das fêmeas (contrastada na cor vermelha) e dos machos (contrastada na cor azul), foi possível observar similaridade entre os perfis eletroforéticos. Porém, alguns *spots* que poderiam indicar diferenças entre os grupos da análise, principalmente no caso do *pool* de veneno dos machos. Assim, na Figura 8 os quadros coloridos (verde, preto, vermelho, laranja) mostram proteínas que poderiam estar gerando essas diferenças, todos predominantes no *pool* de venenos dos machos. Com relação ao grupos proteicos que poderiam estar diferenciados nos dois grupos, encontram-se proteínas de massa molecular entre 100 a 150 kDa e um *pI* de 7 (quadro verde), entre 37 a 50 kDa e *pI* de 7,5 (quadro preto), de 25 kDa e *pI* de 6,5 (quadro vermelho) e entre 13 e 15 kDa com *pI* de 2,0 (quadro laranja).

Figura 8 - Superposição dos perfis eletroforéticos bidimensionais digitalizados dos *pools* de fêmeas e machos. O perfil das fêmeas encontra-se contrastado na cor vermelha e o dos machos na cor azul. A superposição foi feita com o software Photoshop CS5. Os quadros coloridos correspondem aos spots exclusivos no pool de veneno dos machos.

5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

Os nove venenos de *B. atrox* foram analisados por cromatografia líquida em C18 (Teknokroma) (RP-HPLC) e seus perfis cromatográficos foram comparados.

Apesar da semelhança geral entre os perfis, pode ser observado algumas diferenças até mesmo entre os venenos de mesmo sexo. Por exemplo, comparando-se os venenos das fêmeas, foram reconhecidos três picos diferentes entre os cinco venenos (Figura 9). O primeiro pico (P1) esteve presente nos perfis cromatográficos das serpentes Ba2 e Ba3 e o segundo e terceiro pico (P2 e P3) estiveram presentes nos venenos das serpentes Ba4 e Ba5.

Figura 9 - Cromatografia líquida RP-HPLC dos venenos de fêmeas de *B. atrox*. Um mg de cada veneno foi aplicado em coluna C18 (Teknokroma Europa 300 C-18 25 x 0,4 mm) usando um gradiente de solução B: 5% por 20 min, 5-15% por 40 min, 15-45% por 170 min, e 45-70% por 50 minutos. (A) Ba1; (B) Ba2; (C) Ba3; (D) Ba4; (E) Ba5. Foram identificados 3 picos diferentes indicados como P1, P2 e P3.

Os perfis cromatográficos dos machos foram mais homogêneos em comparação aos das fêmeas. Assim, o P1 que esteve presente em alguns venenos das fêmeas, foi comum para todos os venenos nos machos (Figura 10). Porém, no perfil cromatográfico da Ba8, foi observado um pico exclusivo (P4) próximo ao P3 das fêmeas, mostrando a variabilidade intrínseca nos venenos destas serpentes irmãos.

Figura 10 - Cromatografia líquida RP-HPLC dos venenos de machos de *B. atrox*. Um mg de cada veneno foi aplicado na coluna C18 (Teknokra Europa 300 C-18 25 x 0,4 mm) usando um gradiente de solução B: 5% por 20 min, 5-15% por 40 min, 15-45% por 170 min, e 45-70% por 50 minutos. (A) Ba6; (B) Ba7; (C) Ba8; (D) Ba9. Foram identificados 2 picos diferentes sinalados como P1 e P4.

5.5 Espectrometria de Massas (nanoESI-qTOF)

Neste ensaio foram analisados os *pools* dos venenos das fêmeas e dos machos. Como resultado, foram identificados um total de 79 compostos proteicos (Apendice: A). Destes 79, 51 foram compostos proteicos comuns nos dois grupos de estudo, 25 foram exclusivos das fêmeas e 3 foram exclusivos dos machos. As famílias proteicas encontradas foram SVMPS, SVSP, PLA₂s, CTLs, LAAOs, GPCs, CRISPs e o NGF. As quatro primeiras famílias foram as mais abundantes para os dois grupos de análise e a última só esteve presente no veneno dos machos (Figura 11).

Figura 11 - Relação porcentual das famílias proteicas encontradas nos venenos de fêmeas e machos de *B. atrox*. (A). Proteínas encontradas no *pool* de veneno das fêmeas. (B). Proteínas encontradas no *pools* de veneno dos machos. SVM P, metaloproteínase de venenos de serpentes; SVSP, serinoproteínases de venenos de serpentes; PLA₂, fosfolipase A₂; CTL, lecitina tipo-C; LAAO, L-aminoácido oxidase; GPC, glutamyl peptídeo ciclotranferase; CRISP, proteínas secretoras ricas em cisteína; NGF, fator de crescimento neural.

Comparando o conteúdo proteico exclusivo entre os dois grupos, as fêmeas apresentaram 77,8% a mais de SVMP do que o veneno dos machos, resultado que poderia parecer contraditório no momento de olhar a caracterização proteica total, já que os machos tiveram 4% a mais de SVMP que o *pool* de veneno das fêmeas. Outro grupo proteico abundante e que foi exclusivo no veneno das fêmeas, foram as PLA₂s, com 8 no total. Essas duas famílias de proteínas foram os compostos mais relevantes nesta diferenciação. Porém, as fêmeas também tiveram compostos proteicos exclusivos pertencentes às CTL, SVSP e LAAO que não estiveram no veneno dos machos. Adicionalmente, em cada grupo de análise foi encontrada uma família proteica exclusiva, sendo a GPC no veneno das fêmeas e o NGF no veneno dos machos (Tabela 4).

Para complementar a informação proporcionada pelo nanoESI-qTOF, foi usado o *Protein Entry* na procura dos valores do ponto isoelétrico, da massa molecular e da família proteica à qual pertencem as proteínas encontradas.

Tabela 4 - Identificação dos compostos proteicos exclusivos nos venenos das fêmeas e dos machos de *B. atrox*, por espectrometria de massas (nanoESI-qTOF).

Sexo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família de Proteínas	kDa	pI	kDa Molécula completa *
Fêmeas	Acidic phospholipase A ₂ BE-I_ <i>Bothrops erythromelas</i>	Q2HZ28	PLA ₂	16,2	4,7	
	Acidic phospholipase A ₂ BITP01A_ <i>Bothrops insularis</i>	Q8QG87	PLA ₂	16,6	5,1	
	Acidic phospholipase A ₂ BmooPLA ₂ _ <i>Bothrops moojeni</i>	G3DT18	PLA ₂	16,5	5,0	
	Acidic phospholipase A ₂ _ <i>Bothrops ammodytoides</i>	P86907	PLA ₂	14,7	6,1	
	Acidic phospholipase A ₂ _ <i>Bothrops jararaca</i>	P81243	PLA ₂	15,1	4,6	
	Acidic secretory sPLA ₂ -I_ <i>Bothrops diporus</i>	I2DAL4	PLA ₂	16,2	4,9	
	Acidic secretory sPLA ₂ -II_ <i>Bothrops diporus</i>	I2DAL5	PLA ₂	16,2	5,0	
	Phospholipase A ₂ _ <i>Bothrops neuwiedi</i>	M1TFP9	PLA ₂	16,1	4,8	
	Disintegrin batroxostatin_ <i>Bothrops atrox</i>	P18618	PII-SVMP	8,4	5,3	
	Disintegrin cotiarin_ <i>Bothrops cotiara</i>	P31988	PII-SVMP	8,4	5,8	
	Disintegrin DisBa-01_ <i>Bothrops alternatus</i>	Q801Z4	PII-SVMP	8,9	4,5	
	Glutaminyl peptide cyclotransferases_ <i>Cerrophidion godmani</i>	M9NCD2	GPC	40,7	8,9	
	Metalloproteinase BaP1_ <i>Bothrops asper</i>	P83512	PI-SVMP	46,5	5,6	
	Metalloproteinase BnP1 (Fragments)_ <i>Bothrops pauloensis</i>	P0C6S0	PI-SVMP	9,7	8,7	24 ^a
	Metalloproteinase leucurolysin-B_ <i>Bothrops leucurus</i>	P86092	PIII-SVMP	38,1	5,4	55 ^b
	Metalloproteinase-bothrojarin (Fragment)_ <i>Bothrops jararaca</i>	Q0NZX9	PIII-SVMP	25,9	5,4	
	BnMP-I ₂ SVMP_ <i>Bothrops neuwiedi</i>	E3UJL4	PI-SVMP	27,6	5,6	
	C-type lectin BPL_ <i>Bothrops pirajai</i>	P0DL30	CTL	16,6	4,9	
	Snaclec bothroinsularin subunit alpha_ <i>Bothrops insularis</i>	P0C929	CTL	15,6	5,4	
	Snaclec bothrojaracin subunit alpha_ <i>Bothrops jararaca</i>	Q56EB1	CTL	18,0	5,9	
	Botrocetin-2 alpha_ <i>Bothrops jararaca</i>	M1V359	PIII-SVMP	17,8	8,1	

Sexo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família de Proteínas	kDa	pI	kDa Molécula completa *
	Barnettobin (Fragment)_ <i>Bothrops barnetti</i>	K4LLQ2	SVSP	28,3	6,3	52 ^c
	Serine protease BITS01A_ <i>Bothrops insularis</i>	Q8QG86	SVSP	29,04	8,8	
	Serine protease BPA_ <i>Bothrops jararaca</i>	Q9PTU8	SVSP	28,7	6,7	
	L-amino-acid oxidase (Fragment)_ <i>Bothrops leucurus</i>	P0DI89	LAAO	3,6	4,1	60 ^d
	Metalloproteinase basparin-A (Fragments)_ <i>Bothrops asper</i>	P84035	PIII-SVMP	7,0	5,8	70 ^e
Machos	Metalloproteinase BpirMP (Fragment)_ <i>Bothrops pirajai</i>	P0DL29	PI-SVMP	20,4		23,1 ^f
	Venom nerve growth factor_ <i>Bothrops jararacussu</i>	Q90W38	NGF	27,6	8,6	

*Dado obtido a partir de referências bibliográficas.

^aBaldo et al., (2008).

^bSanchez et al., (2007).

^cVivas-Ruiz et al., (2013).

^dNaumann et al., (2011).

^eLoría et al., (2003).

^fBernardes et al., (2013).

5.6 Atividade Proteolítica Sobre a Caseína

As análises das atividades caseinolíticas dos venenos de *B. atrox* fêmeas e machos apresentam um comportamento semelhante. Nas fêmeas, os valores foram desde 502,2 até 845,6 U/mg de veneno, com uma média de $641,8 \pm 92,8$ U/mg. Para os machos, os valores estiveram entre 344,4 e 767,8 U/mg de veneno, com uma média de $573,3 \pm 124,4$ U/mg (Tabela 5).

O teste t Student não indicou diferença significativa ($p=0,22$) para a atividade caseinolítica dos venenos de *B. atrox* entre os dois grupos analisados, o que concorda com a semelhança entre as médias obtidas para cada grupo.

Tabela 5 - Atividade proteolítica sobre a caseína dos venenos de fêmeas e machos de *B. atrox* individualmente e dos *pools*. Os valores foram expressados em média $\pm$ desvio padrão.

Serpente	Quantificação individual		Quantificação dos <i>pools</i> (U/mg)
	U/mg	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Ba1	845,6	$641,8 \pm 92,8$	$864,2 \pm 82,3$
Ba2	502,2		
Ba3	660		
Ba4	628,9		
Ba5	572,2		
Ba6	596,7	$573,3 \pm 124,4$	$973,7 \pm 29,4$
Ba7	584,4		
Ba8	767,8		
Ba9	344,4		

Como resultado da quantificação dos *pools*, é possível observar que os machos tiveram uma maior atividade caseinolítica quando comparado com as fêmeas, com valores de 973 e 864 U/mg, respectivamente. Apesar dos valores obtidos nos *pools* terem apresentado um comportamento diferente ao da análise individual, em que as fêmeas tiveram uma atividade maior, a análise estatística realizada para os dados obtidos dos *pools* também não apresentou diferença significativa ($p=0,1$), concordando com a análise estatística feita para os venenos individualmente.

5.7 Zimografia

5.7.1 Utilizando gelatina como substrato

Os perfis da atividade proteolítica dos venenos individuais e dos *pools* foram analisados por meio de SDS-PAGE 12% contendo gelatina como substrato, sob condições não redutoras usando tampão de amostra sem β -mercaptoetanol.

De modo geral, as zimografias, tanto dos venenos individuais, quanto dos *pools* de veneno de fêmeas e de machos, apresentaram atividades proteásicas semelhantes e bastante intensas na região entre 50 e 70 kDa (Figura 12, Figura 13 e Figura 14). No entanto, é possível observar algumas diferenças em cada um dos perfis zimograficos. A banda de aproximadamente 32 kDa esteve presente em todos os venenos das fêmeas e somente no veneno do macho Ba8 (indicada pelo círculo) (Figura 13).

Figura 12 - Zimografia dos venenos de fêmeas de *B. atrox*, contendo gelatina como substrato, em condições não redutoras. Foram usados 30 μ g de proteína de cada veneno por canaleta. Ba1 até Ba5 correspondem aos venenos das fêmeas usados no estudo.

Figura 13 - Zimografia dos venenos de machos de *B. atrox*, contendo gelatina como substrato, em condições não redutoras. Foram usados 30 µg de proteína de cada veneno por carril. Ba6 até Ba9 correspondem aos venenos dos machos usados no estudo.

O mesmo comportamento observado nos venenos individuais foi confirmado pelo perfil zimográfico dos *pools* de veneno mostrando atividade proteolítica entre 25 a 35 kDa e 50 a 75 kDa (Figura 14).

Figura 14 - Zimografia dos *pools* de venenos de fêmeas (F) e machos (M) de *B. atrox*, contendo gelatina como substrato, em condições não redutoras. Foram usados 30 µg de proteína de cada *pool* por carril.

5.7.2 Utilizando caseína como substrato

A diferença desta análise zimográfica para a anterior (5.7.1), foi o substrato utilizado, neste caso atividade proteolítica dos venenos individuais e dos *pools* foram analisados utilizando-se a caseína como substrato.

Os resultados dos perfis zimográficos mostraram, que tanto a análise individual dos venenos, quanto dos *pools* de cada grupo de interesse, tiveram atividade proteolítica na faixa de 25 a 37 kDa (Figura 15, Figura 16 e Figura 17), bandas que também estiveram presentes nos perfis zimográficos contendo gelatina como substrato. No entanto, mais uma vez, é possível observar algumas diferenças na atividade proteolítica das amostras. Dentre as diferenças, pode ser observada uma banda de cerca de 100 kDa em um veneno das fêmeas (Ba1) e em um veneno dos machos (Ba9) (indicado pelo círculo vermelho) (Figura 15 e Figura 16). Além disso, o macho Ba8 apresentou uma maior intensidade na faixa proteica de 35 kDa e uma banda com atividade proteásica próxima de 27 kDa.

Figura 15 - Zimografia dos venenos de fêmeas de *B. atrox*, contendo caseína como substrato, em condições não redutoras. Foram usados 30 µg de proteína de cada veneno por canaleta. Ba1 até Ba5 correspondem aos venenos das fêmeas usados no estudo.

Figura 16 - Zimografia dos venenos de machos de *B. atrox*, contendo caseína como substrato, em condições não redutoras. Foram usados 30 µg de proteína de cada veneno por canaleta. Ba6 até Ba9 correspondem aos venenos dos machos usados no estudo.

Similarmente ao ocorrido com as zimografias contendo gelatina como substrato, o perfil zimográfico dos *pools* contendo caseína reproduziu os resultados dos venenos individuais. Assim, é possível observar atividade proteolítica na mesma faixa que tiveram os venenos individuais (25 a 37 kDa) (Figura 17).

Figura 17 - Zimografia dos *pools* de venenos de fêmeas (F) e machos (M) de *B. atrox* de, contendo caseína como substrato em condições não redutoras. Foram usados 30 µg de proteína de cada *pool* por carril.

