

**DANIELA MIKI HATAKEYAMA**

**Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno de serpentes  
jovens e adultas da espécie *Bothrops moojeni***

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

São Paulo

2018

**DANIELA MIKI HATAKEYAMA**

**Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno de serpentes  
jovens e adultas da espécie *Bothrops moojeni***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Anita Mítico Tanaka Azevedo

Versão original.

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Hatakeyama, Daniela Miki

Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno de serpentes jovens e adultas da espécie *Bothrops moojeni* / Daniela Miki Hatakeyama; orientadora Anita Mitico Tanaka Azevedo. -- São Paulo, 2018.

86 p.

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

1. Biotecnologia. 2. Bioquímica. 3. Proteômica. 4. *Bothrops moojeni*. 5. Ontogenia. I. Tanaka Azevedo, Anita Mitico, orientador. II. Título.

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

Candidato(a): Daniela Miki Hatakeyama

Titulo da Dissertação: Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno de serpentes jovens e adultas da espécie *Bothrops moojeni*.

Orientador: Anita Mitico Tanaka Azevedo

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

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

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno de serpentes jovens e adultas da espécie *Bothrops moojenii*", protocolada sob o CEUA nº 9238080117, sob a responsabilidade de **Anita Mítico Tanaka Azevedo e equipe; Daniela Miki Hatakeyama** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 19/04/2017.

We certify that the proposal "Study of biological and biochemical characterization of young and adult *Bothrops moojenisnake* venoms.", utilizing 20 Reptiles (males and females), 105 Heterogenics mice (105 males), protocol number CEUA 9238080117, under the responsibility of **Anita Mítico Tanaka Azevedo and team; Daniela Miki Hatakeyama** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 04/19/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

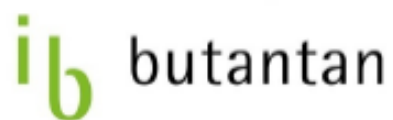
Vigência da Proposta: de **05/2017** a **12/2018** Área: **Herpetologia**

Origem:	Animais provenientes de outros estudos			
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	Idade: 0 a 10 anos N: 20
Linhagem:	<i>Bothrops moojeni</i>			Peso: 50 a 1500 g
Origem:	Biotério Central			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	Idade: 2 a 4 semanas N: 105
Linhagem:	Swiss			Peso: 18 a 23 g

Resumo: O estudo dos venenos de serpentes é uma importante área da pesquisa biomédica em virtude de suas ações neurotóxicas, hemorrágicas e em lesões tissulares. Em relação ao veneno botrópico, são descritas três atividades fisiopatológicas: proteolítica ou inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica. Popularmente conhecidas como [cobras], as serpentes pertencem à Ordem Squamata, Subordem Ophidia, Superfamília Colubroidea. Esta divide-se em três grandes famílias representantes no Brasil: Colubridae, Elapidae e Viperidae, das quais apenas as duas últimas são capazes de produzir toxinas em glândulas especializadas e possuem estruturas especializadas para inculá-las, sendo, portanto, consideradas peçonhentas. Serpentes jovens e adultas apresentam diferentes tamanhos, comportamentos, morfologias e características fisiológicas. Estas diferenças podem resultar em uma mudança na dieta destes animais relacionada às variações na composição do veneno. A serpente *Bothrops moojeni* (B. moojeni) habita o Cerrado brasileiro, compreendendo as regiões Central e Sudeste, além de países vizinhos, como Argentina, Bolívia e Paraguai. Sua dieta é bastante diversificada, desde vertebrados ectodérmicos (anuros e pequenos répteis) a aves e mamíferos. Filhotes se alimentam, predominantemente, de anuros, enquanto os adultos predam preferencialmente mamíferos. A preferência alimentar dos filhotes está relacionada à época em que nascem, quando ocorre uma explosão populacional de anfíbios, o que, possivelmente, resultou no desenvolvimento de um mecanismo de atração de presas ectodérmicas semelhante ao da B. jararaca. A ontogenia de serpentes já é, há muito, conhecida, porém as diferenças entre as atividades bioquímicas e biológicas de espécimes adultos e jovens de algumas espécies, como a B. moojeni, por exemplo, não foram completamente elucidadas. Posto isto, o presente estudo tem como objetivo investigar a ontogenia na composição e atividades biológicas e bioquímicas do veneno de serpentes B. moojeni.

Local do experimento: biotério do laboratório de herpetologia

São Paulo, 08 de agosto de 2018



butantan

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

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

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

A minha mãe Claudia e minha avó Junko.  
Por serem meu porto seguro sempre. São  
vocês que me inspiram a ir cada vez mais  
longe. Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

À minha família e meus amigos por sempre estarem ao meu lado, independente dos momentos. Minha família que eu amo e jamais escolheria outra. E meus amigos que escolhi sem querer, mas que são os melhores que eu poderia pedir. Obrigada por todos os momentos tristes e felizes, pelos choros e risadas, pelos conselhos que recebi e dei e por todo o amor compartilhado.

À minha mãe e minha avó por serem pessoas maravilhosas, presentes todos os dias da minha vida desde sempre. Mamãe, cumprir o papel de mãe e pai não é tarefa fácil, mas você sempre fez o melhor e além. Tentarei, para sempre, retribuir tudo o que você fez por mim. Baachan, tenho plena consciência que não sou a melhor neta do mundo por inúmeros motivos, mas sei que, do nosso jeito, sempre desejamos o melhor uma à outra. Obrigada por sempre estarem ao meu lado e me puxar de volta ou daquele empurrão quando eu precisava, por todo o amor e companheirismo.

À Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo por ter acreditado em mim quando aceitou me orientar durante a iniciação científica e por me receber de braços abertos quando voltei ao laboratório para fazer o mestrado. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos e por todos os bons momentos que passamos durante este tempo. Eu os levarei no coração para sempre.

Aos meus colegas do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Caroline Serino Silva, Lídia Jorge Tasima, Eduardo Oliveira Venâncio de Lima, Lara de Souza Abreu, Nathália da Costa Galízio, Weslei da Silva Aguiar, Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues, Victor Koiti Kavazoi e Karen de Moraes Zani. Também à Marina Tojal Gardon Gagliardo, que já não está mais no laboratório, mas foi uma passagem memorável para todos que te conheceram, então também te guardarei sempre no coração. Gostaria de agradecer especialmente à Caroline Serino, quem eu conheci na faculdade e que foi fundamental para que eu desse os primeiros passos nessa jornada que se passou, mas obrigada principalmente por todas as risadas, confissões (que foram muitas!), por me ver chorando por nada e continuar ao meu lado mesmo com as minhas crises. À Lídia, quem eu conheci ainda fora do laboratório e mesmo antes de trabalharmos juntas já nos dávamos bem (obrigada, jogos!). Obrigada por ouvir as minhas reclamações, sempre rir comigo das mais diversas coisas, inclusive das brincadeiras que fazemos com o Eduardo, a quem eu também tenho que agradecer por todas as risadas e conversas que trocamos; um dia talvez você me conte como me aguenta. À Lara, que também está presente todos os dias no computador ao lado, pelas risadas, pelas canções e, de verdade, não me importei de te ajudar sempre que precisou. À Caroline Fabri, pela companhia nas aulas, pelas caronas, pelas risadas e conversas e por entender as maravilhas e os problemas do nosso signo. Ao Victor, que está sempre lá para conversar, rir, ter visões durante o almoço e disputar comigo quem dorme mais facilmente. E à Karen, por ser sempre tão presente tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Amo todos vocês!