5.8 Atividade Coagulante Sobre o Plasma

A dose mínima coagulante quantificada no plasma (DMC-P) apresentou um comportamento heterogêneo entre os venenos de *B. atrox* fêmeas e machos, assim como entre os espécimes do mesmo sexo. Nas fêmeas, os valores variaram entre 3,1 e 14,6 mg/mL, com uma média de 8,9 mg/mL. Os machos apresentaram valores entre 3,0 e 26,9 mg/mL, com uma média superior a duas vezes à dose das fêmeas, de 20,6 mg/mL (Tabela 6).

Tabela 6 - Dose mínima coagulante dos venenos de fêmeas e machos de *B. atrox*, usando plasma humano citratado como substrato.

Serpente	DMC-P individual			DMC-P <i>pool</i> (mg/mL) Média±DP
	mg/mL	Média Total	Média* ±DP	
Ba1	9,1	8,9	10,3±3,3	35,6±4,5
Ba2	14,6			
Ba3	10,7			
Ba4	6,8			
Ba5	3,1*			
Ba6	25,5	20,6	26,4±0,8	148,7±10,5
Ba7	26,9			
Ba8	3,0*			
Ba9	26,7			

*Valores atípicos que se encontram fora da normal estatística, e que não foram usados para calcular a média.

A partir destes resultados, o teste Kolmogórov-Smirnov indicou que a DMC-P avaliada individualmente nos venenos de *B. atrox*, tendo plasma como substrato, não apresentou diferença significativa ($p= 0,08$).

Além da análise individual dos venenos de *B. atrox*, também foi realizada uma análise da DMC-P do *pool* de venenos das fêmeas e dos machos. As fêmeas apresentaram uma maior atividade coagulante do que os machos, aproximadamente quatro vezes maior, com valores de 35,6 e 148,7 mg/mL, respectivamente (Tabela 6).

Os resultados obtidos das DMC-P dos *pools*, de acordo com o teste t de Student, apresentaram uma diferença significativa entre eles ($p= 1 \times 10^{-7}$).

5.9 Atividade Coagulante Sobre o Fibrinogênio

A atividade coagulante usando fibrinogênio como substrato (DMC-F) também apresentou valores heterogêneos. As fêmeas tiveram valores entre 0,2 e 13,3 mg/mL, com uma média de 5,4 mg/mL. Nos machos, os valores variaram entre 0,1 e 0,6 mg/mL, com uma média de 0,4 mg/mL (Tabela 7).

Tabela 7 - Dose mínima coagulante dos venenos de fêmeas e machos de *B. atrox*, usando fibrinogênio bovino como substrato.

Serpente	DMC-F Individual			DMC-F <i>pool</i> (mg/mL) Média±DP
	mg/mL	Média Total	Media* ±DP	
Ba1	0,3	5,4	0.34±0,2	2,2±0,4
Ba2	13,3*			
Ba3	12,5*			
Ba4	0,2			
Ba5	0,6			
Ba6	0,4	0,4±0,2	-	4,4±1,6
Ba7	0,6			
Ba8	0,1			
Ba9	0,6			

* Valores atípicos que se encontram fora da normal estatística, e que não foram usados para calcular a média.

O teste Kolmogórov-Smirnov, mostrou que a DMC-F, avaliada individualmente dos venenos de *B. atrox*, não apresentou diferença estatística significativa ($p= 0,75$).

Para este ensaio também foi realizada a análise da DMC-F dos *pools* de venenos das fêmeas e dos machos. O resultado para as fêmeas foi de 2,2 mg/mL e para os machos foi de 4,4 mg/mL, o que indica um aumento de duas vezes nos miligramas necessários para causar a coagulação neste último grupo (Tabela 7).

O teste t de Student para a DMC-F dos *pools* de venenos de *B. atrox* de fêmeas e machos indicou diferença significativa entre os grupos de interesse ($p=0,04$).

5.10 Dosagem da Atividade Fosfolipásica A₂ (PLA₂)

Os valores obtidos das dosagens de atividade PLA₂ dos venenos de *B. atrox* de fêmeas e de machos também apresentaram variação entre os dois grupos. Com relação à análise individual dos venenos, a atividade das fêmeas oscilou entre 24,8 e 46,4 nmol/min/mg de veneno, com uma média de $35,9 \pm 7,6$ nmol/min/mg de veneno. No caso dos machos, a atividade oscilou entre 32,8 e 70,7 nmol/min/mg de veneno, com uma média de $50,8 \pm 15,1$ nmol/min/mg de veneno (Tabela 8).

Tabela 8 - Dosagem da atividade PLA₂ dos venenos de fêmeas e machos de *B. atrox*.

Serpente	PLA ₂ individual		PLA ₂ dos <i>pools</i> (nmol/min/mg veneno) Média±DP
	nmol/min/mg veneno	Média±DP	
Ba1	44,4	35,9±7,6	4,8±2,1
Ba2	31,8		
Ba3	46,4		
Ba4	32,0		
Ba5	24,8		
Ba6	32,8	50,8±15,1	8,0±3,8
Ba7	70,7		
Ba8	45,9		
Ba9	53,8		

O teste t de Student para este ensaio indicou diferença significativa entre os grupos ($p=0,009$).

Com relação aos *pools* de venenos dos grupos de análise, o *pool* das fêmeas mostrou uma média de $4,8 \pm 2,1$ nmol/min/mg de veneno tendo maior atividade em comparação com o *pool* de veneno dos machos quem apresentou uma média de $8 \pm 3,8$ nmol/min/mg de veneno. O teste t de Student não indicou diferença significativa ($p=0,27$) para este ensaio.

5.11 Atividade da L-aminoácido Oxidase (LAAO)

O cálculo para determinar a atividade da LAAO foi realizado através de uma curva padrão, utilizando-se seis diluições diferentes de peróxido de hidrogênio (Figura 18 e Tabela 9).

Tabela 9 - Curva padrão de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações, para a quantificação da atividade LAAO individual e dos *pools* de veneno.

H₂O₂ mM	Curva padrão para a análise individual (A₄₉₂)	Curva padrão para a análise dos <i>pools</i> (A₄₉₂)
0	0	0
0,397	0,048	0,11
0,79	0,094	0,20
1,58	0,1687	0,35
3,175	0,2957	0,53
6,35	0,5303	0,97
12,7	0,9347	1,58

Figura 18 - Curva padrão para a quantificação da atividade LAAO dos venenos de *B. atrox*. (A) Para a quantificação individual dos venenos; (B) Para a quantificação dos *pools* de veneno.

Uma vez realizada a curva padrão, a equação da reta foi utilizada para determinar a atividade LAAO de cada um dos venenos e dos *pools* dos dois grupos de análise. De modo geral, os valores obtidos dos venenos de *B. atrox* foram semelhantes. Essa similaridade foi observada também nos valores das médias da LAAO, tendo as fêmeas $14,7 \pm 3,5$ U/mg e os machos $13,2 \pm 2,6$ U/mg (Tabela 10).

Tabela 10 - Dosagem da atividade LAAO dos venenos de fêmeas e machos de *B. atrox*.

Serpente	Quantificação Individual		Quantificação dos <i>pools</i> (U/mg) Média±DP
	U/mg	Média±DP	
Ba1	23,5	14,7±3,5	30,1±2,8
Ba2	12,8		
Ba3	13,4		
Ba4	10,0		
Ba5	13,9		
Ba6	9,9	13,2±2,6	42,9±4,3
Ba7	16,9		
Ba8	14,7		
Ba9	11,3		

O teste Kolmogorov-Smirnov realizado para este ensaio, não apresentou diferença significativa entre os grupos de interesse ($p=0,8$).

Com relação aos *pools* de venenos, o *pool* das fêmeas apresentou menor atividade de LAAO do que o dos machos, com uma média de 30,1±2,8 U/mg e 42,9±4,3 U/mg, respectivamente. Esta diferença foi confirmada pelo teste t de Student, que indicou diferença significativa entre os dois *pools* de venenos ($p=0,01$).

5.12 Dose Letal 50% (DL₅₀)

A determinação da DL₅₀ dos *pools* de veneno de *B. atrox* foi feita usando cinco concentrações diferentes (47,1-70,7-106-159-246 µg) de veneno em cada um dos grupos de camundongos.

Os resultados obtidos (Tabela 11), mostraram que o *pool* de venenos das fêmeas necessita de 104,3 µg de proteína para gerar a morte do 50% da população de camundongos. Isto significa que a capacidade do veneno das fêmeas é cerca de 11,9% superior à do *pool* de venenos dos machos, quem requerem 118,4 µg de proteína para conseguir o mesmo resultado.

Tabela 11 - DL₅₀ dos *pools* de veneno de fêmeas e machos de *B. atrox*. Foram usadas cinco concentrações (47,1 a 246 µg) para determinar a dose efetiva.

	Dose Efetiva (µg/animal)	Limite Superior de Confiança (µg)	Limite Inferior de Confiança (µg)	Fator de Precisão
<i>Pool</i> Fêmeas	104,3	151,2	73,3	0,39
<i>Pool</i> Machos	118,4	164,8	87,2	0,37

5.13 Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

A determinação da atividade hemorrágica de cada *pool* de veneno foi obtida a partir da elaboração de uma curva padrão (Figura 19 e Tabela 12) utilizando cinco concentrações diferentes de proteína (0,625-1,25-2,5-5-10 µg).

Tabela 12 - Curva padrão para a determinação da DMH individual e dos *pools* de veneno, elaborada a partir do uso de diferentes quantidades de proteína.

Proteína de Veneno Aplicada (µg)	Diâmetro da Hemorragia (cm)	
	<i>Pool</i> veneno fêmeas	<i>Pool</i> veneno machos
0	0	0
0,625	0,56	0,47
1,25	0,49	0,60
2,5	0,83	1,01
5	1,24	1,65
10	1,66	1,86

Figura 19 - Curva padrão utilizada para determinar a DMH dos *pools* de veneno de *B. atrox*. (A) Gráfico usado no cálculo da DMH do *pool* de veneno das fêmeas. (B) Gráfico usado no cálculo da DMH do *pool* de veneno dos machos.

Uma vez realizadas as curvas padrão, foi utilizada a equação da reta para calcular a quantidade de proteína necessária para criar um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro para cada um dos *pools*. Os valores registrados na Tabela 13 mostram que a quantidade de proteína necessária para gerar uma hemorragia de 10 mm de diâmetro é menor nos machos que nas fêmeas, com DMH de 2,7 e 4,8 µg/animal, respectivamente. Isto se traduz, em que o veneno das fêmeas precisa de um 43,8% a mais de proteína para gerar o halo hemorrágico correspondente ao DMH.

Tabela 13 - Valores da DMH dos *pools* de veneno de fêmeas e machos de *B. atrox*.

DMH ($\mu\text{g}/\text{animal}$)	
<i>Pool</i> veneno fêmeas	<i>Pool</i> veneno machos
4,8	2,7

Estes resultados podem ser visualizados na Figura 20, em que é possível observar que foi preciso uma quantidade menor de proteína do veneno do *pool* de veneno dos machos para se aproximar à área hemorrágica conseguida pelo *pool* de veneno das fêmeas.

Figura 20 - Atividade hemorrágica dos *pools* de veneno de *B. atrox* induzida via i.d. (A) *Pool* de veneno das fêmeas numa concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$. (B) *Pool* de veneno dos machos numa concentração de 2,5 $\mu\text{g}/\text{animal}$.

6 DISCUSSÃO

Considerando a análise estatística, o teste da dosagem de proteínas foi o único ensaio de análise bioquímica que apresentou diferença significativa entre os grupos. Foi possível também observar que os valores apresentaram comportamentos diferentes quando comparado os venenos individuais ou os *pools* dos dois grupos. A concentração de proteína média dos venenos individuais das fêmeas foi de 499,6 mg/mL e dos machos de 684 mg/mL, o que significa uma quantidade 27% superior de proteínas no veneno do macho em relação a das fêmeas. Porém, na quantificação de proteína dos *pools* ocorreu o caso contrário, ou seja, as fêmeas apresentaram uma média de 0,88 mg de proteína/mg de veneno e os machos de 0,73 mg de proteína/mg de veneno. Os resultados dos *pools* estiveram próximos aos resultados obtidos por López-Lozano et al., (2002), quem utilizando o método do BCA, obteve 0,98 mg/mg de veneno seco, no *pool* de veneno de filhotes de *B. atrox*.

Considerando os perfis eletroforéticos da SDS-PAGE, os venenos das fêmeas e dos machos apresentaram um padrão de distribuição das bandas proteicas semelhantes (Figura 4 e Figura 5). No entanto, pequenas variações com relação a algumas bandas podem ser explicadas pelas diferenças na concentração de proteínas dos venenos e não com a condição de presença-ausência. Foram identificadas quatro bandas com intensidades notáveis em condições redutoras tanto nos perfis dos venenos individualmente, quanto no perfil dos *pools*: duas por volta de 14-15 kDa, outra entre 20–25 kDa e a última próxima a 50 kDa. A presença destas bandas tem sido observadas não somente no veneno da *B. atrox*, como também em serpentes do mesmo gênero e sob diversas condições ontogênicas, sendo corroborado por trabalhos como o de Cavinato, et al., (1998), Lopez-Lozano et al., (2002), Menezes et al., (2006), Salazar et al., (2007) e Queiroz et al., (2008).

De acordo com a análise densitométrica, foi identificada diferença nos perfis eletroforéticos nas bandas ao redor de 37 kDa. Trata-se especificamente da banda reconhecida com a letra “a” no perfil dos *pools*, a qual está presente em todos os venenos das fêmeas e somente em um dos venenos dos machos. De acordo ao estudo realizado por Nuñez et al., (2009), que analisou o veneno da *B. atrox* de

diferentes lugares geográficos, esta banda pode ser uma SVSP. As bandas mais intensas, de cerca de 15 kDa podem ser PLA₂; enquanto as que estão por volta de 23 kDa podem corresponder às PI-SVMP; bandas com aproximadamente 50 kDa seriam possivelmente PIII-SVMP (LOPEZ-LOZANO et al., 2002; NUÑEZ et al., 2009; ORTIZ et al., 2012). Além dessas bandas, foi visível uma banda acima de 100 kDa, que, segundo Kozlova (2011), pode tratar-se de hialuronidase.

Com relação aos perfis eletroforéticos bidimensionais, os resultados obtidos mostraram pouca diferença entre os dos *pools* de venenos, assim como ocorreu na análise monodimensional. Uma importante quantidade dos *spots* pertencentes a cada um dos *pools* analisados, encontraram-se abaixo do *pI* 7,0 indicando seu caráter ácido. Dentre esses *spots* foi possível distinguir alguns que pareceram predominantes ou exclusivos somente em algum dos grupos de análise. Como já foi descrito, foi possível distinguir quatro grupos proteicos no *pool* de veneno dos machos, diferenciados por quadros de cores (Figura 8). Assim, a informação fornecida por Guercio et al., (2006) permitiu dar uma possível classificação das proteínas contidas nestes quatro grupos diferenciados. As proteínas do quadro preto (entre 37 e 50 kDa) correspondem possivelmente às SVMP, as do quadro vermelho poderiam ser SVSP (25 kDa) e as do quadro laranja provavelmente pertençam ao grupo das CTL (15 kDa). Com respeito as proteínas agrupadas no quadro verde (>100 kDa) e como já foram identificadas na eletroforese monodimensional, poderiam ser hialuronidases ou PIII-SVMP, segundo Kozlova (2011) e Ortiz et al., (2012), respectivamente.

Os dados da composição proteica obtidos pelo nanoESI-qTOF mostraram que nos dois *pools* existem grupos de proteínas minoritárias, como as GPCs, CRISPs e NGFs (a qual só esteve presente no veneno dos machos) e grupos de proteínas representativas, como as SVMPs, PLA₂s, SVSPs, CTLs e LAAOs. Estas famílias proteicas são os principais compostos presentes nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* (DA CUNHA; MARTINS, 2012). Exemplos disto são trabalhos de Culma et al., (2014), que identifica as SVMPs e PLA₂s como toxinas principais no veneno da *B. punctatus*; o de Mora-Obando et al., (2014), que identifica as SVMP, SVSP e CTL como compostos importantes no veneno da *B. ayerbeii*; e o de

Gonçalves-Machado et al., (2016), que reconhece as SVMPs, PLA₂s, LAAOs, CTLs e SVSPs como proteínas relevantes na composição do veneno da *B. jararaca*. No caso da *B. atrox*, os resultados dos grupos proteicos encontrados por Nuñez et al., (2009) são qualitativamente semelhantes aos resultados obtidos neste trabalho, com um total de 10 grupos proteicos diferentes em venenos de serpentes de *B. atrox* do Brasil, compostos por, SVMPs (72,1%) como principal grupo, seguidas das PLA₂s com 14,3%, SVSPs, LAAOs, CTL e desintegrinas.