Aos meus amigos de toda a vida, os mais presentes e os não tão presentes por motivos de trabalho ou simplesmente por morar longe. Obrigada, Gustavo, Hiago, Giovane, Marcelo e Ana Gabriela. Em especial ao Gustavo por ser quem é, pelo companheirismo que temos mesmo não sendo tão presente fisicamente, por como nossa amizade evoluiu desde que nos conhecemos, há mais de 10 anos, e também por ser quem me apresentou o Hiago, outra figura ímpar na minha vida, com quem compartilhei momentos especiais mesmo com seu gênio difícil de lidar e com um ego tão inflado quanto o maior balão que já voou no céu. São as amizades que ganhei fora do meio acadêmico e são duas das que mais considero. Aos dois, agradeço do fundo de coração todo o carinho. Amo vocês!

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

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

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Resumo

O estudo dos venenos de serpentes é uma importante área da pesquisa biomédica em virtude de suas ações neurotóxicas, hemorrágicas e proteolíticas. O gênero *Bothrops* é considerado um dos mais importantes no Brasil pela alta incidência de acidentes ofídicos. São descritas três atividades fisiopatológicas do veneno botrópico: proteolítica, coagulante e hemorrágica. O veneno de serpentes está sujeito às variações intraespecíficas, que, por sua vez, sofrem influência de distribuição geográfica, sexo, idade (ontogenia), cativeiro, etc. Existem descrições sobre a ontogenia de alguns venenos de serpentes, porém, estudos comparativos referentes às atividades bioquímicas e biológicas de espécimes adultos e jovens de algumas espécies, como a *B. moojeni*, não foram completamente elucidados. Com isso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar e comparar, bioquímica e biologicamente, a influência da ontogenia e do sexo no veneno da serpente *B. moojeni*. Comparando esses parâmetros, os venenos apresentaram diferenças bastante evidentes quanto à composição, e, principalmente, quanto às atividades proteolítica e coagulante. Os venenos de serpentes mais jovens são mais coagulantes, enquanto os de adultos são mais proteolíticos; já em relação ao sexo, os venenos de fêmeas se mostraram mais proteolíticos do que os de machos, que, em contrapartida, são mais coagulantes. Apesar deste contraste, a letalidade dos venenos de neonatos e de adultos não apresentou diferença estatística, mas o veneno de adultos apresentou-se mais rápido ao sucumbir os animais. Além disso, o imunorreconhecimento pelo soro antibotrópico foi bastante similar entre os venenos analisados. Estes resultados sugerem que, apesar das variações observadas, a letalidade não se altera, talvez devido ao sinergismo das proteínas, e o bom imunorreconhecimento pode indicar uma boa resposta do soro antibotrópico no tratamento dos acidentes ofídicos causados pela *B. moojeni*.

**Palavras-chave:** *Bothrops moojeni*, veneno, ontogenia, diferenciação sexual, atividade bioquímica, atividade biológica.

## Abstract

The study of snake venoms is an important area of biomedical research for its neurotoxic, hemorrhagic and proteolytic effects. *Bothrops* is one of the most important genus in Brazil due to the high incidence of snake bites. Three physiopathological activities are described for the bothropic venom: proteolytic, procoagulant and hemorrhagic. Snake venom is susceptible to intraspecific variations that are related to geographic distribution, sex, age (ontogeny), captivity, etc. Although described for many species, studies regarding comparison of the biochemical and biological features between adult and juvenile snake venoms are not completely elucidated for some species, like *B. moojeni*. Thereby, the present study aimed to characterize and compare, biochemically and biologically, the influence of ontogeny and sex on the snake venom of *B. moojeni*. Analyzing these parameters, some differences were quite marking in the venom composition and, especially, concerning proteolytic and procoagulant activities. The venom of younger snakes are showed higher coagulant activity, while adults were more proteolytic; in relation to sex, female venoms were more proteolytic than male, which were more coagulant instead. Despite these differences, the lethality did not show statistical difference, although adult venom killed the animals faster than neonate venom. Besides, immunorecognition of the venom by antiothropic serum was very similar among the venoms. These results suggest that lethality of the venom does not vary according to age, so it might be related to the synergism of the proteins in it, and the immunorecognition can indicate a possible good response to the treatment with antiothropic serum of snake bites caused by *B. moojeni*.

**Keywords:** *Bothrops moojeni*, snake venom, ontogeny, sexual variability, biochemical activity, biological activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Dosagem de proteínas utilizando o método de Bradford dos *pools* de venenos das serpentes *B. moojeni*. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo. \_\_\_\_\_ 32

**Figura 3.** SDS-PAGE 15% dos *pools* de venenos de *B. moojeni* machos e fêmeas, em condições reduzidas por  $\beta$ -mercaptoetanol. \_\_\_\_\_ 33

**Figura 4.** Perfil cromatográfico do *pools* de venenos de *B. moojeni* machos (azul) e fêmeas (rosa). Um miligrama de veneno foi aplicado em uma coluna de fase reversa C-18  $25 \times 0,4$  mm (Teknokroma Europa 300), equilibrada previamente com a ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 5% (solução A), utilizando-se cromatógrafo AKTA Purifier UPC10 (GE Healthcare). A eluição foi realizada em gradiente de uma solução de ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 95% (solução B). DIS: desintegrinas; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; SVSP: serino proteases; SVMP P-I: metaloproteases tipo P-I; CTL: lectina tipo C; LAAO: L-amino ácido oxidase; SVMP P-III: metaloprotease tipo P-III. (\*) Pico que pode estar relacionado à atividade colagenolítica (4.5.2.). \_\_\_\_\_ 35

**Figura 5.** Abundância relativa das famílias de proteínas encontradas nos venenos de serpentes *B. moojeni* machos e fêmeas de idades diferentes por meio de espectrometria de massas. CRISP: proteína secretada rica em cisteína; CTL: lectina tipo C; DIS: desintegrina; GPC: peptídeo glutamil ciclotransferase; KT: inibidor de serino proteases do tipo Kunitz; LAAO: L-amino ácido oxidase; NT: 5'-nucleotidase; PDE: fosfodiesterase; SVMP: metaloprotease; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; SVSP: serino protease; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; VNGF: fator de crescimento neural. 37

**Figura 6.** Comparação da abundância relativa das famílias de proteínas encontradas nos venenos de serpentes *B. moojeni* de diferentes idades de cada sexo por meio de espectrometria de massas. CRISP: proteína secretada rica em cisteína; CTL: lectina tipo C; DIS: desintegrina; GPC: peptídeo glutamil ciclotransferase; KT: inibidor de serino proteases do tipo Kunitz; LAAO: L-amino ácido oxidase; NT: 5'-nucleotidase; PDE: fosfodiesterase; SVMP: metaloprotease; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; SVSP: serino protease; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; VNGF: fator de crescimento neural. 38

**Figura 7.** Zimografia em SDS-PAGE 12% dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas, contendo gelatina (A) ou caseína (B) como substrato. \_\_\_\_ 42

**Figura 8.** Atividade colagenolítica sobre o substrato azocoll dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo. \_\_\_\_\_ 43

**Figura 9.** Atividade caseinolítica dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo. \_\_\_\_\_ 44

**Figura 10.** Atividade fosfolipásica dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo. \_\_\_\_\_ 44

**Figura 11.** Atividade de LAAO dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo. \_\_\_\_ 45

**Figura 12.** Dose mínima coagulante dos venenos de *B. moojeni* BmN e Bm>4. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. \_\_\_\_\_ 46

**Figura 13.** Dose letal 50% dos venenos de *B. moojeni* BmN e Bm>4. \_\_\_\_\_ 46

**Figura 14.** Tempo de morte após a injeção com o veneno de *B. moojeni* BmN e Bm>4 nos camundongos. \_\_\_\_\_ 47

**Figura 15.** *Western blotting* dos venenos de *B. moojeni* em diferentes idades, machos e fêmeas. \_\_\_\_\_ 47

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Quantidade de indivíduos que tiveram o veneno extraído para a composição dos pools de acordo com a idade e o sexo, bem como o tamanho médio, em centímetros, das serpentes e o desvio padrão (DP) e a procedência das serpentes. \_\_\_\_\_ 25

**Tabela 2.** Lista das proteínas exclusivas e suas funções separadas por idade e sexo. As proteínas marcadas em azul são exclusivas de machos e as proteínas marcadas em rosa são exclusivas de fêmeas. \_\_\_\_\_ 39

**Tabela 3.** Titulação de anticorpos do soro antitoxinogênico por imunorreconhecimento dos venenos de *B. moojeni* em diferentes idades, machos e fêmeas. \_\_\_\_\_ 48

**Tabela 4.** Resumo dos resultados obtidos pelos ensaios realizados descritos ao longo deste trabalho. \_\_\_\_\_ 49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

*B. asper* – *Bothrops asper*

*B. atrox* – *Bothrops atrox*

*B. insularis* – *Bothrops insularis*

*B. jararaca* – *Bothrops jararaca*

*B. jararacussu* – *Bothrops jaracussu*

*B. moojeni* – *Bothrops moojeni*

*B. neuwiedi* – *Bothrops neuwiedi*

*B. pauloensis* – *Bothrops pauloensis*

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

CEUAIB – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan

CRISP – *Cystein-rich secretory protein* (Proteína secretora rica em cisteína)

CTL – *C-type lectin* (Lectina tipo C)

DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DIS – *Disintegrin* (Desintegrinas)

DL<sub>50</sub> – Dose letal 50%

DMC – Dose Mínima Coagulante

DTT – Ditioneitol

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

GFP-b – Glufibrinopeptídeo b

GPC – Peptídeo-glutamil-ciclo-transferase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

HIV – *Human immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

IAA – Iodoacetamida

kDa – kilodalton

KT – *Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor* (Inibidor de serino protease do tipo Kunitz)

LAAO – L-Amino Ácido Oxidase

MG – Minas Gerais

MT – Mato Grosso

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de sódio

NaN<sub>3</sub> – Azida de sódio

NOBA – 4-nitro-3-octanoloxy ácido benzóico

NT – 5'-nucleotidase

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – Ortofenilenodiamina

PBS – *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

PDE – fosfodiesterase

PLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub>

PVDF – Fluoreto de polivinilideno



RP-HPLC – *Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance – Fase Reversa)

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SP – São Paulo

SVMP – Metaloprotease

SVSP – Serino protease

TCA – Ácido tricloroacético

TO – Tocantins

VEGF – Fator de crescimento endotelial

VNGF – Fator de crescimento neural

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. VENENOS.....	25
3.2. CAMUNDONGOS.....	25
3.3. CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DOS VENENOS.....	25
3.3.1. <i>Dosagem de proteínas</i> .....	26
3.3.2. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i> .....	26
3.3.3. <i>Cromatografia Líquida de Alta Performance – Fase Reversa (RP-HPLC)</i> .....	26
3.3.4. <i>Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF)</i> .....	26
a. Digestão em solução das amostras.....	26
b. Análises das amostras digeridas por espectrometria de massas – “Data Independent Acquisition” .....	27
c. Identificação de proteínas por busca em banco de dados .....	27
3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E BIOLÓGICAS DOS VENENOS ...	28
3.4.1. <i>Atividade proteolítica</i> .....	28
a. Atividade caseinolítica .....	28
b. Atividade colagenolítica.....	28
c. Zimografia.....	28
3.4.2. <i>Atividade fosfolipásica</i> .....	29
3.4.3. <i>Atividade de L-amino ácido oxidase (LAAO)</i> .....	29
3.4.4. <i>Dose mínima coagulante (DMC)</i> .....	29
3.4.5. <i>Dose letal 50% – DL<sub>50</sub></i> .....	30
3.5. ANÁLISE DO IMUNORRECONHECIMENTO DO VENENO PELO SORO ANTIBOTRÓPICO.....	30
3.5.1. <i>Western blotting</i> .....	30
3.5.2. <i>ELISA</i> .....	30
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
4.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	32
4.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) .....	32
4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE – FASE REVERSA (RP-HPLC) .	33
4.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (NANOESI-QTOF) .....	36
4.5. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA .....	41

4.5.1.	<i>Zimografia</i> .....	41
4.5.2.	<i>Atividade colagenolítica utilizando substrato azocoll</i> .....	42
4.5.3.	<i>Atividade caseinolítica utilizando caseína dimetilada</i> .....	43
4.6.	ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA.....	44
4.7.	ATIVIDADE DE L-AMINO ÁCIDO OXIDASE .....	44
4.8.	DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC) .....	45
4.9.	DOSE LETAL 50% (DL <sub>50</sub> ).....	46
4.10.	<i>WESTERN BLOTTING</i> .....	47
4.11.	ELISA.....	48
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>66</b>

## 1. Introdução

O envenenamento por serpentes faz parte da lista de doenças tropicais negligenciadas, retirado em 2013 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e reestabelecido em 2017 (BAGCCHI, 2015; CHIPPAUX, 2017). Em 2017, estima-se que, no Brasil, houve 28.601 casos de acidentes ofídicos (dados revisados em 24 de junho de 2018), porém não há informações no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) sobre a quantidade de casos por gênero de serpente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Por outro lado, os últimos dados do DATASUS informam que, em 2016, houve 21.655 acidentes ofídicos causados por serpentes peçonhentas, dos quais 18.707 (86,4%) foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* (BRASIL, s.d.). Por ser uma das famílias que compreende serpentes peçonhentas, ou seja, capazes de inocular veneno por meio de presas, a família Viperidae desperta grande interesse médico (FRANCO, 2009; SOUSA *et al.*, 2013).