Com relação às proteínas exclusivas, as fêmeas apresentaram uma maior quantidade de compostos proteicos (25) do que os machos (3). Estes compostos pertencem à 6 famílias proteicas para as fêmeas e apenas em duas para os machos. Dentre os compostos, os mais representativos foram as PLA₂s e as SVMP. Nas fêmeas, das 25 proteínas, as SVMP constituíram 36% das proteínas e as PLA₂s 32%. No caso dos machos, as SVMPs representaram 66,67% dos compostos proteicos totais encontrados neste grupo (Tabela 4). É interessante observar que a presença de SVSPs exclusivas no veneno das fêmeas, coincide com uma banda própria deste grupo na SDS-PAGE de cerca de 37 kDa, a qual pode se tratar de uma SVSP. Outra proteína encontrada somente no *pool* de veneno das fêmeas, é a M9NCD2 pertencente à família proteica das GPC, a qual é capaz de catalisar o piroglutamato do N-terminal da proteína liberando amoníaco e água (SEIFERT et al., 2009), a qual fornece a estabilidade estrutural, resistência à degradação e interação entre as proteínas ou peptídeos (STEPHAN et al., 2009). Esta GPC já foi identificada no veneno da *B. atrox* no estudo realizado por Wang et al., (2014), assim como outras 17 espécies de serpentes de diferentes gêneros, que também identificaram essa proteína.

No caso do *pool* de veneno dos machos, encontrou-se a proteína Q90W38, identificada como o NGF, a qual, devido à pouca quantidade dela no veneno tudo (0.71 ng NGF por cada 100 µg de proteína total), não foi visualizada em nenhum dos perfis eletroforéticos mono e bidimensionais. Estes resultados espectrométricos mostraram que os perfis proteômicos dos venenos podem ter variabilidade, mesmo ao nível intraespecífico.

Quanto aos perfis cromatográficos, estes mostraram três grupos gerais de picos, estando o primeiro deles entre os 20 e 40 mililitros (ou minutos) da corrida, o segundo grupo por volta dos 60 mililitros e o terceiro entre os 80 e 120 mililitros da corrida. As fêmeas apresentaram até três picos diferentes (P1, P2, P3) e os machos somente um (P4). Mas o P1, que teve uma presença irregular nas fêmeas, foi constante nos perfis cromatográficos dos machos. Isto também evidencia a diferença intrínseca que existe nos venenos intra-espécie.

Comparados com outros trabalhos realizados com o veneno desta espécie, é possível inferir às quais famílias de proteínas correspondem os picos obtidos nos perfis cromatográficos. Comparando-se as frações ao longo do tempo de corrida, foi possível distinguir que o P1 (próximo aos 50 minutos de corrida), possivelmente seja correspondente à fração 6 da serpente *B. atrox* de Icoaraci no Pará (Brasil) (CALVETE et al., 2011) e à fração 10 identificada no veneno de *B. atrox* de Colômbia (NUÑEZ et al., 2009). Estas frações foram identificadas como uma desintegrina chamada Batroxostatina a partir da análise espectrométrica, a qual também foi identificada na análise por espectrometria de massas dos venenos das *B. atrox* fêmeas. Com relação às frações P2, P3 e P4, encontradas tanto em fêmeas como em machos, é possível sugerir, a partir dos dados obtidos por Nuñez et al., (2009), que correspondam às PIII-SVMP. Estes resultados, parecem estar relacionados com o perfil proteômico dos *pools* de veneno obtido por espectrometria, já que o P1 identificado possivelmente como batroxostatina, apareceu no veneno das fêmeas e os picos P2, P3 e P4 que poderiam corresponder às PIII-SVMP, que foram identificadas nos dois *pools* de veneno.

Embora a atividade proteolítica sobre a caseína tenha apresentado valores próximos entre os dois grupos, os valores das médias mostraram que as fêmeas tem maior atividade caseinolítica (641,8 U/mg de proteína) que os machos (573,3 U/mg de proteína). Porém, semelhantemente ao que ocorreu com a dosagem de proteínas, os valores de atividade caseinolítica dos *pools* de venenos foram inversos, ou seja, os machos apresentaram maior atividade do que as fêmeas, com 974 e 864 U/mg de proteína, respectivamente. No entanto, tal diferença não foi decisiva na determinação da significância estatística entre os dados em nenhum dos

casos. É interessante notar que Villegas et al., 1993 encontrou diferença na atividade caseinolítica em venenos de *B. atrox in natura* e liofilizados, sendo que o primeiro apresentou maior atividade caseinolítica. Este dado demonstra que parte dessa atividade é perdida durante o processo de liofilização.

Considerando que a caseína é um substrato degradado por SVMs e SVSPs (MENEZES et al., 2006), os valores registrados pela atividade caseinolítica dos venenos dos grupos de análise coincidiriam com a presença destes grupos proteicos encontrados na análise espectrométrica dos venenos de fêmeas e machos.

Assim como ocorreu com os perfis eletroforéticos mono e bidimensionais, as zimografias para os dois grupos de análise também foram semelhantes, em ambas as condições, nos géis contendo gelatina e caseína. Nas zimografias contendo caseína, tanto nos *pools* como individualmente, foi observada atividade enzimática entre 25–35 kDa. Como as SVSPs se localizam numa faixa de massa molecular de 26 a 67 kDa (SERRANO; MAROUN, 2005), pode-se supor que as bandas presentes neste perfil zimográfico correspondam a atividade proteolítica dessas proteínas. Portanto, que as SVSPs participam desta ação caseinolítica.

Conjuntamente, os perfis zimográficos dos venenos contendo gelatina, tanto dos *pools* quanto individuais, tiveram um comportamento bem parecido entre eles, com atividade proteolítica na região entre 50 e 70 kDa e outras abaixo dos 37 kDa. Este comportamento dos venenos de fêmeas e machos neste tipo de zimografia foi similar ao observado em dois venenos de *B. atrox*. (AM-1 e AM-3) originárias de Alto Maraón–Amazonas, Peru, os quais se diferenciaram dos outros seis perfis descritos por Ortiz et al., (2012). Ademais, quando foram comparados os resultados dos perfis zimográficos individuais de fêmeas e machos com os do trabalho realizados por Menezes et al., (2006), que descreveu a variação do proteoma nos venenos de fêmeas e machos de mesma ninhada de *B. jararaca*, encontrou-se semelhança entre os perfis zimográficos obtidos da atividade individual de machos e fêmeas das duas espécies de serpentes.

Analisando as bandas encontradas na zimografia contendo gelatina como substrato, além de confirmar a possível presença de SVSP pela atividade proteolítica ao redor de 30 kDa, a qual também foi registrada na zimografia com caseína como substrato, estaria indicando também a possível presença de PIII-SVMPs, que corrobora dados obtidos por Fox e Serrano (2009).

Com relação às atividades coagulantes, tanto com fibrinogênio quanto com plasma como substrato, é possível perceber a grande dispersão nos valores obtidos dessa atividade nos venenos analisados individualmente e nos *pools*. Talvez em virtude de tal comportamento nos valores de cada grupo de análise, somente os *pools* de veneno apresentaram diferença significativa estatisticamente entre os dois grupos de análise.

De acordo aos resultados, as fêmeas apresentaram maior capacidade de induzir a formação do coágulo nos diferentes substratos (plasma humano e fibrinogênio), em ambas as condições (individualmente e os *pools*), excetuando a análise individual dos venenos dos machos no substrato de fibrinogênio, em que a atividade coagulante foi treze vezes maior que das fêmeas.

Comparando com outros estudos realizados com venenos de *B. atrox*, a dose coagulante, tendo plasma como substrato, para adultos foi de 101,5 mg/L, enquanto que para os juvenis foi de 23 mg/L (LOPEZ-LOZANO et al., 2002). Saldarriaga et al., (2003) registraram um comportamento similar, sendo que os juvenis apresentaram maior atividade coagulante que os espécimes de 3 anos. Além disso, Salazar et al., (2007) mostraram diferenças na atividade coagulante em venenos de serpentes de diferentes regiões de Venezuela, mostrando que a serpente de “Puerto Ayacucho 1” apresentou maior atividade coagulante, com um valor de 17,5 U/mg. Em análises realizadas usando fibrinogênio como substrato, o veneno dessa mesma serpente (“Puerto Ayacucho 1”) também foi mais eficaz na atividade coagulante (18,6 U/mg); Malaga et al., (2000) determinaram que os juvenis de um ano foram mais eficientes que os adultos de cinco anos, com uma atividade coagulante de 23,59 U/mg. Esses dados mostram que existe variação nesta atividade, dependendo da origem da serpente, da idade e do sexo.

Comparando os resultados obtidos da DMC nos diferentes substratos com os perfil proteômicos dos *pools* obtidos por espectrometria de massas, pode-se observar que os venenos dos machos mostraram maior porcentagem de SVMPs que os das fêmeas, e a expressão destas proteínas está relacionada à ativação da protrombina e o fator X da cascata de coagulação (ANTUNES et al., 2010). Tal fato poderia sugerir que estas resultariam em uma DMC-P menor nos machos do que nas fêmeas. No entanto, ocorreu o contrário, tendo as fêmeas maior capacidade de coagulação na maioria dos casos, e sabendo que o *pool* de veneno deste grupo possui uma porcentagem menor de SVMP em comparação aos machos, a possível explicação é que estas proteínas e outras, como SVSPs e PLA₂s, que integram os venenos de serpentes, podem atuar tanto independentemente como sinergicamente entre elas, gerando assim, o dano local e sistêmico (DOLEY; KINI, 2009; VONK et al., 2011).

Com relação à atividade PLA₂, apesar dos machos terem apresentado quase o dobro de atividade em ambas as condições (*in natura* e *pool*), só houve significância estatística quando os venenos foram avaliados individualmente. Análises feitas previamente com o veneno de *B. atrox*, como o de Queiroz et al., (2008), mostrou que, dentre as serpentes do gênero *Bothrops*, a *B. atrox* foi uma das quais apresentou maior atividade PLA₂; e Malaga et al., (2000) descreveu maior atividade PLA₂ entre as serpentes *B. atrox* jovens de 2 anos do que em serpentes adultas de 5 anos de idade, com valores de 26,9 e 1,72 U/mg de proteína, respectivamente. Esses resultados mostram diferenças da atividade de PLA₂, tanto entre espécies, quanto ontogenética. Nossos resultados evidenciam a diferença entre sexos desta espécie corroborando dados sobre a diversidade na composição dos venenos desses animais.

A atividade de PLA₂ está ligada diretamente à presença de PLA₂s no veneno dos dois grupos de análise. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que os machos tem maior atividade em comparação com as fêmeas. Porém, pela análise espectrométrica dos venenos, foi possível notar que o veneno das fêmeas apresentaram maior porcentagem de PLA₂s, sendo quase o dobro do conteúdo dos machos. Isto mostra que a quantidade das proteínas PLA₂ nos venenos não é o fator

primordial na variação da atividade fosfolipásica. Outro exemplo é que as PLA₂ possuem atividade anticoagulante e são capaz de inibir a agregação plaquetária (SOARES et al., 2004; TEXEIRA et al., 2003), e, como o veneno das fêmeas apresentou maior quantidade de PLA₂s poderia resultar em uma diminuição da capacidade coagulante desse veneno, fato que não foi observado nos resultados das DMC-P e DMC-F, uma vez que os venenos das fêmeas tiveram uma maior capacidade de coagulação do que os venenos dos machos. É importante considerar que existem PLA₂s que não apresentam atividade enzimática, mas outras atividades como miotóxicas (CARDOSO et al., 2010). Portanto, tal fato poderia explicar a presença de maior quantidade desta proteína no proteoma dos venenos dos machos e maior atividade enzimática no das fêmeas.

Com relação à atividade LAAO, os dois grupos de estudo tiveram valores muito próximos quando os venenos foram analisados individualmente, sendo de 14,7 U/mg para as fêmeas e 13,2 U/mg para os machos. Porém, quando foram analisados os *pools* dos venenos, os machos tiveram cerca de 30% maior atividade do que os venenos das fêmeas, sendo respaldado este resultado pela significância estatística obtida. Foi observada também diferença ontogenética na atividade de LAAO no veneno da *B. atrox* em estudo realizado por Malaga et al., (2000), sendo que o veneno de adultos apresentou maior atividade de LAAO do que o de jovens de um ano.

Analisando a presença do grupo proteico das LAAO na análise proteômica porcentagens semelhantes de LAAOs encontradas concordam com o comportamento registrado da atividade de LAAO dos venenos analisados individualmente. As LAAOs tem a capacidade de induzir ou inibir a agregação plaquetária, além de favorecer a hemorragia, hemólises, a aparição de edema, entre outras atividades biológicas (BORDON et al., 2015; IZIDORO et al., 2014; NAUMANN et al., 2011). Nesse trabalho não foi possível notar a ação direta da LAAO sobre a capacidade coagulante (DMC) dos venenos.

Com relação aos ensaios em modelos animais, a determinação da ação hemorrágica dos venenos mostrou que o *pool* de venenos dos machos apresentou

quase o dobro da capacidade hemorrágica do *pool* de venenos das fêmeas. Os valores obtidos neste estudo corroboram estudos prévios como os de Saldarriaga et al., (2003), com 1,8 µg/camundongo em espécimes de três anos de idade, Salazar et al., (2007), com uma faixa de 2,5 a 5,6 µg/camundongo de *B. atrox* de diferentes regiões da Venezuela e Freitas-de-Sousa et al., (2015), registrando 2,25 µg/camundongo em venenos obtidos de *B. atrox* em cativeiro.

O comportamento observado nos venenos dos machos para gerar hemorragia eficientemente pode estar associado ao alto conteúdo de SVSP encontradas na análise espectrométrica e a suas maiores atividades PLA₂ e LAAO, já que como foi mencionado anteriormente, a presença de PLA₂s e LAAOs nos venenos das serpentes poderiam intervir na hemostasia do envenenamento.

Considerando o ensaio da DL₅₀, os resultados obtidos nesse estudo corroboram dados obtidos por Frauches (2007) que obteve DL₅₀ de 120,9 µg/camundongo em veneno de *B. atrox*. É importante notar que, comparando a letalidade dos venenos entre *pools* de machos e fêmeas, ocorreu o contrário do que na DMH, ou seja, o *pool* de venenos das fêmeas tiveram maior capacidade de gerar a morte dos camundongos que o *pool* de veneno dos machos. Lembrando que nos venenos das fêmeas foram identificados compostos exclusivos (principalmente SVMPs e PLA₂s) através das análises cromatográficas e espectrométricas, além de uma maior capacidade coagulante, seria possível sugerir que o comportamento divergente entre a DMH e a DL₅₀ indicaria a sinergia entre estes compostos no veneno das fêmeas, atingindo processos mais sistêmicos na presa, para alcançar de forma mais eficiente a sua morte.

O presente trabalho mostrou algumas diferenças no comportamento entre os venenos de machos e fêmeas da espécie *B. atrox*, quanto às características bioquímicas e atividades biológicas. Para *B. jararaca* tem sido realizados diversos estudos que demonstram a diferenciação existente entre fêmeas e machos. Foi assim que Furtado et al., (2006) evidenciou a variabilidade bioquímica e farmacológica no veneno desta espécie, Meneses et al., (2006) determinou a variabilidade proteômica existente entre o veneno de fêmeas e machos de mesma ninhada de *B. jararaca*,

Pimenta et al., (2007) encontrou, por análises espectrométricas, diferenças entre os peptídeos potenciadores de bradiquinina entre os dois grupos de interesse, Zelanis et al., (2016) conseguiu reconhecer diferenças nos padrões de glicosilação e na combinação das cadeias que compõem as estruturas quaternárias das PIIId-SVMPs e CTLs.

Em resumo, os ensaios quantitativos dos *pools* que apresentaram diferenças, com base na análise estatística, foram a DMC-P, a DMC-F e a atividade LAAO. Para os ensaios feitos individualmente, com os venenos de cada grupo de análise, só apresentaram diferenças significativas a dosagem de proteína e a atividade PLA₂. Para as outras análises realizadas, mesmo que não tenham apresentado diferença significativa entre seus dados, foi possível identificar possíveis diferenças intrínsecas nos venenos de cada grupo, que se refletiram ao longo dos resultados expostos neste trabalho.

A partir dos resultados obtidos, e, lembrando que os venenos das serpentes utilizadas neste trabalho tiveram os mesmos pais e estiveram submetidos à condições ambientais iguais, por serem todas irmãs, nascidas em cativeiro e habitarem na mesma sala, com a mesma frequência e tipo de alimentação, estando a condições de humidade e temperatura idênticas, é possível sugerir que, além dos aspectos filogenéticos, geográficos, ontogênicos, ambientais, entre outros, que influenciam nas atividades biológicas, e também no seu perfil proteico, existam outros aspectos que intervêm nestas características dos venenos.

Sabendo que o estudo enfoca as diferenças presentes nos venenos entre fêmeas e machos, um desses fatores que promove as diferenças nos venenos poderia estar relacionado com a fisiologia do organismo, especificamente com os hormônios. Um exemplo disso é o estudo realizado por Thoenen e Barde (1980) que conseguiram determinar que a modulação do fator NGF, presentes nas glândulas salivares dos camundongos machos, está relacionada com a expressão do hormônio masculino testosterona, que coincidentemente, foi um dos compostos proteicos encontrados no perfil espectrométrico do *pool* de venenos de *B. atrox* machos. Outros desses fatores podem estar relacionados à transcriptômica, em que é

analisado o material genético que vai ser usado para processos de transcrição e tradução das proteínas. Assim, trabalhos como os de Zelanis et al., (2011, 2012) determinaram mudanças na quantificação em algumas SVMP P-I e P-III entre filhotes e adultos de *B. jararaca*. Além disso, Junqueira-de-Azevedo et al., (2014) identificaram genes parálogos ao veneno de toxinas presentes em *B. jararaca*, que podem transcrever para outro tipo de proteínas com funções diferentes ao aporte de toxicidade no veneno da serpente. Esses trabalhos oferecem sugestões para determinar a influência gênica na composição final dos venenos das serpentes. Esses estudos fornecem também conhecimento sobre os fatores intrínsecos de cada organismo, que, juntamente com a análise dos fatores extrínsecos dos indivíduos, geraria robustez nas explicações sobre a variabilidade dos venenos.

7 CONCLUSÕES

- Com relação às análises bioquímicas, os venenos de machos e fêmeas de *B. atrox* possuem diferença na sua quantidade de proteína e mostram diferenças intrínsecas na sua composição proteica, suportado a partir das análises cromatográficas e espectrométricas.

- De acordo com as análises biológicas, os venenos de fêmeas e machos de *B. atrox* apresentaram diferenças na capacidade coagulante (plasma/fibrinogênio), nas atividades fosfolipásica e de L-aminoácido oxidase.

- As análises proteômicas e atividades biológicas para os venenos de fêmeas e machos de *B. atrox* mostram diferenças intrínsecas ao sexo, mesmo que não sejam respaldados pela análise estatística.

- É evidente que aspectos que interferem no repertório proteômico dos venenos de *B. atrox*, tais como, a localização geográfica, a ontogenia, o sexo e a alimentação não são os únicos parâmetros que conferem aos venenos desta espécie sua plasticidade proteômica.

REFERÊNCIAS*

- ALVES, R. M. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox***. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- ANTUNES, T. C. et al. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1443-1458, 2010.
- ASSAKURA, M.; FURTADO, M.; MANDELBAUM, F. Biochemical and biological differentiation of the venoms of lanceheads vipers (*B. atrox*, *B. asper*, *B. marajoensis* and *B. moojeni*). **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 102b, p. 727-732, 1992.
- BALDO, C. et al. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedii* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 54-65, 2008.
- BERNARDE, P. S. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. São Paulo: Anolis Books, 2014. 223 p.
- BERNARDES, C. P. et al. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new PI metalloproteinase. **Journal of Proteomics**, v. 80, p. 250-267, 2013.
- BOLDRINI-FRANÇA, 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. 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, n. 1, p. 9, 2015.
- BRASIL: MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília. Fundação Nacional de Saúde; 1998.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostases. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 851-859, 2000.
- CALVETE, J. J. et al. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 510-527, 2011.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAMPBELL, J.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca and London: Comstock Publishing Associates, 1989. 765 p.

CAMPBELL, J.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates, 2004. 570 p.

CARDOSO, J.; FAN, H. Snakebites in South America. In: MEIER, J.; WHITE, J. (eds.). **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1995. p. 261-329.

CARDOSO, K. C. et al. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

CARRASCO, P. A. et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, n. 2, p. 109-124, 2012.

CARRILLO, N.; ICOCHEA, J. Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. **Publicaciones del Museo de Historia Natural Javier Prado. UNMSM**. Serie A. v. 49, p. 27, 1995.

CAVINATO, R.; REMOLD, H.; KIPNIS, T. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 257-267, 1998.

CHIPPAUX, J.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-303, 1991.

CINTRA, A. C. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 60, p. 70-82, 2012.

COSTA, H.; BÉRNILS, R. Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**, São Paulo, v. 4, n. 3, novembro, 2015. Disponível em: <https://issuu.com/herpetologiabrasileirasbh/docs/hb_2015-03-g/1>. Acesso em: 22 jul. 2016.

CULMA, M. F. et al. Snake venomomics of *Bothrops punctatus*, a semiarboreal pitviper species from Antioquia, Colombia. **PeerJ**, v. 2, p. e246, 2014.

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

DA SILVA, N.; SITES, J. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: *Micrurus*) based on molecular characters. **Herpetologica**, v. 57, n. 1, p. 1-22, 2001.

DE MOURA, V. et al. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015.

DE OLIVEIRA PARDAL, P. et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 28-42, 2004.

DE SOUZA, C. **Efeitos locais e sistêmicos envolvidos no envenenamento induzido pelo veneno da serpente *Bothrops atrox***. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biología Experimental) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho. 2008.

DOAN, T.; ARIZÁBAL, W. Microgeographic variation in species composition of the herpetofaunal communities of Tambopata Region, Peru. **Biotropica**, v. 34, n. 1, p. 101-117, 2002.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1971. 333 p.

FOX, J.; SERRANO, S. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 909-920, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200-209, 2009.

FRANÇA, F.; MÁLAQUE, C. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 22-41.

FRANQUEIRO, E. P. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de lectina do veneno de *Bothrops atrox***. 2007. 118 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2007

FRAUCHES, T. S. **Anticorpos monoclonais contra as principais toxinas do veneno de *bothrops atrox*: uma perspectiva para o uso terapêutico**. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2007.

FREITAS-DE-SOUSA, L. A. et al. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. **Biochemistry**, v. 118, p. 60-70, 2015.

FRIEDERICH, C.; TU, A. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Biochemistry & pharmacology: open access. [electronic resource]**, v. 20, p. 1549-1556, 1971.

FRISCHAUF, A.; ECKSTEIN, F. Purification of a phosphodiesterase from *Bothrops atrox* by affinity chromatography. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 32, p. 479-485, 1973.

FRY, B. et al. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 17, n. 18, p. 2047-2062, 2003.

FURTADO, M.; COLLETO, G.; DIAS-DA-SILVA, W. Caracterização biológica dos venenos botrópicos. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 53, p. 149-159, 1991.

FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. T. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 48, n. 4, p. 401-410, 2006.

GARCÍA, S.I. **VI Reunión de Expertos en Envenenamiento por animales ponzoñosos**. Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, Cuernavaca, México: Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, 2003. 110 p.

GARTNER, T.; STOCKER, K.; WILLIAMS, D. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Letters**, v. 117, p. 13-16, 1980.

GIBBS, H. 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.

GONÇALVES-MACHADO, L. et al. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of Proteomics**, v. 135, p. 73-89, 2016.

GREENE, H. W. **Snakes: The evolution of mystery in nature**. Berkeley: University of California Press, 1997. 365 p.

GUÉRCIO, R. A. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome science [electronic resource]**, v. 4, n. 11, p. 14, 2006.

GUEVARA, N. C. **Algunas propiedades catalíticas de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón"**. 2009. 71 f. Tese (Profissional em Biologia) - Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú. 2009.

GUTIÉRREZ, J.; CHAVES, F. Proteolytic, hemorrhagic and myonecrotic effects of the venoms of Costa Rican snakes from the *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis*. **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 315-321, 1980.

GUTIÉRREZ, J.; CERDAS, L. Mechanisms of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Revista de biología tropical**, v. 32, n. 2, p. 213-222, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: MEIER, J.; WHITE, J. (Eds). **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. Florida: CRC Press, 1995. v. 236, p. 645-665.

GUTIÉRREZ, J.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimistry**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J.; THEAKSTON, R.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Med**, v. 3, n. 6, p. 727-731, 2006.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontology Electronic**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HEREDIA, V.; CAMPOS, S.; YARLEQUÉ, A. 5' nucleotidase activity in the venom of *Bothrops atrox* (L.) Jergón. **Acta científica venezolana**, v. 33, n. 4, p. 333-337, 1982.

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, 1980.

HOFMANN, H.; BOM, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox* 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. **Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 780-787, 1987.

HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, v. 34, n.10, p. 1149-1155, 1996.

HUATUCO, S.; ESCOBAR, E.; YARLEQUÉ, A. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). **Revista peruana de biología**, v. 11, n. 1, p. 79-86, 2004.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in Snake Venom. In: LEE, C. Y. **Snake venoms**. New York: Springer, 1979. Cap. 4, p. 61-158.

IZIDORO, L. F. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed research international**, v. 2014, p. 19, 2014.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. et al. Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. **Molecular biology and evolution**, p. 337, 2014.

KINI, M.; EVANS, H. effects of snake venom proteins on blood platelet. **Toxicon**, v. 28, n. 12, p.1387-1422, 1990.

KIRBY, E. P. et al. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom 1. Purification and characterization of the enzyme. **Biochemistry**, v. 18, n. 16, p. 3564-3570, 1979.

KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid Oxidase. **Analytical biochemistry**, v. 298, n. 1, p. 136-139, 2001.

KOSTIZA, T.; MEIER, J. Nerve growth factors snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon**, v. 34, n. 7, p. 787-806, 1996.

KOZLOVA, E. E. **Purificación parcial y caracterización bioquímica de un factor de difusión del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (Jergón)**. 2011. 60 f. Tese (Bachiller en Ciencias Biológicas) – Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, 2011.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

LAZO, F. et al. Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (jergón). **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 73, n. 34, p. 197-207, 2007.

LOAYZA, S. et al. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. **Boletín de la Sociedad Química del Perú**, LII, n. 3, p. 151-163, 1985.

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. **Revista de Biología Tropical**, v. 31, n. 1, p. 37-40, 1983.

LÓPEZ-LOZANO, J. L. et al. Ontogenic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 997-1006, 2002.

LORÍA, G. D. et al. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 418, n. 1, p. 13-24, 2003.

MACKESSY, S. P. Venom ontogeny in the pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. **Copeia**, v. 1988, n. 1, p. 92-101, 1988.

MALAGA, O. et al. Variaciones en la composición proteica, actividades enzimáticas y biológicas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (vipereidae) en relación con la edad. **Revista Peruana de Biología**, V.7, n. 2, p. 161-170, 2000.

MANRIQUE, F. **Purificación, Caracterización y Actividad Biológica de uma L-Aminoácido Oxidasa Presente en el Veneno de la Serpiente *Bothrops atrox* “Jergón”**. 2005. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de Marcos, Lima. 2005.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MARQUES, O.; SAZIMA, I. História natural das Serpentes. In: CARDOSO, J. L. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. Ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 71-80.

MARTINS, M.; GORDO, M. *Bothrops atrox* (Common Lance-head). **Herpetological review**, v. 24, n. 4, p. 151-152, 1993.

MEBS, D. Toxicity in animals: Trends in evolution? **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 87-96, 2001.

MEIER, J. Individual and age-dependent variation in the venom of the Fer-the-lance (*Bothrops atrox*). **Toxicon**, v. 24, n. 1, p. 41-46, 1986.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. Ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 42-70.

MENALDO, D. et al. Purification procedure for the isolation of a PI metalloprotease and an acidic phospholipase A 2 from *Bothrops atrox* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 21, n. 1, p. 14, 2015.

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.

MORA-OBANDO, D. et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbeii* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. **Journal of Proteomics**, v. 96, p. 159-172, 2014.

NAHAS, L., KAMIGUTI, A. S., BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X activator components of *Bothrops* snake venoms. **Tromboseis and Haemostase**, v. 41, n.2, p. 314-328, 1979.

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 of the United States of America**, 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.

NEIVA, M. et al. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v. 53, n. 4, p. 427-436, 2009.

NIEMIAROWSKI, S. et al. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. **Biochemistry**, v. 18, n. 16, p. 3570-3577, 1979.

NISHIDA, S. et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 1843-1849, 1994.

NÚÑEZ, V. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 57-78, 2009.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OHNO, M. et al. Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 59, p. 307-364, 1998.

OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. N. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 06-21.

OROPEZA, D. L. et al. Ofidismo por *Bothrops atrox*: estudio clínico epidemiológico. **Diagnóstico (Perú)**, v. 39, n. 5, p. 261-265, 2000.

ORTIZ, C. et al. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón", de tres zonas geográficas del Perú. **Revista peruana de medicina experimental y salud pública**, v. 29, n. 2, p. 198-205, 2012.

OTERO, R. et al. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990). **Acta médica colombiana-AMC:organo de la Asociación Colombiana de Medicina Interna**, v. 17, p. 229-249, 1992.

OWNBY, C. Pathology of rattlesnake envenomation. In: TU, A. T. (ed). **Rattlesnake venoms**. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 163-209.

PALACIOS, J.; ZARTA, E. **Estudio químico y de toxicidad del veneno de serpientes de la familia viperidae *Bothrops atrox* mantenidas en cautiverio en el serpentario de la universidad de la amazonia**. 2009. 66 f. Tese (Profissional em Biologia) – Faculdade de Ciencias Biológicas, Universidade da Amazonia. Florencia – Caqueta, 2009.

PANTIGOSO, C. et al. Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteinasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* “Jergón”. **Acta Científica venezolana**, v. 47, n. 1, p. 67-73, 1996.

PATÍÑO, C.; BLANCA, S. Serpientes venenosas. **Boletín Grupo de Estudios de Animales Silvestres**, v. 3, n. 5, p. 37-42, 2002.

PATÍÑO, A. C. et al. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6. p. 936-943, 2010.

PETRETSKI, J. H. et al. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 11, p. 1293-1300, 2000.

PIERINI, S. V. et al. High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and Amazonian indians of the Jurua valley Acre state Brazil. **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 225–236, 1996.

PIMENTA, D.C. et al. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 21, n. 6, p. 1034-1042, 2007.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-851, 2008.

RODRIGUES, F. G. et al. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. **Molecular immunology**, v. 40, n. 16, p. 1149-1156, 2004.

ROJAS, G.; BOGARIN, G.; GUTIERREZ, J. M. Snakebite mortality in Costa Rica. **Toxicon**, v. 35, n. 11, p. 1639-1643, 1997.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BURCHERL, W.; BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V. (ed). **Venomous Animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. p. 345-841.

RUSSELL, F. E. et al. Snakes and snakebite in Central America. **Toxicon**, v. 35, n. 10, p. 1469-1522, 1997.

SAAD, E. et al. Intraspecific variation of biological activities in venoms from wild and captive *Bothrops jararaca*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16-17, p. 1081-1090, 2012.

SALAZAR, A. M. et al. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. **Thrombosis Research**, v. 120, n. 1, p. 95-104, 2007.