As peçonhas de serpentes são, possivelmente, os mais complexos de todos os venenos conhecidos. As toxinas que as compõem são, também, importantes para a digestão dos alimentos, uma vez que estes são ingeridos inteiros (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; MACKESSY; TU, 1993; MEBS, 2001). As principais funções dessas toxinas são imobilizar, paralisar e matar a presa, para que a mesma possa ser ingerida de maneira segura (RICHARDS; BARLOW; WÜSTER, 2012), sendo assim, uma importante inovação na evolução dos ofídios: a transição da forma de captura da presa pela ação mecânica da constrição, para a captura da presa com o auxílio da ação química do veneno (ALAPE-GIRÓN *et al.*, 2008).

O estudo dos venenos de serpentes constitui uma área da pesquisa biomédica importante, principalmente em virtude de suas ações neurotóxicas, hemorrágicas e em lesões tissulares (MACKESSY; TU, 1993; MEBS, 1990; RAMIREZ; FLETCHER-JUNIOR; POSSANI, 1990).

São descritas três atividades fisiopatológicas do veneno botrópico: proteolítica, coagulante e hemorrágica (ROSENFELD, 1971). Essas atividades são extremamente complexas e podem ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente e uma única toxina pode apresentar diversas atividades (FRANÇA; MALAQUE, 2003).

Cerca de 90% do peso seco dos venenos é constituído por proteínas, porém, apesar de apresentarem mais de 250 proteínas distintas (NICOLAU *et al.*, 2017), essas pertencem apenas a algumas famílias proteicas, incluindo enzimas (serino proteases, metaloproteases, L-

aminoácido oxidases e fosfolipases A<sub>2</sub>) e proteínas sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, proteínas secretadas ricas em cisteína, fatores de crescimento neural e endotelial vascular, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz) (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; FRY, 2005; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; MARKLAND, 1998; SERRANO *et al.*, 2005). Esses venenos são misturas complexas com atividades biológicas diversas, que constituem uma excelente fonte de biomoléculas para o desenvolvimento de novas drogas (SUNTRAVAT; NUCHPRAYOON; PÉREZ, 2010).

As serino proteases contêm um resíduo de serina no sítio ativo, que é estabilizado pela presença de histidina e de ácido aspártico (SERRANO; MAROUN, 2005). Embora homogêneas em suas características estruturais, as serino proteases de peçonhas podem apresentar uma grande diversidade de perfis farmacológicos, atuando em diversos componentes da cascata da coagulação sanguínea e nos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina (SERRANO; MAROUN, 2005; VILCA-QUISPE *et al.*, 2010).

As metaloproteases são enzimas que dependem de íons metálicos para serem ativadas. Metaloproteases de venenos de serpentes são associadas à hemorragia, à mionecrose, aos danos ao tecido epitelial e às reações que se manifestam na forma de inflamação ou edema (GOMES *et al.*, 2011; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Estas enzimas são divididas em três classes: P-I, P-II e P-III. A classe P-I é caracterizada por conter apenas um domínio de metaloprotease e, em geral, têm baixa massa molecular (20-30 kDa); a classe P-II inclui um domínio de desintegrina, que pode se desligar do complexo, gerando desintegrinas que inibem a agregação plaquetária, e sua massa molecular pode variar de 30-60 kDa; as metaloproteases P-III têm alta massa molecular (60-100 kDa), são as mais hemorrágicas desta família de proteínas e contêm, além dos domínios de metaloprotease e de desintegrina, domínios ricos em cisteína. A classe P-III subdivide-se em P-IIIa, a metaloprotease P-III em sua forma monomérica sem ter sofrido modificações pós-traducionais, P-IIIb, formada após o processo de proteólise entre os domínios de desintegrina e de cisteína, P-IIIc, esta enzima em sua forma dimérica, e P-IIId, contendo um domínio extra de lectina tipo C (FOX; SERRANO, 2005, 2008; KANG *et al.*, 2011; KINI, 2006; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

As fosfolipases constituem uma superfamília de enzimas que atuam sobre as membranas celulares, clivando fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios, assim desconstruindo a parede celular (WITTCOFF, 1951). Dentre os diferentes tipos de fosfolipases, as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s), envolvidas no metabolismo dos fosfolipídios, catalisam especificamente a hidrólise de fosfolipídios na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos em uma reação dependente de cálcio, o que resulta em

inflamação tecidual na região afetada pela picada (DENNIS *et al.*, 1991; SANTOS-FILHO, 2009). As PLA<sub>2</sub>s de viperídeos podem ser classificadas como tipo II, que se divide em dois subgrupos: cataliticamente ativas, que apresentam ácido aspártico (D49) e intensa atividade por conter o ácido aspártico no sítio de ligação do cálcio, e cataliticamente pouco ativas ou inativas, que apresentam lisina (K49), serina (S49), asparagina (N49) ou arginina (R49) e, consequentemente, pouca ou nenhuma atividade por não conter o ácido aspártico no sítio de ligação, o que faz com que o cálcio não se ligue à enzima (ARAUJO; WHITE; OWNBY, 1996; GHAZARYAN *et al.*, 2015).

As L-amino ácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas de grande interesse médico por suas atividades bactericidas, antifúngicas, antiparasitárias, anti-HIV e citotóxicas, derivadas da indução à apoptose ou necrose causada pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e por sua interação com as plaqueta humanas, induzindo ou inibindo a agregação plaquetária (CARONE *et al.*, 2017; LI; YU; LIAN, 1994; LU *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2003). Estas enzimas foram isoladas de diversos organismos além de venenos de serpentes, como bactérias, fungos e plantas, têm massa molecular que varia entre 50-70 kDa em sua forma monomérica e entre 120-150 kDa em sua estrutura nativa (DU; CLEMETSON, 2002; KANG *et al.*, 2011), e são responsáveis pela coloração amarelada do veneno de serpentes por conta do domínio de FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina) (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; PESSATTI *et al.*, 1995).

Além destas proteínas majoritárias, os venenos de serpentes são constituídos de outras famílias minoritárias. As lectinas tipo C (CTLs) são proteínas não enzimáticas que interagem intimamente com plaquetas e fatores de coagulação sanguínea, podendo inibir ou induzir a coagulação (LU *et al.*, 2005; OGAWA *et al.*, 2005). As proteínas secretadas ricas em cistatina (CRISPs) já foram encontradas em diversos organismos, porém as encontradas no veneno de serpentes são responsáveis pelo bloqueio de canais iônicos e inibição da contração do músculo liso (YAMAZAKI e MORITA, 2004). Nos venenos de serpentes foram encontrados dois tipos de fatores de crescimento: neural, encontrado também em mamíferos, responsável pelo crescimento e manutenção de células nervosas e foram demonstradas proliferação de inflamações neurais em músculos de pintinhos e inibição de metaloproteases (HOGUE-ANGELETTI e BRADSHAW, 1979; WIJEYEWICKREMA *et al.*, 2010); e endotelial vascular, responsável pela proliferação de células endoteliais, atividades hipotensivas e indução de permeabilidade vascular, importantes para a penetração das toxinas pela barreira hematoencefálica (YAMAZAKI e MORITA, 2006).

Os venenos de serpentes apresentam heterogeneidade considerável, inclusive entre indivíduos de uma mesma espécie, de acordo com a sazonalidade, idade e sexo (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; FURTADO; COLLETO; SILVA, 1991; LÓPEZ-LOZANO *et al.*, 2002; MENEZES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2017). Desta forma, o controle de qualidade desses venenos tem sido objeto de intensa investigação há muito tempo, vista a sua utilização na produção de anticorpos para tratamento no caso de envenenamento.

As serpentes da espécie *B. moojeni* habitam áreas úmidas e quentes, são comumente encontradas em florestas de galeria, matas que formam corredores (galerias) ao longo de um curso d'água, possuem hábitos noturnos e são mais ativas entre outubro e abril (ANDRADE; ABE; SANTOS, 1996; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). São animais generalistas quanto à alimentação, com dieta variando desde vertebrados ectotérmicos (anuros e pequenos répteis) a aves e mamíferos (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002).

O veneno desta espécie é composto por enzimas proteolíticas associadas às atividades biológicas específicas, tais como hemorrágica, coagulante e anticoagulante. Estas enzimas degradam diversos substratos naturais, como caseína, hemoglobina, colágeno, elastina, fibrinogênio, insulina e glucagon, o que pode causar coagulação sanguínea, hemorragia, fibrinogólise e necrose (RAW *et al.*, 1991).

A variabilidade intraespecífica é um importante fator a ser considerado ao se tratar de análises acerca do veneno de serpentes pelo histórico de variações reportadas em diversas espécies (JIMÉNEZ-PORRAS, 1964; MEBS e KORNALIK; 1984; REID e THEAKSTON, 1978) e que continuam sendo estudadas até a atualidade (GIRÓN *et al.*, 2018; PLA *et al.*, 2017; REEKS *et al.*, 2016). Estes estudos contribuem para um melhor entendimento do mecanismo de funcionamento dos venenos ofídicos e suas características clínicas em caso de envenenamento, além de servirem como base para o aprimoramento de soros antiofídicos.

Serpentes jovens e adultas apresentam diferentes tamanhos, comportamentos, morfologias e características fisiológicas. Estas diferenças podem estar relacionadas com a dieta destes animais (MUSHINSKY, 1987). A preferência alimentar dos filhotes está relacionada à época em que nascem, quando ocorre uma explosão populacional de anfíbios, o que, possivelmente, resultou no desenvolvimento de um mecanismo de atração de presas ectotérmicas (ANDRADE; ABE; SANTOS, 1996; ANTUNES *et al.*, 2010). Filhotes de algumas espécies serpentes, especialmente da subfamília Crotalinae, possuem a cauda em uma tonalidade diferente do restante do corpo, denominada de engodo caudal, que utilizam para atrair as presas para dentro do alcance do bote (HEATWOLE e DAVISON, 1976).

O veneno de indivíduos jovens de *B. jararaca* e *B. alternatus* tem maior toxicidade em anfíbios, enquanto o dos adultos é mais tóxico para mamíferos (ANDRADE; ABE, 1999). Em espécies de outras famílias como *Crotalus durissus*, indivíduos recém-nascidos e jovens apresentam maior toxicidade do que adultos, e o veneno de recém-nascidos da espécie *Lachesis muta* apresenta pouca toxicidade para mamíferos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1990; GUTIÉRREZ *et al.*, 1991; LOMONTE *et al.*, 1983). O veneno dos filhotes de outras espécies do gênero *Bothrops*, como *B. jararaca*, *B. insularis*, *B. atrox* e *B. asper*, apresentam maior atividade coagulante em relação ao dos indivíduos adultos, enquanto estes últimos apresentam maior atividade proteolítica (ANDRADE; ABE, 1999; GUÉRCIO *et al.*, 2006; SALDARRIAGA *et al.*, 2003; ZELANIS *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por Kouyoumdjian e Polizelli (1989) mostrou diferenças clínicas entre pacientes picados por serpentes *B. moojeni* jovens e adultas, no qual foi descrita uma maior ação local e proteolítica nos acidentes ocasionados por espécimes adultos. Estes autores inferiram que essa ação pode ser decorrente da maior quantidade de veneno inoculado.

Sabendo que existem diferenças acerca da composição e das ações, as variações intraespecíficas tornou-se um foco importante de estudo e, no caso da *B. moojeni*, é importante saber a capacidade do soro de reconhecer as proteínas dos venenos desta espécie em diferentes fases da vida, já que é uma das espécies cujo veneno faz parte da mistura de venenos utilizada para a produção do soro antiofídico no Instituto Butantan, composto por anticorpos produzidos em cavalos a partir desses venenos de serpentes adultas das espécies *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. pauloensis* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e complexo *B. neuwiedi* (12,5%) (CARDOSO; YAMAGUCHI; MOURA-DA-SILVA, 2003). Assim, analisar a ontogenia do veneno das serpentes constitui um assunto de considerável interesse, tanto do ponto de vista clínico quanto do biológico, auxiliando na elucidação da composição e das atividades do veneno da *B. moojeni*, bem como dos mecanismos envolvidos na captura das presas ao longo do desenvolvimento destes animais.



## **2. Objetivos**

### **1.1. Objetivo geral**

O presente estudo tem como objetivo caracterizar e comparar a composição bioquímica e as atividades biológicas do veneno de serpentes da espécie *B. moojeni*, em relação à ontogenia e ao sexo.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Caracterizar a composição proteica dos venenos por meio de dosagem proteica dos venenos, eletroforese em gel de acrilamida, cromatografia líquida de alta performance, análise por espectrometria de massas;
- Determinar as atividades enzimáticas dos venenos, tais como proteolítica, fosfolipásica e de L-amino ácido oxidase;
- Analisar o reconhecimento do veneno por anticorpos por meio de ELISA e *western blotting*;
- Comparar a atividade coagulante e a letalidade dos venenos.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Venenos

Os venenos das serpentes *B. moojeni* foram obtidos por meio da extração manual, conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, e foram centrifugados a 2.500 g por 15 minutos para a retirada de resíduos (células epiteliais e sangue), liofilizados e armazenados a -20 °C, até o momento da análise. Todos os experimentos foram realizados utilizando *pools* de veneno de serpentes de diversas idades, machos e fêmeas, demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1.** Quantidade de indivíduos que tiveram o veneno extraído para a composição dos *pools* de acordo com a idade e o sexo, bem como o tamanho médio, em centímetros, das serpentes e o desvio padrão (DP) e a procedência das serpentes.b

Grupo	Idade	Machos (cm ± DP)	Fêmeas (cm ± DP)	Procedência
BmN	Neonato (24 dias)	18 (33,8 ± 2,3)	16 (32,7 ± 1,7)	Araraquara – SP
Bm<1	Menor que 1 ano (5 meses)	14 (41,0 ± 4,2)	19 (41,1 ± 2,6)	Patos de Minas – MG Brotas – SP
Bm1	1 ano	4 (55,6 ± 3,5)	6 (55,3 ± 1,8)	Chapada dos Guimarães – MT Gaúcha do Norte – MT
Bm2	2 anos	8 (75,9 ± 4,3)	8 (75,8 ± 8,9)	Gaúcha do Norte – MT Palmas – TO
Bm3	3 anos	1 (93,0 ± 0,0)	5 (115,7 ± 13,7)	Chapada dos Guimarães – MT
Bm>4	Maior que 4 anos	5 (113,2 ± 5,0)	5 (127,4 ± 8,5)	Araraquara – SP Chapada dos Guimarães – MT Gaúcha do Norte – MT Palmas – TO

#### 3.2. Camundongos

Para os testes *in vivo*, foram utilizados camundongos *Swiss*, machos, pesando entre 18 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (CEUA N° 9238080117).