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 venom from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95-103, 1992.

SANCHEZ, E. F. et al. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 468, n. 2, p. 193-204, 2007.

SANCHEZ, E. F. et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 496, n. 1, p. 9-20, 2010.

SANDOVAL, G. A. et al. Inmunogenicidad del veneno de *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae) y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos. **Revista Peruana de Biología**, v. 18, n. 3, p. 335-342, 2011.

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.; VAZQUEZ, S. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 19-22, 2003.

SAVAGE, J. M. **The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between Two Continents, between Two Seas**. University of Chicago Press, Chicago. 2002. 945 p.

SEGRE, L. et al. Accidentes humanos por ofidios en Argentina. **Revista Brasileira de Toxicología**, v. 13, p.41, 2000.

SEIFERT, F. et al. Glutamyl Cyclases Display Significant Catalytic Proficiency for Glutamyl Substrates. **Biochemistry**, v. 48, p. 11831–11833, 2009.

SERRANO, S. M. 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, 2005.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.

SILVA, J. Las serpientes del género *Bothrops* en la Amazonia colombiana: aspectos biomédicos (epidemiología clínica y biología del ofidismo). **Acta médica colombiana-AMC: organo de la Asociación Colombiana de Medicina Interna**, v. 14, n. 3, p. 148–65, 1989.

SMALLIGAN, R. et al. Crotaline snake bite in the Ecuadorian Amazon: Randomised double blind comparative trial of three South American polyspecific antivenoms. **BMJ global health**, v. 329, n. 7475, p. 1129–1135, 2004.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOARES, A.; FONTES, M.; GIGLIO, J. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 17, p. 1677-1690, 2004.

STEPHAN, A. et al. Mammalian glutaminyl cyclases and their isoenzymes have identical enzymatic characteristics. **FEBS Journal**, v. 276, p. 6522–6536, 2009.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Methods in enzymology**, v. 45, p. 214-223, 1976.

TAMBOURGI, D. V. et al. Manipulation of the complement system by animal venoms. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 54, n. 2, p. 9-10, 1992.

TEIXEIRA, C. F. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003.

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. 949-956, 1983.

THOENEN, H.; BARDE, Y. A. Physiology of nerve growth factor. **Physiological reviews**, v. 60, p. 1284–1235, 1980.

VILLARROEL, M. S. et al. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *B. jararaca*. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 42-43, p. 345-355, 1978.

VILLEGAS, L.; AGUIRRE, E.; ZAVALA, A. Efectos d la liofilización sobre cuatro actividades biológicas del veneno de *Bothrops atrox* (Serpentes:Viperidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 41, n. 3B, p. 851-853, 1993.

VIVAS-RUIZ, D. E. et al. Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: Molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties. **Biochimistry**, v. 95, n. 7, p. 1476-1486, 2013.

VONK, F. J. Snake venom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery. **Bioessays**, v. 33, n. 4, p. 269-279, 2011.

WALDEZ, F.; VOGT, R. C. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 681-692, 2009.

WALLACH, V.; WILLIAMS, K.; BOUNDY, J. **Snakes of the world: a catalogue of living and extinct species**. Boca Raton: CRC PRESS, 2014.

WANG, Y.; HUANG, K.; TSAI, I. Snake venom glutaminyl cyclases: Purification, cloning, kinetic study, recombinant expression, and comparison with the human enzyme. **Toxicon**, v. 86, p. 40-50, 2014.

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. 732-740, 1989.

WARRELL, D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: CAMPBELL, J.; LAMAR, W. (eds). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 2004. v. 1, p. 709-761.

WIEZEL, G. et al. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, v. 107, p. 359-368, 2015.

ZAVALETA, A.; SALAS, M. Ofidismo: envenenamiento por mordedura de serpientes. In: MARTÍNEZ-VILLAYERDE, J. et al. (eds). **Emergencias en Medicina Interna**. Lima, Perú, 1996. p. 241-260.

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 Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2278-2291, 2010.

ZELANIS, A. et al. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Proteomics**, v. 11, n. 21, p. 4218-4228, 2011.

ZELANIS, A. et al. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **PLoS neglected tropical diseases [electronic resource]**, v. 6, n. 3, p. e1554, 2012.

ZELANIS, A. et al. Proteomic identification of gender molecular markers in *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Proteomics**, v. 139, p. 26-37, 2016.

ZELLER, E. A.; MARITZ, A. Über eine neue I-Aminosäure-oxydase. (1. Mitteilung). **Helv. Chim. Acta**, v. 27, n. 1, p. 1888-1902, 1944.

APÊNDICE

A - Registro total dos compostos encontrados nos *pools* de veneno de machos e Fêmeas, através da análise em nanoESI-qTOF.

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F e M	L-amino-acid oxidase (Fragment)	B5AR80	LAAO	<i>Bothrops pauloensis</i>	57,2	6,3	32,66 F 48,03 M	38373 F 5556 M	MNVFFMFSL FLAALGSCAD DGNPLEECFR ETDYEEFLEI AKNGLSATS PKHVVIVGAG MSGLSAAYVL ANAGHQVTVL EASKRAGGRV RTYRNDKEGW YANLGPMLRP EKHRIVREYI RKFGQLQNEF SQENENAWYF IKNIRKRVGE VNKDPGVLEY PVKPSEVGKS AGQLYEESLQ KAVEELRRTN CSYMLNKYDT YSTKEYLLKE GNLSPGAVDM IGDLLNEDSG YYVSFIESLK HDDIFAYEKR FDEIVGGMDK LPTSMYQAIQ EKVRNLNVRV KIQQDVKEVT VTYQTSAKET LSVTADYVIV CTTSRAARRI KFEPLPPKK AHALRSVHYR SGTKIFLTCT KKFWEEDDGIH GKGSTTDLPS RFIYYPNHNF PSGVGVIAY GIGDDANFFQ ALDFKDCGDI VINDLSLIHQ LPKEEIQAF C RPSMIQRWSL DKYAMGGITT FTPYQFQHS EALTAPVDRI YFAGEYTAQA HGWIDSTIKS GLTAARDVNR ASE
F e M	Metalloproteinase batroxstatin-2 (Fragment)	C5H5D3	PIII-SVMP	<i>Bothrops atrox</i>	48,3	7,7	0,35 F 0,43 M	369 F 1291 M	EQQRYLNAKK YVKLVLVADY IMYLYGRSL TTLRTRMYDI VNIINLIFQR MNIHVALVGL EIWSNRDKII VQSSADVTLD LFAKWRETDL LKRKSHDNAQ LLTGINFNGP TAGLAYLSGI CKPMYSAGIV QDHNKVHHLV AIAMAHMGH NLGMDHDKDT CTCGARSCVM AGTLSCEPSY LFSDCSRRGH RAFLIKDMPQ CILEKPLRTD VSPPPVCGNY FVEVGEECD C GSPATCRDTC CDAATCKLRQ GAQCAEGLCC DQCRFKGAGT ECRAAKDECD MADLCTGRSA ECTDRFQRNG QPCQNNNGYC YNGTCPIMRD QCIALFGPNA AVSQDACFQF NLQGNHYGYC RKEQNTKIAC EPQDVKCGRL YCFSSPATK NPCNIHSPN DEDKGMVLPG TKCADGKACS NGRCVDVT
F e M	Metalloproteinase batroxstatin-3 (Fragment)	C5H5D4	PIII-SVMP	<i>Bothrops atrox</i>	48,2	6,2	2,6 F 4,6 M	353 F 6691 M	EQQRYLNATK YIKLVIVADN VMVRKYTHNL IDIRKRIFEI VNILSLIYLS MNINVALVGV DIWTNGDKIN VTSAVEPTLA SFGTWRERDL LNRKTHDNAQ LLTGINLNGD TVGYAYIGSM CMPKQSVGIV QDHGKTYHLV AVTMAHELGH NLGMDHHRDS CTCLANSCIM SATISPSYQF SDCSQNDHLR YLISHTPQCI LNEPLRTDIV SPEVCGNYLL EEEGEECDGP LWNCQNPCCN AATCKLTPGA QCAEGLCCYQ CRFIKAGNVC RPPRSECDIA ESCTGQSAHC PTDRFHRNGQ PCLNNHGYCY NGNCPIMLYQ CIALFGAGTT VAEDVCFNYN LDGQGGFFYCR RENDRIFFCA KEDVKCGRLY CKVYNDNVHP CRYQYLDNGM VDHGKCAVG KVCNRRQCVD VNTP
F e M	Acidic phospholipase A2 BpirPLA2-I	C9DPL5	PLA ₂	<i>Bothrops pirajai</i>	14,4	4,9	-	2011 F 959 M	NLWQFGKLIM KIAGESGVFK YLSYGCYCGL GGQGGQPTDAT DRCCFVHDC YGVKTGCDPK IDSITYSKEN GDVVCGGDDP CKKQICECDR VAATCFRDNK DTYDIKYWFY GAKNCQEESE PC
F e M	BOTNU MP_11 SVMP (Fragment)	E3UJL3	PI-SVMP	<i>Bothrops neuwiedi</i>	27,6	6,1	-	952 F 6256 M	KMCGVTETNW ESYEPIKKAS QSNLTPEQQR FSPRYVELAV VADNGMFTKY NSNLNTRTR VHEMNTVNG FFRSMNVDS LANLEVWVSK DLIKVEKDSS KTLTSFGWEWR ERDLLPRISH DHAQLLTIV FDQQTIGMAY TAGMCDPSQS VAVVMDHSHK NIRVAVTMAH ELGHNLGMDH DDTCTCGAKS CIMASTISKG LSFEFSDCSQ NQYQTYVTKH NPQCILNKPL LTVSGNELLE AGE

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F	BOTNU MP_I2 SVMP (Fragment)	E3UJL4	PI-SVMP	<i>Bothrops neuwiedi</i>	27,6	5,6	-	669	KMCGVTETNW ESDEPIEKAS QSNLTPEQQK FSPKYIELAV VADHGMFTKY NSNVNTIRTW VHEMVNSLNG FFRSMNVDS LVNLEVWSKK DLIKVEKDSS KLTLSFGWEWR ERDLLPRISH DHAQLTTIV FDQQTIGIAY TAGMCDPSQS VAVVMDHSHK NIRVAVTMAH ELGHNLMGDH DDTCTCGAKS CIMASTISKG LSFEFSDCSQ NQYQTYVTKH NPQCILNKPL LTVSGNELLE AGE
F e M	BOTNU MP_IIX3 SVMP (Fragment)	E3UJL9	PII-SVMP	<i>Bothrops neuwiedi</i>	34,7	6,2	1,79 F 1,33 M	436 F 6708 M	AQQAYLDAKK YVEFVVVL DH GMFTVYKDDL DKIKTKIYEI VNTMNMFIPI LNIRVALICL EIWSDRDKIN VTSAGDVTLS SFRKWRATDL LKRKSHDNAQ LLTVIDFDGS TLGLTRIATM CDPYRSVAII EDHSIISLKM AVIMAHMGMH NLGMKHDEKY CTCDATSCIM AAARVHRDRSK LFSNCSKKEC QTYLIKHRPQ CILNEPLRTD VVSRPVCONE LLEVGEEDCD GPPANCQNCQ CDAATCKLTP GSQCADGVCC DQCRFMKEGT VCWRPRGDDP DNCCNGISAG CPRFHFCG
F e M	BOTNU MP_Ila SVMP (Fragment)	E3UJM0	PII-SVMP	<i>Bothrops neuwiedi</i>	36	5,8	3,2 F 1,93 M	8147 F 3161 M	KMCGVTETNW ESYEPIKKAS QSNLTPEQQR FSPRYVELAV VADNGMFTKY NSNLNTIRTR VHEMVNTVNG FFRSMNVDS LANLEVWSKK DLIKVEKDSS KLTLSFGWEWR ERDLLPRISH DHAQLTTIV FDNYVIGITK FGKMCDPKLS VGVVLDSHSEI SLQVAVAMAH ELGHNLMGMH DGNQCHCNAP SCIMADTLSE ELSYEFSDCS QNQYQTYLTN RNPQCILNKPL LTVSGNELL EAGEECDCA PENPCCDAAT CKLRPGAQCA EGLCCDQCRF KGAGKICRRA RGDNPDDRCT GQSADCPNR FHA
F e M	Cysteine-rich secretory protein Pg-CRP	F2Q6F6	CRISP	<i>Cerrophidion godmani</i>	27,7	7,4	0,89 F 1,0 M	432 F 1163 M	MIAFIVLPIL AAVLQQSSGN VDFDSESPRK PEIQNKIVDL HNSLRSSVNP TASNMLKMEW YPEAANAER WAYRCIESHS PRNSRVLGGI KCGENIYMSS IPITWNEIHH AWHGEYKDFI FGVGANPPNA VTGHYTIQVW YKSYRIGCAA AYCPSSSEYS FYVCQYCPAG NIRGKTATPY KSGPPCGDCP SACDDGLCTN PCTREDKYTN CNSLVQKSGC QDTWMQSNCP AICFCQNKII
F	Acidic phospholipase A2 BmoPLA2	G3DT18	PLA ₂	<i>Bothrops moojeni</i>	16,5	5	-	1492	MRTLWIVAVL LLGVEGNLWQ FEMLMKIAK TSGFLFYSSY GCYCGWGGHG RPQDATDRCC FVHDCCYGVK TGCNPKTDSY TYSEENGDVV CGGDDPCKKQ ICECDRVAAT CFRDNKDTYD NKYWFFPAKN CQEESEPC
F	9SAUR Acidic secretory sPLA2-I	I2DAL4	PLA ₂	<i>Bothrops diporus</i>	16,2	4,9	-	1471	MRTLWIMAVL LVGVKGSVLQ FETLMKIAG RSGVWYYGSY GCYCGSGGGQ RPQDASDRCC FVHDCCYGVK TDCDPKADVY TYSEENGVVV CGGDDPCKKQ ICECDRVAAT CFRDNKDTYD NKYWFFPAKN CQEESEPC
F	9SAUR Acidic secretory sPLA2-II	I2DAL5	PLA ₂	<i>Bothrops diporus</i>	16,2	5	-	1471	MRTLWIMAVL LVGVKGSVLQ FETLMKIAG RSGVWYYGSY GCYCGSGGGQ RPQDASDRCC FVHDCCYGVK TGCNPKADTY TYSEENGVVV CGGDDPCKKQ ICECDRVAAT CFRDNKDTYD NKYWFFPAKN CQEESEPC
F	BOTBA Barnettobin (Fragment)	K4LLQ2	SP	<i>Bothrops barnetti</i>	28,3	6,3	-	816	APKELQVSYA HKSELVIGG DECINEHPF LAFLYSRGNF CGLTLINQEW VLTAHCDRR FMPIYLGHT LSPNDDEVI RYPKDNFICP NNNIIDEKDK DIMLIRLNRP VKNSEHAPI SLPSNLPSVG SVCVRMGWGS ITAPNDTFD VPHCANINLF NDTVCHGAYK RFPVKSRTLC AGVLQGGKDK CMGDSGGPLI CNGPFHGILF WGDDPCALPR KPALYTKGFE YPPWIIQIIA KNTTETCPP
F	BOTNU Phospholipase A2	M1TFP9	PLA ₂	<i>Bothrops neuwiedi</i>	16,1	4,8	-	1471	MRTLWIMAVL LVGVEGSLVQ FDTLMKIAG RSGIIFYSSY GCYCGLGGQG RPQDASDRCC FVHDCCYGVK TGCNPKADVY TYSEDNGDIV CGGDDPCKKQ ICECDRVAAT CFRDNKDTYD NKYWLFFPAKN CQEESEPC
F	BOTJA Botrocetin-2 alpha GN=bot-2A	M1V359	PIII-SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	17,8	8,1	-	358	MGRFIFVSFG LLVGFLSLSG TAADCPGWS SYEGNCYKFF QQKMNWADAE RFCSEAKGG HLVSIIKYSR EVDFVGDLYT KNIQSSDLYA WIGLRVQNK KQCSSWSDGS SVSYENVVER TVKKCFALEK DLGFLWLISL YCAQKNPFVC KSPPP