#### 3.3. Caracterização Proteica dos Venenos

### 3.3.1. Dosagem de proteínas

O conteúdo proteico dos venenos foi medido utilizando o ensaio colorimétrico de Bradford (1976). Um miligrama de veneno liofilizado foi ressuspensionado em 1 mL de solução salina 0,85%. Em uma placa de microtitulação, 10 µL de amostra foram incubados com 200 µL do reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad), à temperatura ambiente, por 10 minutos, seguindo as indicações do fabricante. A leitura foi realizada a  $A_{595}$  nm em leitor de placas SpectraMax i3 (Molecular Devices). A determinação da concentração de proteínas foi calculada por meio de uma curva padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (BSA – Sigma) como padrão.

### 3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas presentes nos venenos foram separadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, segundo Laemmli (1970). Por canaleta, foram aplicados 20 µg de proteína. Após a corrida, as proteínas foram fixadas em uma solução de 10% etanol e 7% ácido acético por uma hora e, então, os géis foram corados utilizando Coomassie G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

### 3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Performance – Fase Reversa (RP-HPLC)

Para todas as amostras utilizadas neste experimento, 500 µg de veneno liofilizado foram ressuspensionados em 200 µL de uma solução de ácido trifluoroacético 0,1% (solução A) e centrifugado a  $13.000 \times g$  por 15 minutos. A cromatografia foi realizada segundo método descrito por Gay *et al* (2015). O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de fase reversa C-18 25 x 0,4 mm (Teknokroma Europa 300), equilibrada previamente com a solução A, utilizando-se cromatógrafo ÄKTA Purifier UPC10 (GE Healthcare). As amostras foram eluídas em um fluxo de 1 mL/min por meio de gradientes de solução de ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 95% (solução B): 5% por 5 minutos, 5-25% por 10 minutos, 25-45% por 60 minutos, 45-70% por 10 minutos, 70-100% por 10 minutos, e 100% por 10 minutos. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda  $A_{215}$  nm.

### 3.3.4. Espectrometria de massas (nanoESI–qTOF)

#### *a. Digestão em solução das amostras*

Um mg de veneno liofilizado foi ressuspensionado em 1 mL de solução salina 0,85%. Cem microlitros foram incubados com DTT 5 mM em solução de bicarbonato de amônio 50

mM por 25 minutos a 56 °C. As amostras foram incubadas com IAA 14 mM em solução de bicarbonato de amônio 50 mM à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. As amostras foram novamente incubadas com DTT 5 mM à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi adicionado CaCl<sub>2</sub> 1 mM e tripsina 20 ng/μL (1:100) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram incubadas por 16 horas a 37 °C; em seguida, foi adicionado ácido fórmico 0,4%, e as amostras foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes resultantes foram secados em um sistema de concentração a vácuo (miVac–Gene Vac, Ipswich Suffolk) e armazenados a -20 °C até o momento da análise.

*b. Análises das amostras digeridas por espectrometria de massas – “Data Independent Acquisition”*

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no equipamento Synapt G2 HDMS (Waters) acoplado a um sistema de cromatografia nanoAcquity UPLC (Waters). Os peptídeos foram submetidos às análises de LC-MS/MS pela metodologia *DIA*, com injeção de 5 μL de cada amostra no sistema, em triplicata técnica.

Inicialmente, as amostras foram carregadas em uma coluna C<sub>18</sub> nano Acquity Trap Symmetryde 180 μm × 20 mm (Waters) em 0,1% (v/v) de ácido fórmico, sob fluxo de 8 μL/min durante 5 minutos. A eluição dos peptídeos foi feita em uma coluna analítica capilar C<sub>18</sub> nanoAcquity BEH 75 μm × 150 mm, 1,7 μm (Waters) por meio de fase móvel binária composta por água (Fase A) e acetonitrila (Fase B), ambas com 0,1% de ácido fórmico, partindo de um gradiente de 7-35 % de Fase B durante 90 minutos, em fluxo de 0,275 μL/min. Os dados foram adquiridos em modo HDMS<sup>E</sup> pela alternância dos modos de baixa (4 eV) e alta energia, utilizando uma rampa de colisão que varia entre 19 e 60 eV, a cada 1,25 segundos. O espectrômetro de massas foi calibrado antes do uso e também durante a corrida analítica, a cada intervalo de 30 segundos, utilizando glufibrinopeptídeo (GFP-b, Waters) como padrão à 500 fmol/μL e fluxo de 0,5 μL/min.

*c. Identificação de proteínas por busca em banco de dados*

Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados pelo ProteinLynx Global Server 3.0.3 (Waters) com limites de contagens para baixa e alta energia, e de intensidade de 50 e 750, resolução do TOF e largura dos picos automáticas e m/z do calibrante para carga +2 de 785,8426 com janela de 0,2 Da. As buscas no banco de dados

foram realizadas com as sequências do gênero *Bothrops* obtidas do Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

### 3.4. Caracterização das Atividades Enzimáticas e Biológicas dos Venenos

#### 3.4.1. Atividade proteolítica

##### a. Atividade caseinolítica

Para a determinação da atividade proteolítica do veneno sobre o substrato caseína foi utilizado o método descrito por Menezes *et al.* (2006). Em 490  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão (Tris-HCl 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, pH 8,8) foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução de veneno 1 mg/mL e 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de N,N-caseína dimetilada 2% (Sigma), ambos solubilizados no mesmo tampão. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Em seguida, a amostra foi incubada em banho de gelo por 10 minutos, centrifugada a 14.000 g por 15 minutos, a 4 °C e a absorbância dos sobrenadantes foi mensurada utilizando o comprimento de onda de 280 nm. A atividade específica foi expressa na forma de U/min/mg de veneno.

##### b. Atividade colagenolítica

A atividade proteolítica sobre colágeno foi determinada utilizando *azocoll* (Sigma) como substrato, de acordo com Antunes *et al.* (2010), com algumas modificações. Cinquenta microlitros de substrato (5 mg/mL) foram incubados com 6,25  $\mu\text{g}$  de veneno, ambos dissolvidos em PBS pH 7,4, por 1 hora, a 37 °C, em agitação contínua. A reação foi interrompida colocando as amostras no gelo por 5 minutos. Após 3 minutos de centrifugação (5000  $\times$  g), a absorbância dos sobrenadantes foi medida a  $A_{540}$  nm. Uma unidade (1 U) foi definida como a quantidade de veneno que aumenta a absorbância em 0,003 unidades. A atividade foi expressa na forma de U/min/mg de veneno.

##### c. Zimografia

Para a zimografia em gel foi utilizado o método descrito por Heussen e Dowdle (1980), com algumas modificações. Os venenos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, contendo gelatina ou caseína de leite bovino (Sigma), na concentração final de 1 mg/mL. Após a corrida, os géis foram lavados por 15 minutos, duas vezes, com 2,5% Triton X-100 e, depois, com água destilada por 5 minutos. O gel foi incubado em solução tampão (Tris-HCl 30 mM, NaCl 200 mM, 0,02%  $\text{NaN}_3$ , pH 7,4), a 37°C, durante a

noite. Em seguida, os géis foram retirados da solução e corados utilizando Coomassie Blue R-350, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

#### 3.4.2. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada utilizando o método descrito por Holzer e Mackessy (1996), em que 1 U equivale a 25,8 nmoles de cromóforo liberado a partir de uma reação entre um substrato e as PLA<sub>2</sub>s presentes no veneno. Vinte microgramas de veneno e de água foram pipetados, por poço, em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 200 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM e NaCl 100 mM pH 8,0, foram pipetados em cada poço. Para a reação, foram adicionados a cada poço 20 µL do substrato NOBA (4-nitro-3-octanoloxo ácido benzóico). Os venenos foram submetidos à leitura a A<sub>425</sub> nm após 60 minutos de incubação a 37 °C. A atividade foi expressa como U/min/mg de veneno.

#### 3.4.3. Atividade de L-amino ácido oxidase (LAAO)

A determinação da atividade da enzima LAAO foi feita pelo método descrito por Kishimoto e Takahashi (2001), em que a quantidade de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) liberado após uma reação entre as LAAOs do veneno e a mistura reativa é medida. Em uma microplaca, 10 µg de veneno foram incubados com 90 µL de mistura reativa (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, L-metionina 250 mM, o-fenilendiamina 2 mM e peroxidase de rábano 0,8 U/mg) por 60 minutos, a 37 °C. Em seguida, a reação foi interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% e a leitura foi realizada a A<sub>492</sub> nm. Uma curva padrão de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em diferentes concentrações foi utilizada para a determinação da atividade da LAAO. Uma unidade (1 U) de atividade é definida como a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM) liberada por um miligrama de veneno. A atividade foi expressa como µM/min/mg de veneno.

#### 3.4.4. Dose mínima coagulante (DMC)

A atividade coagulante sobre plasma foi realizada segundo a metodologia de Theakston e Reid (1983). Os venenos foram diluídos em solução salina 0,85% em diferentes concentrações. O tempo de coagulação foi obtido adicionando-se 100 µL de cada solução de veneno às alíquotas de 200 µL de plasma, mantidas a 37 °C. O tempo de coagulação foi cronometrado imediatamente após a adição da solução de veneno. A DMC (mg de veneno/mL de plasma) é definida como a menor dose de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos.

#### 3.4.5. Dose letal 50% – DL<sub>50</sub>

Para a determinação da DL<sub>50</sub>, grupos de 5 camundongos Swiss (machos, pesando entre 18 e 22 g) receberam, via intraperitoneal, 500 µL de solução de veneno em diferentes concentrações (diluídos em solução salina 0,9%). O número de animais mortos para cada dose dos venenos foi observado por um período de até 48 horas. A DL<sub>50</sub> foi calculada pela análise de probitos, utilizando-se o número total de camundongos mortos por dose dos venenos durante o período de observação (FINNEY, 1971).

### 3.5. Análise do imunorreconhecimento do veneno pelo soro antibotrópico

#### 3.5.1. *Western blotting*

O método *Western blotting* (HARLOW e LANE, 1988) foi utilizado para verificar a ocorrência de imunointeração entre as proteínas do veneno de *B. moojeni* e o soro antibotrópico (lote: 1302077). Após o SDS-PAGE dos venenos, os géis e os papéis de filtro foram incubados por 10 minutos em tampão de transferência (Tris-HCl 48 mM glicina 39 mM metanol 20% SDS 0,037%), por 20 minutos. A membrana de PVDF (GE Healthcare) foi incubada com metanol, água deionizada e tampão de transferência, 5 minutos cada. A transferência foi feita no equipamento Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) com um programa de 1,0 A, 25 V por 35 minutos. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com leite desnatado em pó 5% contendo Tween 20 0,01% durante a noite, a 4 °C. Na sequência, a membrana foi submetida a três lavagens de 5 minutos cada com solução de lavagem (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5). Em seguida, a membrana foi incubada com soro antibotrópico em uma proporção de 1:1000 em solução de bloqueio por 2 horas, a temperatura ambiente. Após 3 lavagens, a membrana foi incubada com conjugado imunoenzimático (anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase), diluído 1:8000 em tampão de bloqueio por 2 horas, a temperatura ambiente. A membrana foi, então, lavada 3 vezes e revelada com a adição de substrato cromogênico (5 mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato em 10 mL de tampão imidazol 0,1 M, 125 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M e 3,4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %). A reação foi interrompida adicionando-se água destilada.

#### 3.5.2. ELISA

A capacidade do veneno da *B. moojeni* ser reconhecido pelo soro antibotrópico comercial foi avaliada pelo teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Uma

placa de 96 poços foi sensibilizada com 10 µg/mL de solução de antígeno (veneno de *B. moojeni*) em 100 µL/poço de tampão carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 34 mM, NaHCO<sub>3</sub> 15 mM, pH 9,6), que foi incubada durante a noite, a 4 °C em câmara úmida. Após a fixação do antígeno, a placa foi lavada três vezes, durante 5 minutos, utilizando uma solução de lavagem (PBS pH 7,4 + Tween 20 0,05%). O bloqueio foi realizado pela incubação com solução bloqueadora de tampão carbonato contendo leite desnatado em pó 3% (200 µL/poço) por 2 horas a 37 °C em câmara úmida. Após a segunda incubação, foi aplicada uma diluição seriada do soro antibotrópico (lote: 1302077) em tampão de incubação leite desnatado em pó 1% Tween 20 0,05% diluído em PBS pH 7,4 (100 µL/poço) e incubada novamente por 1 hora a 37 °C em câmara úmida. Após a lavagem, o conjugado imunoenzimático diluído em tampão de incubação foi aplicado (100 µL/poço) e, em seguida, incubado por mais 1 hora a 37 °C. Após mais um passo de lavagem, foi aplicado o substrato (OPD 1 mg/mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%) diluído em tampão citrato pH 5,0 e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 2 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico 30% (50 µL/poço). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro a A<sub>492</sub> nm.