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F	Glutaminyl-peptide cyclotransferases	M9NCD2	GPC	<i>Cerrophidion godmani</i>	40,7	8,9	-	128	MARERRDSKA ATFFCLAWAL CLALPGFPQH YSHRPTILNA TCILQVTSQT NVNRMWQNDL HPILIERYPG SPGSYAVRQH IKHRLQGLQA GWLVEEDTFQ SHTPYGYRTF SNIISTLNPL AKRHLVIACH YDSKYFPPQL DGKVFVGATD SAVPCAMMLE LARSLDRQLS FLKQSSLPK ADLSLKLIF DGEEAFVRWS PSDSLYGSRS LAQKMASTPH PPGARNTYQI QGIDLFVLLD LIGARNPVFP VYFLNAARWF GRLEAIEQNL SDLGLNNYS SERQYFRSNL RRHPVEDDHI PFLRRGPIL HLPSPFPRV WHTMEGNEEN LNKPTIDNLS KILQVFVLEY LNLG
F e M	Thrombin-like enzyme KN-BJ 2	O13069	SP	<i>Bothrops jararaca</i>	28,6	8,7	0,73 F 0,63 M	1324 F 3410 M	MVLIRVLANL LILQLSYAQK ASELIGGRP CDINEHRSLA LVKYGNFQCS GTLINQEWVL SAAHCDGEKM KIH LGVHSHK VPNDKQTRV AKEKFFCLSS KNYTKWDKDI MLIRLDSPVK NSAHIAPI SL PSSPPIVGSV CRIMGWGTIS TSKVILSDVP HCANINLLNY TVCRAAYPEL PATSRTL CAG ILQGGKDT CV GDSGGPLICN GQFQGI VSWG SDVCGYVLEP ALYTKVSDYT EWINSIAGN TTATCPP
F e M	Zinc metalloproteinase bothropasin	O93523	PIII-SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	70,4	5,2	9,93 F 11,33 M	5702 F 2068 M	MEVLLVTIC LAAFPYQGSS ILESIGNVND YEVVYPRKVT ALPGKAVQPK YEDAMQYEFK VNGEPVVLHL EKNKGLFSKD YSETHSPDG REITYPAVE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHF LQRETYFIEP KLKSNSEAHA VFKEYENVEKE DEAPKMGV T QNWKS YEPIK KASQLVVTAE QQKYNPFYRV ELFIVVDQGM VTKNNGDLK IKARMYELAN IVNEILRYLY MHAALVGLEI WSGNDKITVK PDVDYTLNSF AEWRKTDLLT RKKHDNAQLL TAIDFNGPTI GYAYIGSMCH PKRNSVAIVED YSPINLVAV IMAHEMGNHL GIHHDTFCS CGDYPCIMGP TISNEPSKFF SNCSYIQCDW FIMKENPQCI LNEPLGTDIV SPPVCGNELL EVGEECD CGT PENCQNECCD AATCKLKSGS QCGHGDCCEQ CKFSKSGTEC RASMSECDPA EHCTGQSSEC PADVFHKNQG PCLDNYGYCY NGNCPIMYHQ CYALFGADVY EAEDSCFKDN QKGNYYGYCR KENGKKIPCA PEDVKCGRLY CKDNSPGQNN PCKMFYSNDD EHKGMVLP GT KCADGKVCSN GHCVDVATAY
F e M	Thrombin-like enzyme batroxobin	P04971	SP	<i>Bothrops atrox</i>	28,9	7,9	9,67 F 2,52 M	3629 F 6686 M	MVLIRVIANL LILQVSYAQK SSELVIGGDE CDINEHPFLA FMYSPRYFC GMTLINQEWV LTAAHCNRRF MRIHLGKHAG SVANYDEVVR YPKEKFICPN KKKNVITDKD IMLIRLDRPV KNSEHIAPLS LPSNPPSVGS VCRIMGWGAI TTSEDYTPDV PHCANINLFN NTVCREAYNG LPAKTL CAGV LQGGIDTCGG DSGGPLICNG QFQGILSWGS DPCAEPKPA FYTKVFDYLP WIQSIAGNK TATCP
F	Metalloproteinase BnP1 (Fragments)	P0C6S0	PI-SVMP	<i>Bothrops pauloensis</i>	9,7	8,7	0,35	1014	SQIKFKPSYI ELAVVADHGM FTKYNSNINT IRIVHEMVNT VDGFFRTITS FGEWRERDII PRSCIMASTI SKHNPQCIIN QPI
F e M	Metalloproteinase bothrojaractivase (Fragments)	P0C7A9	PI-SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	7,2	9,6	-	1029 F 11673 M	RYIELAVVAD HGMFTKYRVH ELVNTVNGFF RSKQDLIKVQ KDKTLTSFGE WRERDLLPRI
F	Snaclec bothroinsularin subunit alpha	P0C929	CTL	<i>Bothrops insularis</i>	15,6	5,4	1,36	438	DCPSDWSPYG QYCYKFFQK MNWADAERFC SEQAKGGHLV SFQSDGETDF VVNLVTEKI Q SSDLYAWIGL RVQNKEKQCS SKWSDGSSVS YENVVGRTVK KCFALEKEQE FFVWINIYCG QQNPFVCKSP PP
F e M	L-amino-acid oxidase (Fragments)	P0CC17	LAO	<i>Bothrops atrox</i>	13,7	5,1	-	14635 F 3219 M	ADDRNPLEER KFDLQLNRFS QENENAWYFI KNRVGEVNKD PGVLEYPVKP SEVGKSSAGQ LYEESLQKAH DDIFAYEKIK FEPLPPKKF WEDDGIHGGK IYFAGETAQA HGWIDSTIK

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F e M	Thrombin-like enzyme bhalternin	P0CG03	SP	<i>Bothrops alternatus</i>	28,7	8,3	1,78 F 0,15 M	1021 F 506 M	MVLIRVLANL LILQLSYAQK ASELVIGGDE CNINEHRSVL VLFNSSGFLC AGTLINQEWV LTAANCDRKN IRIKLGMSHK NVTNEDEQTR VPKRSTFVS AKTSHQTLGT RTSMLIRLKR PVNDSPHIAP LSLPSSPPSV GSVCRVMGWG TISPTKVSYP DVPHCANINL LDYEVCREAH GGLPATSRRL CAGILEGGKD SCQGDSSGGL ICNGQFQGL SWGVHPCGQP HKPGVYTKVS DYSEWISII AGNTDVTCP
F	L-amino-acid oxidase (Fragment)	P0DI89	LAO	<i>Bothrops leucurus</i>	3,6	4,1		32264	ADDRNPLEEC FRETDEEFL EIAKNGLSTT
F e M	Thrombin-like enzyme leucurobin	P0DJ86	SP	<i>Bothrops leucurus</i>	25,1	*	3,81 M	3629 F 142 M	VIGGDECDIN EHPFLAFMY SPYFCGMTL INQEWVLTAA HCNRRFMRIX ---HAGSVAN YDEVVR--- -FICPNKKK VITDKDIMLI RDRPVKNSE HIAPLSLPSN PPSVGSVCRI MGWGAITTSE DTPDVPHCA NINLFNNTVC REAYNGLPAK TLCAGVLQGG IDTCGGDSSG PLICNGQFQG ILSWGS DPCA EPRKPAFYTK VFDYLPWIS IIAGNKTATC P
M	Metalloproteinase BpirMP (Fragment)	P0DL29	PI-SVMP	<i>Bothrops pirajai</i>	20,4	*	-	3983	TYIEVAVVAD HRMFKKYNSN LNTIRKVVHE MVNSMNGVYR SMDVHLSLAN LEVWSKKDLI NVQKDSRETL KSFGEWRERD LLPRISHDNA QLLTAIVFDQ QTIGRAYIGG MCDPRHSGV VMDHSHKINLQ VAVTMAHELH HNLGMEHDEN QCHCDAPSCV M-----C-----TKHNP QCILNEPL
F	C-type lectin BPL	P0DL30	CTL	<i>Bothrops pirajai</i>	16,6	4,9	-	2382	NNCPGDWLPM NGLCYKIFNE LKAWEDAEMF CRKYKPGCHL ASIIHYGESL EIAEYISDYH KGQAEVWIGL WDKKKDFSWE WDRSCTDYL SWDKNQPDHY ENKEFCVELV SLTGYRLWED QVCESKNAFL CQCKF
F e M	C-type lectin galatrox (Fragments)	P0DM53	CTL	<i>Bothrops atrox</i>	9,5	5,3	-	14956 F 15008 M	NNCPQDWLPM NGLCYKIFDE LKAWKDAEMF CRKYKPGCHL ASIIYGESL EWAEGHSEVW LGLWDKKKDF SWEWTD
F	Disintegrin batroxostatin	P18618	PII-SVMP	<i>Bothrops atrox</i>	8,4	5,3	-	10282	EAGEECDCA PENPCCDAAT CKLRPGAQCA EGLCCDQCRF KGAGKICRRA RGDNPDDRCT QGSADCPNR FY
F e M	Basic phospholipase A2 myotoxin III	P20474	PLA ₂	<i>Bothrops asper</i>	16,6	8,7	12,7 F 17,6 M	8039 F 1756 M	MRTLWIMAVL LVGVEGSLIE FAKMILEETK RLPFPYYTTY GCYCGWGGQG QPKDATDRCC FVHDCCYKGL SNCKPKTDYR SYRSKSGVII CGEGTPCEKQ ICECDKAAAV CFRENLRKY KRYMAYPDL CKKPAEKC
F e M	Metalloproteinase-jararhagin (Fragment)	P30431	PIII-SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	66,2	5,2	80,92 F 90,26 M	6852 F 5383 M	ATRPKGAVQP KYEDAMQYEF KVNGEPVVLH LEKNKGLFSK DYSEIHYSPD GREITTYPPV EDHCYHGR IENDADSTASI SACNGLKGYF KLQRETYFIE PLKLPDSEAH AVFKYENVEK EDEAPKMGV TQNWKSYEPI KKASQLAFTA EQQRYPYKY IEFFVVVDQG TVTKNNGDL KIKARMYELA NIVNEIFRYL YMHVALVGL IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL TRKKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPKRSVGIVQ DYSPLNLVA VIMAHMGHN LGIHHDGTSC SCGDYPCIMG PTISNEPSKF FSNCSYIQCW DFIMHNPEC IINEPLGTDI ISPPVCGNEL LEVGEECDG TPENCQNECC DAATCKLKSG SQCGHGDCE QCKFSKSGTE CRASMSECDP AEHCTGQSSE CPADVFKNG QPCLDNYGYC YNGNCPIMYH QCYALFGADV YEAEDSCFKD NQKGNYYGYC RKENGKKIPC APEDVKCGRL YCKDNSPGQN NPCKMFYSND DEHKGMLVLP TKCADGKVC NGHCVDVATA Y
F	Disintegrin cotiarin	P31988	PII-SVMP	<i>Bothrops cotiara</i>	8,4	5,8	-	10282	EAGEECDCA PENPCCDAAT CKLRPGAQCA EGLCCDQCRF KGAGKICRRA RGDNPDDRCT QGSADCPNR FH

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F e M	Metalloproteinase/disintegrin (Fragment)	P31989	PII-SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	18,6	5,6	4,93 F 3,75 M	8419 F 495 M	ERDLLVAVTM DHELGHNLGI RHDGSCSCG GYSCVMSPVI SHDISKYFSD CSYICQWDFI MKENPQCILN KHLRTDTVST PVSGNELLEA GEECDGTPG NPCCDAATCK LRPGAQCAEG LCCDQCRFKG AGKICRRARG DNPDDRCTGQ SADCPRNRFH A
F	Acidic phospholipase A2	P81243	PLA ₂	<i>Bothrops jararaca</i>	15,1	4,6	-	2629	DLWQFGQMMN DVMREYVVFN YLYYGCCYCGW GGIGKPRDAT DRCCFVHDCC YGKVTGCNPK TDSYTYTYSE ENGDVVCGGD DLCKKQICEC DRVAATCFRD NKDTYDTKYW LYGAKNCQEE SEPC
F e M	Thrombin-like enzyme bothrombin	P81661	SP	<i>Bothrops jararaca</i>	26,3	6,6	7,2 F	2550 F 404 M	VIGGDECDIN EHPFLAFMY SPQYFCGRTL INQEWVLTAA HCDKTYMRIY LGIHTRSVAN DDEVIRYPKE KFICPNKKKN VITDKDIMLI RLNRPVKNST HIAPISLPSN PPSVGSVCRI MGWGAITTSE DTYPDVPHCA NINLFNNTVC REAYNGLPAK TLCAGVLQGG IDTCGGDSGG PLICNGQFQG ILSWGSDPCA EPRKPAFYTK VFDYLPWIQS IAGNKTATC PP
F	Metalloproteinase BaP1	P83512	PI-SVMP	<i>Bothrops asper</i>	46,5	5,6	3,23 F	519	MIEVLLVTIC LAVFPYQGSS IILESGNVND YEVVYPRKVT ELPKGAQVQK YEDAMQYEFK VNGEPVVLHL EKNKGLFSED YSETHYSPDG RKIITYPSFE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHFQ LQGETYLIEP LKLSDEAHA VYKYENVEKE DEAPKMGVT ETNWESYEPI KKASQSNLTP EQQRFSPIY ELAVVADHGI FTKYNSNLNT IRTRVHEMLN TVNGFYRSVD VHAPLANLEV WSKQDLIKVQ KDSSKTLKSF GEWRERDLLP RISHDHAQLL TAVVFDGNTI GRAYTGGMCD PRHSGGVVRD HSKNNLWVAV TMAHELGHNL GIHHDGSCS CGAKSCIMAS VLSKVLSEYF SDCSQNQYET YLTNHNPPQCI LNKPLLTVSG NELLEAGE
F e M	C-type lectin BJcuL	P83519	CTL	<i>Bothrops jararacussu</i>	19,3	6,1	0,9306 F 1,42 M	16352 F 1493 M	MGRFLFVASS ACWFVFLSLS GAKGNNCPQD WLPMNGLCYK IFNELKAWKD AEMFCRKYKP GCHLASIHLY GESPEIAEYI SDYHKGQSEV WIGLCDKKKD FSWEWTDRCSC TDYLSWDKNQ PDHYQNKEFC VELVSNTGYR LWNDQVCESK NAFLCQCKF
M	Metalloproteinase basparin-A (Fragments)	P84035	PIII-SVMP	<i>Bothrops asper</i>	7	5,8	-	2716	SHDNAQLLTA IKAYIATMCD PKMAVIMAHE IGHGGYYGYC RKIPCAPEDV KDDDIGMVLP GTK
F e M	Metalloproteinase leucurolysin-A	P84907	PI-SVMP	<i>Bothrops leucurus</i>	23,4	6,9	1,65 F 0,84 M	2402 F 2041 M	QQFSPRYIEL VVVADHGMFK KYNSNLNTIR KVVHEMLNTV NGFFRSMNV D ASLVNLEVWS KKDLIKVEKD SSKTLTSFGE WRERDLLPRI SHDHAQLLTV IFLDEETIGI AYTAGMCDLS QSVAVVMDHS KKNLRVAVTM AHELGHNLGM RHDGNQCHCN APSCIMADTL SKGLSFEFSD CSQNGYQTYL TKHNPQCILN KP
F e M	Metalloproteinase BmooMPalpha-I	P85314	PI-SVMP	<i>Bothrops moojeni</i>	23,6	6,3	1,4 F 0,78 M	1701 F 451 M	EQQKFSPIRYI ELVVVADHGM FKKYNSNLNT IRKWVHEMVN SMNGFYRSVD VTASLANLEV WSKKDLINVQ KDSRETLKSF GEWRERDLLP RISHDNAQLL TAIVFDGHTI GRAYTGGMCD PRHSGGVVMD HSPKNLQVAV TMAHELGHNL GMHHDGNQCH CDAASCIMAD SLSVVLSEYF SDCSQNQYQT YLTKNHPQCI LNEPL
F e M	Metalloproteinase atroxlysin-1	P85420	PI-SVMP	<i>Bothrops atrox</i>	23,3	5,9	18,55 F 19,4 M	15028 F 1492 M	TPEQQRYVDL FIVVDHGMFM KYNGNSDKIR RRIHQMVNIM KEAYSTMYID ILLTGVEIWS NKDLINVQPA APQTLDSFGE WRKTDLLNRK SHDNAQLLTS TDFNGPTIGL AYVGSMDPK RSTGVIQDHS EQDLMVAITM AHELGHNLGI SHDTGSCSCG GYSCIMSPVL SHEPSKYFSD CSYICQWDFI MKENPQCILN KR

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F	Metalloproteinase leucurolysin-B (Fragment)	P86092	PIII-SVMP	<i>Bothrops leucurus</i>	38,1	5,4	-	135	DTVLLNRISH DNAQLLAIVF NENVIGKAYT GGMCDPRYSV GVVMDHSPIN RLVADTMAHE MGHNLGIHHD TGSCSCGGHS CIMS RVISHQ PLQYFSNCSY IEYWDFITKL NPQCILNEPL RTDIVSPPVC GNELLEMGE CDGSPRNCR DLCCDAATCK LHSWVECESG ECCDQCRFIK AGNVCRPPRK ECDVAEACTG QSAQCPTDDF KRNGQPCLNN YAYCYQGNCIP IMYHQCIALF GSDATMAQDS CFQVNKKGNE YFYCRLengi NIPCAQEDVK CGRLFCHNMK YEQDCNYS DR GMVDNGTKCA EGKVCNSNRQ AYQR
F e M	Acidic phospholipase A2	P86389	PLA ₂	<i>Bothrops asper</i>	14,9	5,1	0,8139	2286 F 316 M	NLWQFGQMMS DVMRKNVVFY YLSYGCYCGW GGIGQPKDAT DRCCFVHDCC YGKVTGCDPK MDIYTYTSK ENGDVVC GGD DPCKKQICEC DRVAAICFRD NKDTYDSKYW FYGAKNCQED SEPC
F	Acidic phospholipase A2	P86907	PLA ₂	<i>Bothrops ammodytoides</i>	14,7	6,1	0,28	2722	HLMQFETLIK KIAGRSGVWF YGFYGCYCGS GGRGKPKDAT DRCCFVHDCC YGKVTGCDPK MDFYTYSEEN GVVVC GGD DP CKKQICECDR VAATCFRDNK TYDNNKYWFY PAKNCQEESE PC
F e M	C-type lectin BpLec	P86970	CTL	<i>Bothrops pauloensis</i>	16,8	5,2	9,093 F 5,323 M	19215 F 146 M	NNCPQDWLPM NGLCYKIFDE LKAWKDAEMF CRKYKPGCHL ASIHLYGESP EIAEYISDYH KGQSEVWIGL WDEKKDFSWE WTD RSCTDYL SWDKNQPDHY KNKEFCVELV SYTG YRLWND QVCESKNAFL CQCKF
F e M	Metalloproteinase barnettlysin-1	P86976	PI-SVMP	<i>Bothrops barnetti</i>	21,3	6,7	0,06 F 0,08 M	7267 F 4449 M	TPEQQR YVEL FIVVDHGMFM K----- --IHQMVNIM KEAYRYLYID ILLTGVEIWS NKDLINVQPA APQTLDSFGE WR-----K SHDNAQLLTS TDFDGP TIGL AYVGS MC DPK RSTAVIQDHS EIDLLVAVTM DHELGHNLGI RHDTGSCSCG GYPCVMSPVI SHDISKYFSD CSYIQCWDFI MKENPQCILN KR
F e M	Metalloproteinase/disintegrin	Q072L5	PII-SVMP	<i>Bothrops asper</i>	54,8	5,2	3,08 F 0,19 M	7722 F 576 M	MIEVLLVTIC LAVSPYQGSS ILES GNVD YEVVYPRKVT ELPKGAVQPK YEDAMQYEFK VNGEPVVLHL EKNKGLFSED YSETHYSPDG RKIITYPSFE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHF K IQGETYLIEP LKLS DSEAHA VYKYENVEKE DEAPKMGV T ETNWESYEPI KKASQSNLTP EQQRFSPRYI ELAVVADHGI FTKYNSNLNT IRTRVHEMLN TVNGFYRSVN VTASLASLEV WSKKDLIKVE KDSSKTLTSF GEWRERDLLP RISHDHAQLL TTIVFDNYVI GITEFGKMCD PKLSVG VVRD HSEINLQVAV AMAHELGHNL GMYHDGNQCH CDAASCIMAD TLREVLSEYF SDCSQNQYET YLTKHNPQCI LNEPLLIVSG NELLEAGEEC DCDAPENPCC DAATCKLRPG AQCAEGLCCD QCRFKGAGKI CRRARGDNPD DRCTGQSADC PRNRFHA
F e M	Thrombin-like enzyme asperase	Q072L6	SP	<i>Bothrops asper</i>	28,7	5,3	0,49 F 2,31 M	289 F 492 M	MVLIRVLANL LILQLSY AQK SSELVIGGDE CNINEHRS LV VLFNSSGFLC AGTLVQDEWV LTAANCDSKN FQMQLGVHSK KVLNEDEQTR DPKEEASLCP NRKKDDEV DK DIMLIKLSR VSNSEIAPL SLPSSPPSVG SVC RIMGWGT ISPTKETYPD VPHCANINIL DHAVCRAAYP WQPVSS TTL C AGILQGGKDT CWGDSGGPLI CNGEFQGIVS WGAHPCGQPH NPGVYTKVSD YTEWIKSIIA GNTAAACPP
F	Metalloproteinase-bothrojarin-2 (Fragment)	Q0NZX9	PIII-SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	25,9	5,4	0,31	156	RQNRHEASCR IVSPVCGNE LLEKGEECD C GSPRNCRDPC CDAATCKLHS WVECESGECC DQCRFIKAGN VCRPQRSECD IAESCTGQSA QCPTDDFHKN GQPCLSNYGY CYNGNCPIMH HQCYALFGSG AIVAQDGC FK FNDRGDKFFY CRKENVIITP CAQEDVKCGR LFCHTKKSEC DFDYSEDPDY GMVDHGT KCA DGKVCNSNRQ CVDVTTAY

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F e M	Metalloproteinase-BjussuMP-1 (Fragment)	Q1PHZ4	PIII-SVMP	<i>Bothrops jararacussu</i>	63,9	5,6	42,87 F 23,33 M	6809 F 8606 M	EFKVNGEPPV LHLEKNKGLF SEDYSETHYS PDGRQITTY PVEDHCYYHG RIENDADSTA SISACNGLKG HFKLQGETYL IEPLKLSDE AHAVYKYENV EKEDEAPKMC GVTETNWEYE EPIKKASKLV VTAEQQKFPY RYVEIVVVVD RRMVTKYNGD LKKIRKWVYE LVNIVNNIYR SLNVHVALVG LEIWSKGDKI TVQPDSDYTL NSFGEWRERD LLPRKKHDNA QLLTAVVFDG PTIGRAYIAG MCDPRHSVG VMDHSKENLQ VAVTMAHEL G HNLGMEHDEN QCHCDAPSCV MASVLSVVL S YEFSDCSQNG YQTYLTKNHP QCILNEPLLT VSGNELLEAG EECDCGAPEN PCCDAATCKL RPGAQCAEGL CCDQCRFKGA GKICRRARGD NPDDRCTGQS ADCPRNRFRH NGQPCLYNHG YCYNGKCPIM FYQCYFLFGS NATVAEDDCF NNNKKGDKYF YCRKENEKYI PCAQEDVKCG RLFCDNKKYP CHYNYSEDLD FGMVDHGT KC ADGKVC SNRQ CVDVNEAYKS TTVFSLI
F	Acidic phospholipase A2 BE-I	Q2HZ28	PLA ₂	<i>Bothrops erythromelas</i>	16,2	4,7	-	1471	MRTLWIMAVL LVGVEGSLVQ FETLIMKIAG RSGVWYYGSY GCYCGSGGQG RPQDASDRCC FVHDCCYGV TDCDPKADVY TYSEENGVVV CGGDDPCKKQ ICECDRVAAT CFRDNKDTYD NKYWFFPAKN CQESEPC
F	Snaclec bothrojaracin subunit alpha	Q56EB1	CTL	<i>Bothrops jararaca</i>	18	5,9	-	305	MGRFLFVSFG LLVVFLSLSG TAADCPDWS SHEGHCKYKF QQKMNWADAE RFCSEQAKGG HLVSFQSDGE TDFVNLVTE KIQSTDLYAW IGLRVQNKQ QCSSKWS DGS SVSYENNVGR TVKKCFALEK EQEFFWINI YCGQQNPFVC KSPPP
F e M	Snake venom serine protease HS114	Q5W959	SP	<i>Bothrops jararaca</i>	28,5	5,3	14,8 F 12,82 M	2864 F 110 M	MVLVRVAVNL LILQLSYAQK VSELVVGDE CNINEHRS LV AIFNSTGFFC SGILLNQEWV LTASHCDSTN FQMKIGVH SK KTLNQDEQTR NPKEKIFCPN KKNDDALDKD LMLVRLDSPV SDSEHIAPLS LPSSPPSVGS VCRIMGWGSI TPIQKTNP DV PHCANINLLD DAVCRAAYPE LPAEYRTLCA GVPEGGIDTC NGDSGGPLIC NGQFQGIVFY GAHPCGQAPK PGLYTKVIDY NTWIESVIAG NTAATCPP
F e M	Metalloproteinase/disintegrin	Q5XUW8	PII-SVMP	<i>Bothrops insularis</i>	54,6	5,5	3,58 F 1,54 M	1030 F 1555 M	MIQVLLVTIC LAAFPYQGSS ILES GNVD YEVVYARKVT ELPKGAVQQK YEDAMQYEFK VNGEPVVLHL EKNKGLFSED YSETHYSPDG RQIITYPPFE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHFK LQGETYLIEP LKLPDSEAHA VYKYENVEKE DEAPKMGVT ETNWESYEPI EKASQSNLTP EQQKFSPRYI ELAVVADHGM FTKYNSNLNT IRTRVHEMVN TLNGFFRSVN VDASLANLEV WSKKDLIKE KDSSKLTSTF GEWRERDLLP RISHDHAQLL TTIVFDQQT I GLAYTAGMCD PRQSVAVVMD HSKKNLRVAV TMAHELGHNL GMDHDDTCTC GAKSCIMAST ISKGLSFEFS KCSQNGYQTY LTDHNPQCIL NKPLTTVSGN ELLEAGEECD CGAPENPCCD AATCKLRPRA QCAEGLCCDQ CRFKGAGKIC RRARGDNPDD RCTGQSADCP RNRFHA
F e M	Snake venom serine protease BthaTL	Q6IWF1	SP	<i>Bothrops alternatus</i>	26,3	8	0,86 F 4,44 M	1226 F 5306 M	VIGGDEC DIN EHRFLAFLYP GRFFCSGT LI NQEWVLTVAH CDTISMRIYL GLHTRSV PND DEEIRYPM EK FKCPNRKRSY IKDKDIMLIR LNRPNVNDSPH IAPLSLPSNP PSVGSVCHVM GWGTTSPSKA TYPDVPHCAN INLVNDTMCH GAYNGLP VTS RKFCAGVLQG GIDTCVGD SG GPLICNGQFQ GIVSWGKVC ARLPRPALYT KVFEYLPWIQ SIIAGNTTAT CPL

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F e M	C-type lectin BiL	Q6QX33	CTL	<i>Bothrops insularis</i>	19,1	5,6	-	15907 F 747 M	MGRFIFVSFG LLVFLSLSG AKGNNPCQDW LPMNGLCYKI FDELKAWKDA EMFCRKYPKG CHLASFHLYG ESPEIAEYIS DYHKGQSEVW IGLWDKKKDF SWEWTDRSCT DYLSWDKNQP DHYQNKFCV ELVSDTGYRL WNDQVCESKN AFLCQCKF
F e M	L-amino-acid oxidase (Fragment)	Q6TGQ8	LAAO	<i>Bothrops moojeni</i>	54,9	6	44,58 F 55,46 M	40244 F 1266 M	RKAPCCADDR NPLEECFRET DYEEFLEIAK NGLSTTSNPK RVVIVGAGMS GLSAAYVLAN AGHQVTVLEA SERAGGRVKT YRNEKEGWYA NLGPMRLPEK HRIVREYIRK FDLQLNEFSQ ENENAWYFIK NIRKRVGEVN KDPGVLEYPV KPSEVGKSAG QLYEESLQKA VEELRRTNCS YMLNKYDTYS TKEYLLKEGN LSPGAVDMIG DLLNEDSGYY VSFIESLKHD DIFAYEKRFD EIVGGMDKLP TSMYQAIQEK VHLNARVIKI QQDVKEVTVT YQTSEKETLS VTADYVIVCT TSRAARRIKF EPPLPPKKAH ALRSVHYRSR TKIFLTCTKQ FWEDDGIHGG KSTTDLPSPF IYYPNHNFPN GVGVIAYGI GDDANYFQAL DFEDCGDIVI NDLSLIHQPL KEEIQAICRP SMIQRWSLDK YAMGGITFTT PYQFQHFSEA LTAPVDRIYF AGEYTAQAHG WIDSTIKW
F e M	L-amino-acid oxidase (Fragment)	Q6TGQ9	LAAO	<i>Bothrops jararacussu</i>	56,6	5,8	3,84F 23,55 M	31470 F 279 M	MNVFFMFSKP GKLADDRNPL EECFRET DYE EFLEIAKNGL STTSNPKRVV IVGAGMSGLS AAYVLNAGH QVTVLEASER AGGQVKTYRN EKEGWYANLG PMRLPEKHRI VREYIRKFG LQLNEFSQENE NAWYFIKNIR KRVGEVNKDP GVLDPVKPS EVGKSAGQLY EESLQKAVEE LRRTNCSYML NKYDTYSTKE YLLKEGNLSP GAVDMIGDLL NEDSGYYVSF IESLKHDDIF AYEKRFDEIV GGMDKLPTSM YQAIQEKVHL NARVIKIQD VKEVTVTYQT SEKETLSVTA DYVIVCTTSR AARRIKFEPP LPPKKAHALR SVHYRSGTKI FLTCTKKFWE DDGIHGGKST TDLPSRFIYY PNHNFPNGVG VIIAYGIGDD ANYFEALDFE DCGDIVINDL SLIHQLPKEE IQAICRPSMI QRWSLDKYAM GGITFTPYQ FQHFSEALTA PVDRIYFAGE YTAQAHGWIA STIKSGPEGL DVNRASE
F e M	BOTJR BOJUMET III (Fragment)	Q7T1T3	PLA ₂	<i>Bothrops jararacussu</i>	28	5,5	0,0333	7200 F 486 M	SCSSMNVHAS LAILEVWSKK DLIKVEKDSR ETLKSGEWR ERDLLPRISH DHAQLLTIV FDNYVIGITK FGKMCDPKLS VGVVRDHSEI NLQVAVAMAH ELGHNLGMHH DGNQCHCDA SCIMADTLSE VLSYEFSDCS QNQYETYLTK HNPQCILNEP LLIIVSGNELL EVGEECDCA PENPCCDAAT CKLRPGAQCA EGLCCDQCRF KGAGKICRRA RGDNPDDRCT GQSADCPNR FHA
F e M	Metalloproteinase BjussuMP-2 (Fragment)	Q7T1T4	PI-SVMP	<i>Bothrops jararacussu</i>	42,5	5,3	4,15 M	483 F 778 M	TELPKGAQP KYEDAMQYEF KGNGEPPVLH LEKNKGLFSE DYSETHYSPD GRQIITYPPF EDHCYYHGR ENDADSTASI SACNGLKGHF KLQGETYLIE PLKLSDEAH AVYKYENVEK EDEAPKMGV TETNWESEYEP IKKASPSNLT PEQQKFSPRY IEVAVVADHR MFKKYNSNLN TIRKWVHEMV NSMNGVYRSM DVHLSLANLE VWSKDLINV QKDSRETLKS FGEWRERDLL PRISHDNAQL LTAVVFDQQT IGRAYIAGMC DPRHSVGVVM DSKENLQVA VTMAHELGHN LGMEHDENQC HCDAPSCVMA SVLSVVLSYE FSDCSQNQYQ TYLTKHNPQC ILNEPLLTVS GNELLEAGE
F e M	Serine protease homolog	Q7T229	SP	<i>Bothrops jararacussu</i>	29,4	8,8	3,45 F 5,23 M	2388 F 900 M	MVLIRVLANL LILQLSYAK ASELIIGGDE CNINEHRFLV ALYTSRSTRF HCSGTLINE WVLTAANCDR KNIRIKLGMH SKNVTNEDEQ TRVPKEKFFC LSSKTYTKWD KDIMLIRLKR PVNDSPHIAP ISLPSSPPSV GSVCRIMGWG TISPTKVSYP DVPHCANINL LDYEVCAAH GGLPATSRRL CAGILEGGKD SCQDSSGGPL ICNGQFQIL SWGVHPCGQR LKPGVYTKVS DYTEWIRSII AGNTDVTCP

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F	Disintegrin DisBa-01	Q801Z4	PII-SVMP	<i>Bothrops alternatus</i>	8,9	4,5	-	5755	GNELLEAGEE CDCGTPGNPC CDAATCKLRP GAQCAEGLCC DQCRFMKEGT VCRIARGDDM DDYCNGISAG CPRNPFHA
F e M	Acidic phospholipase A2 BthA-1	Q8AXY1	PLA ₂	<i>Bothrops jararacussu</i>	16,3	5,3	0,14465	2279 F 16960 M	MRTLWIMAVL LVGVEGSLWQ FGKMINYVMG ESGVLQYLSY GCYCGLGGQG QPTDATDRCC FVHDCCYGKV TGCDPKIDSY TYSKKNQDVV CGGDDPCKKQ ICECDRVATT CFRDNKDTYD IKYWFYGAKN CQEKSEPC
F	Snake venom serine protease BITS01A	Q8QG86	SP	<i>Bothrops insularis</i>	29,04	8,8	-	821	MVLIRVIANL LILQVSYAQK SSELVVGDE CDINEHPFLA FLYSHGYFCG LTLINEQEWVL TAAHCDRRFM RIYLGHIHARS VANDDEVIRY PKEKFICPNK NMSDEKDKDI MLIRLNRPVK NSTHIAPISL PSNPPSVGSV CRVMGWGSIT IPNDTYPDVP HCANINLVND TVCRGAYKRF PAKSRTLCAQ VLQGGKDTCV GDSSGPLICN GTFQGIVSWG GKVCARPRKP ALYTKVFDYL PWIQSHIAGN KTATCPP
F	Acidic phospholipase A2 BITP01A	Q8QG87	PLA ₂	<i>Bothrops insularis</i>	16,6	5,1	-	1853	MRTLWIMAVL LVGVEGNLWQ FGKMMNYVMG QSVVYKYFFY GCYCGWGGIG QPRDATDRCC FVHDCCYGKV TGCDPKTDSY TYSKENGDVV CGGDDPCKKQ ICECDRVAAT CFRDNKDTYD MKYWLYGAKN CQESEPC
F e M	Metalloproteinase-BITM06A	Q8QG88	PIII-SVMP	<i>Bothrops insularis</i>	70,5	5,2	-	5514 F 17941 M	MIQVLLVTIC LAAFPYQGSS ILESQNVND YEVVYPRKVT ALPKGAVQPK YEDAMQYEFK VNGEPVVLHL EKNKGLFSKD YSETHSPDG REITYPAVE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHFQ LQRETYFIEP LKLSNSEAHA VFKEYENVEKE DEAPKMCQVT QNWKSYPEIK KASQLVVTAE QQKYNPFYRV ELFIVVDQEM VTKNNGDLK IKARMYELAN IVNEILRYLY MHAALVGLEI WSNQDKITVK PDVDYTLNSF AEWRKTDLLT RKKHDNAQLL TAIDFNGPTI GYAYIGSMCH PKRVAIVED YSPINLVAV IMAHEMGNHL GIHHDTFCS CGDYPCIMGP TISNEPSKFF SNCSYIQCDW FIMKENPQCI LNEPLGTDIV SPPVCGNELL EVGEECDCTG PENCQNECCD AATCKLKSGS QCGHGDCEQ CKFSKSGTEC RASMSECDPA EHCTGQSSEC PADVFHKNQ PCLDNYGYCY NGNCPIMYHQ CYALFGADVY EAEDSCFKDN QKGNYYGYCR KENGKKIPCA PEDVKCGRLY CKDNSPGQNN PCKMFYSNDD EHKGMVLPQT KCADGKVCSN GHCVDVATAY
F e M	Metalloproteinase BITM02A	Q8QG89	PI-SVMP	<i>Bothrops insularis</i>	46,7	5,2	-	3567 F 6170 M	MIEVLLVTIC LAAFPYQGSS ILESQNVND YEVVYPRKVT ALPKGAVQPK YEDAMQYELK VNGEPVVLHL EKNKGLFSKD YSETHSPDG REITYPPVE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHFQ LQGETYLIEP LKLSNSEAHA VFKEYENVEKE DEAPKMCQVT QNWKSYPEIK KASQSNLTPE HQRYELFIV VDHGMFMKYN GNSDKIRRI HQMVNIMKEA YRYLYIDIAL TGVEIWSNKD MINVQPAAPQ TLDSFGWRK TDLLNRKSHD NAQLLTNTDF DGPTIGLAYV GTMCDPKLST GVIQDHSPIN LLVAVTMAHE LGHNLGISHD TDSCSCGGYS CIMAPEISHE PSKYFSDCSY IQCWDIFIMKE NPQCILNKRL RTDVTSTPVS GNELLEAGE

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
F e M	Metalloproteinase-berythracivase	Q8UVG0	PIII-SVMP	<i>Bothrops erythromelas</i>	70,8	5,5	15,49 F 2,58 M	665 F 185M	MIQVLLVIIC LEAFPYQGSS IILESGNVND YEVVYPRKVT ALSKGAVHPK YEDAMQYEFK VNGEPVVLHL EKNKGLFSED YSEIHYSPDG REITTYPLVE DHCYYHGRIQ NDADSSASIS ACNGLKGHFQ LQGEMYLIEP FKLPDSEAHA VFKYENVEKE DEAPKMGVT ETNWESDEPI KKASLLNLTP EQQAYLDAKK YVEFVVLDH GMYKKYKDDL DKKRRIYEI VNTMNEMFIP LNICVALTGL EIWSKGDKIN VTSESWFTLI LFTNWRGADL LKRKSHDNAQ LLTNTDFDGS TIGRAHIGSM CHPYLSVGII QDYSVNNLLV ASTMAHEMGM NLGMHHDNDT CTCGAPSCVM AAAISKDPSK LFSNCSQEYQ RYLIKNRPQ CLLNKPLRTD IISPPVCGNE LLEVGEEDCG GTPENCRDPC CNATTCKLTP GSQCVEGLCC DQCRFRKTGT ECRAAKHDCD LPESCTGQSA DCPMDDFQRN GHPCQNNNGY CYNGKCPTME NQCIDLVGPK ATVAEDSCFK DNQKGNIDYGY CRKENGKKIP CEPQDVKCGR LYCNDNSPVG NNPCKIYFP RNEDRGMVLP GTKCADGKVC SNRHCVDAT AY
M	Venom nerve growth factor	Q90W38	NGF	<i>Bothrops jararacussu</i>	27,6	8,6	0,71	2796	MSMLCYTLII TLLIGIWAAP KSEDNVPLGS PATSDLSVTS CTKTHEALKT SRNTDQHYPK PKKEEDQEFQ SAANIIVDPK LFQKRRFQSP RVLFSTQPPP LSRDEQSVDD ANSLNRNIRA KREDHPVHNR GEYSVCDNV VVWANKTTAT DIRGNVVTVM VDVNINNNVY KQYFFETKCR NPNPVPTGCR GIDARHWNSY CTTTNTFVKA LTMENQASW RFIRIDTACV CVISRKNENF G
F e M	Zinc metalloproteinase/disintegrin	Q98SP2	PII-SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	54,8	5,5	7,32 F 8,22 M	8031 F 2254 M	MIEVLLVTIC LAAPFYQGSS IILESGNVND YEVVYPRKVT ALPKGAVQPK YEDAMQYELK VNGEPVVLHL EKNKGLFSKD YSETHYSPDG RKITTNPVVE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHFQ LQGETYLIIEP LKLSDEAHA VFKFENVEKE DEAPKMGVT QNWESYEPIK KASQSNLTPE HQRYIELFLV VDHGMFMKYN GNSDKIRRRR HQMVNIMKEA YRYLYIDIAL TGVEIWSNKD MINVQPAAPQ TLDSFGWRK TDLNLRKSHD NAQLLTSTDF KDQTIGLAYW GSMCDPKRST AVIEDHSETD LLVAVTMAHE LGHNLGIRHD TGSCSCGGYS CIMAPVISHD IAKYFSDCSY IQCWFIMKD NPQCILNKQL RTDVTSTPVS GKNFGAGEEC DCGTPGNPCC DAVTCKLRPG AQCAEGLCCD QCRFMKEGTV CRRARGDDMD DYCNGISAGC PRNPFHA
F e M	Metalloproteinase-HF3	Q98UF9	PIII-SVMP	<i>Bothrops jararaca</i>	69,9	5,2	1,72 F 3,24 M	534 F 2041 M	MIQVLLVTIC LAAPFYQGSS IILESGNVND YEVVYARKVT ALPKGAVQPK YEDTMQYELK VNGEPVVLHL EKNKQLFSKD YSETHYSPDG REITTYPPVE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHFQ LQGETYFIEP LKLPNSEAHA VFKYENVEKE DEVPKMGVT QTNWESDEPI KKASQLVTA EQQRYNHYKY IELVILADYR MVTKNNGDLG KIRTKIYEIV NILNEIFRYL YIRIALVGIE IWSNADLSNV TLSADDTLAS FGTWRGTLL KKRKSHDNAQL LTAFDFGQT IGIANIASMC NQNKSVGVVM DYSPINLVVA VIMAHMGMHN LGINHDTGSC SCGGYSCIMA PEISDQPSKL FSNCSKQAYQ RYINYYKQC ILNEPLRTDI VSPVCGNEL LEMGEEDCG SPRNCRDPCC DAATCKLHSW VECESGECCD QCRFKGAGTE CRAARSECDI AESCTGQSD CPTDDFKRNG QPCLHNYGYC YNGNCPIMYH QCYALFGSNA TVAEDGCFEF NENGDKYFYC RKQSGVNIPC AQEDVKCGRL FCHTKKHPCD YKYESDPDYG MVDNGTKCAD GKVCNSNGHCV DVATAY
F e M	Metalloproteinase neuwiedase (Fragment)	Q9I9R4	PI-SVMP	<i>Bothrops pauloensis</i>	22,8	7,8	2,66 F 0,73 M	721 F 7187 M	QQRFFPQRYI ELVIVADRRM YTKYNSDSNK IRTRVHELNV TVNGFFRSMN VDASLANLEV WSKKDLIKE KDSSKTLTSF GEWRERDLLR RKSHDNAQLL TAIDFNGNTI GRAYLGSMCN PKRSVGIVQD HSPINLLVGV TMAHELGHNL

Grupo	Descrição da Proteína	Protein Entry	Família	Espécie	Massa (kDa)	pI	ng na coluna	Score	Peptídeos
									GMEHDGKDCL CGASLCIMSP GLTDGPSYEF SDCSKDYYQT FLTNNHPQ
F e M	C-type lectin BjL	Q9PRY7	CTL	<i>Bothrops jararaca</i>	16,7	5,2	-	15884 F 599 M	NNCPQDWLPM NGLCYKIFDE LKAWKDAEMF CRKYKPGCHL ASFHLYGESP EIAEYISDYH KGQAEVWIGL WDKKKDFSWE WTDRSCTDYL TWDKNQPDHY EGKEFCVELV SLTGYRLWND QVCESKNAFL CQCKF
F e M	Snaclec GPIB-binding protein subunit beta	Q9PSM5	CTL	<i>Bothrops jararaca</i>	14,7	4,7	4,64 F 5,68 M	2151 F 7920 M	DCPSDWSPYG GHCKYKFKQR MNWADAENLC AQQRKESHLV SFHSSEEVDF LVLLTFPILG PDLYWTGLSN IWNGCSFEWS DGTKVNYNAW ASESECVASK TTDNQWWSFP CTRLQYFVCE FQA
F e M	Snaclec GPIB-binding protein subunit alpha	Q9PSM6	CTL	<i>Bothrops jararaca</i>	17,1	7,7	0,89 F 1,12M	573 F 6204 M	DTPFECPSDW STHRQYCYKF FQKESWDDR SEYDAERFCS EQAKGGHLVS IESDEEADFV AQLVAPNIGK SKYYVWIGLR IENKKQQCSS KWSDYSSVS ENLVRGNVKK CFALEKKQGF RKWVNIDCVE GNPVCKFIR PR
F	Snake venom serine protease BPA	Q9PTU8	SP	<i>Bothrops jararaca</i>	28,7	6,7	0,28	1010	MVLIRVIANL LILQLSNAQK SSELVIGGDE CNITEHRFLV EIFNSSGLFC GGTLIDQEWV LSAAHCDMRN MRIYLGVHNE GVQHADQQR FAREKFFCLS SRNYTKWDKD IMLIRLNRPV NNSEHIAPLS LPSNPPSVGS VCRIMGWGTI TSPNATFPDV PHCANINLFN YTVCRGAHAG LPATSRTLCA GVLQGGIDTC GGDSGGPLIC NGTFQGIVSW GGHPCAQPG PALYTKVFDY LPWIQSIAGO NTTATCPP
F e M	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	Q9YIB5	GPC	<i>Bothrops jararaca</i>	42,5	8,7	0,97 F 3,88 M	164 F 225 M	MARERRDSKA ATFFCLAWAL CLALPGYPQH VSGREDRADW TQEKYSHRPT ILNATCILQV TSQTNVSRMW QNDLHPILIE RYPGSPGSA VRQHIKHLRQ GLQAGWLVEE DTFQSHTPYG YRTFSNIIST LNPLAKRHLV IACHYDSKYF PPQLDGKV FV GATDSAVPCA MMLELARS LD RPLSFLKQSS LPPKADLSLK LIFFDGEEAF VRWSPSDSLY GSRSLAQKMA STPHPPGARN TYQIRGIDLF VLLDLIGARN PVFPVYFLNT ARWFGRLAI ERNLNDLGLL NNYSSERQYF RSNLRRHPVE DDHIPFLRRG VPILHLIPSP FPRVWHTMED NEENLDKPTI DNLSKILQVF VLEYLNLG
F e M	BOTPC L-amino acid oxidase (Fragment)	X2L4E2	LAAO	<i>Bothrops pictus</i>	56,8	5,8	32,72 F 40,2 M	2809 F 1493 M	SLLFLAAVGS CADDRNPLEE CFRETDYEEF LEIAKNGLST TSNPKRVVIV GAGMSGLSAA YVLNAGHQV TVLEASERAG GRVKTYRNEK EGWYANLGP RLPEKHRIVR EYIKKFDLRL NEFSQENENA WYFLQNIKKR VREVNKDPGV LEYPVKPSEV GKSAGQLYEE SLRKAVEELR RTNCSYMLNK YDTYSTKEYL LKEGNLSPGA VDMIGDLLNE DSGYYVSFIE SLKHDDIFAY EKRFDIVGG MDKLPTSMYQ AIQEKVHLNA RVIEIQQDVK EVTVTYQTSQ KETLSVTADY VIVCTTSRAA RRITFEPLP PKKAHALLSV HYRSGTKIFL TCTKKFWEDD GIHGGKSTTD LPSRFIYYPN HNFNPGVGV IAYGIGDDAN YFQALDFEDC GDIVINDLSL IHQLPKEEIQ AICRPSMIQR WSLDNYAMGG ITTFPTYHFQ HFSEALTAPV DRIYFAGEYT AQAHGWIDST IKSGLRAATD VNRASENK

*Dados registrados a partir dos resultados obtidos por espectrometria nanoESI-qTOF.