### **3.6. Análise estatística**

Os resultados obtidos para a dosagem de proteínas e para as atividades enzimáticas e biológicas foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student para a comparação dos *pools* de machos e fêmeas da mesma idade, e por ANOVA seguido por comparações múltiplas de Tukey para comparar as seis idades entre si de machos ou fêmeas.

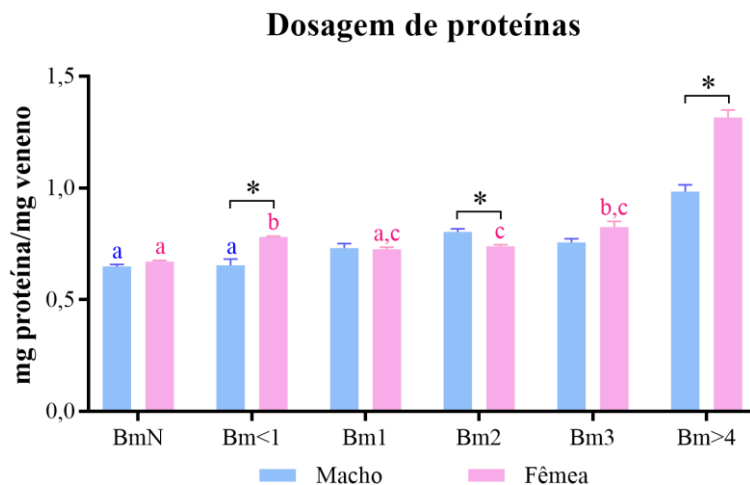


## 4. Resultados

### 4.1. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas, obtida pelo método de Bradford, foi realizada para comparar o conteúdo proteico dos venenos (Figura 1). A quantidade de proteínas dos venenos dos machos apresentou uma tendência ao aumento conforme a idade. Os *pools* BmN e Bm<1 machos não apresentaram diferença estatística, diferente dos demais. O grupo Bm>4 destacou-se entre as fêmeas por ter um maior conteúdo proteico em relação aos demais grupos. Os grupos Bm<1, Bm2 e Bm>4 apresentaram diferença significativa entre os *pools* de machos e fêmeas, e apenas nos *pools* de Bm2 os machos apresentaram maior conteúdo proteico em relação às fêmeas.

**Figura 1.** Dosagem de proteínas utilizando o método de Bradford dos *pools* de venenos das serpentes *B. moojeni*. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo.



### 4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

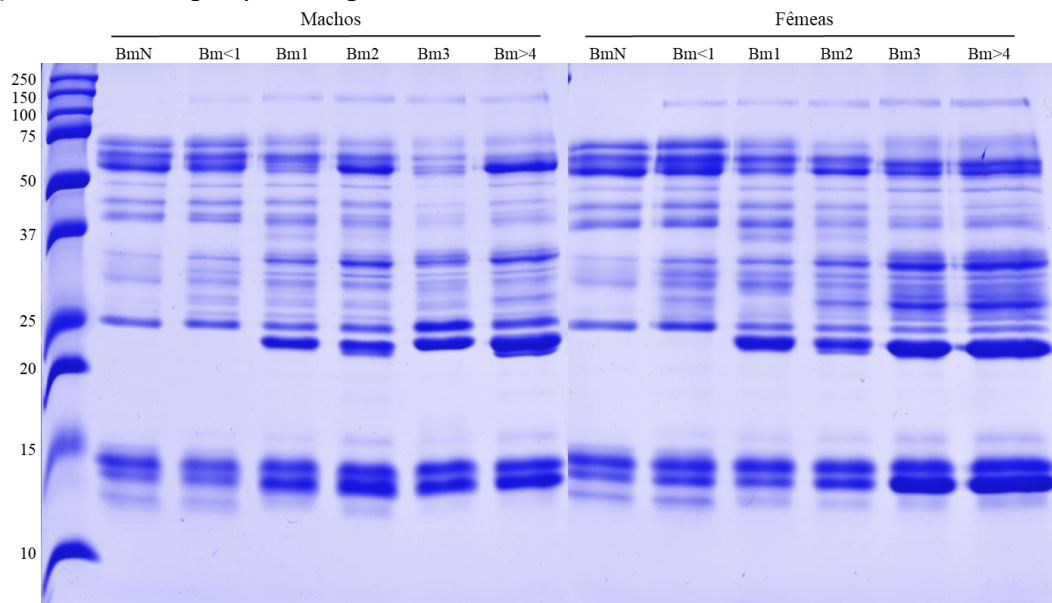
O perfil proteico dos venenos foi analisado por meio de SDS-PAGE 15%, em condições redutoras, ou seja, após a redução de suas cadeias pela quebra das pontes dissulfeto pelo  $\beta$ -mercaptoetanol.

No gel, os venenos apresentaram perfis eletroforéticos bastante diferentes entre si (Figura 2). Os venenos BmN, tanto de machos quanto de fêmeas, não apresentam uma banda de cerca de 150 kDa, provavelmente correspondente à fosfodiesterase, que aparece a partir dos grupos de serpentes Bm<1 e aumentam ligeiramente conforme a idade. Similarmente, as bandas entre 20-25 kDa, correspondentes às metaloproteases P-I, aparecem a partir dos

grupos Bm1 em diante. As bandas entre 37 e 50 kDa estão presentes em todos os venenos, porém nos grupos BmN aparecem em maior intensidade e diminuem conforme a idade. O inverso pode ser observado com as proteínas entre 25-37 kDa (serino proteases), que, além de serem bandas mais intensas, a variabilidade também aumenta com a idade dos animais. É interessante notar o surgimento de uma banda de cerca de 23 kDa a partir do grupo Bm 1, em ambos os sexos. As bandas de PLA<sub>2</sub>s (entre 10 e 15 kDa), apesar de estarem presentes em todos os venenos, são mais intensas nos venenos a partir do grupo Bm1. Por outro lado, uma banda próxima de 75 kDa (possivelmente LAAOs) e outra na mesma região das PLA<sub>2</sub>s (que incluem CTLs e desintegrinas – cerca de 12,5 kDa) diminuem ao passo que os animais se tornam mais velhos. As proteínas citadas e suas respectivas massas moleculares foram identificadas com base nas informações obtidas por espectrometria de massas.

Além disso, os venenos Bm3 apresentaram algumas peculiaridades, principalmente nas bandas de alta e média massa molecular (acima de 37 kDa), que são menos intensas no *pool* de Bm3 machos.

**Figura 2.** SDS-PAGE 15% dos *pools* de venenos de *B. moojeni* machos e fêmeas, em condições reduzidas por  $\beta$ -mercaptoetanol.



#### 4.3. Cromatografia Líquida de Alta Performance – Fase Reversa (RP-HPLC)

Os 12 venenos foram analisados por cromatografia líquida (RP-HPLC) e os perfis cromatográficos obtidos, assim como os géis, apresentaram diferenças quantitativas em algumas famílias de proteínas (Figura 3).

Os picos encontrados entre 40 e 50 minutos (PLA<sub>2</sub>s não enzimáticas) nos cromatogramas de machos aumentaram gradualmente do grupo BmN até o Bm1 e se

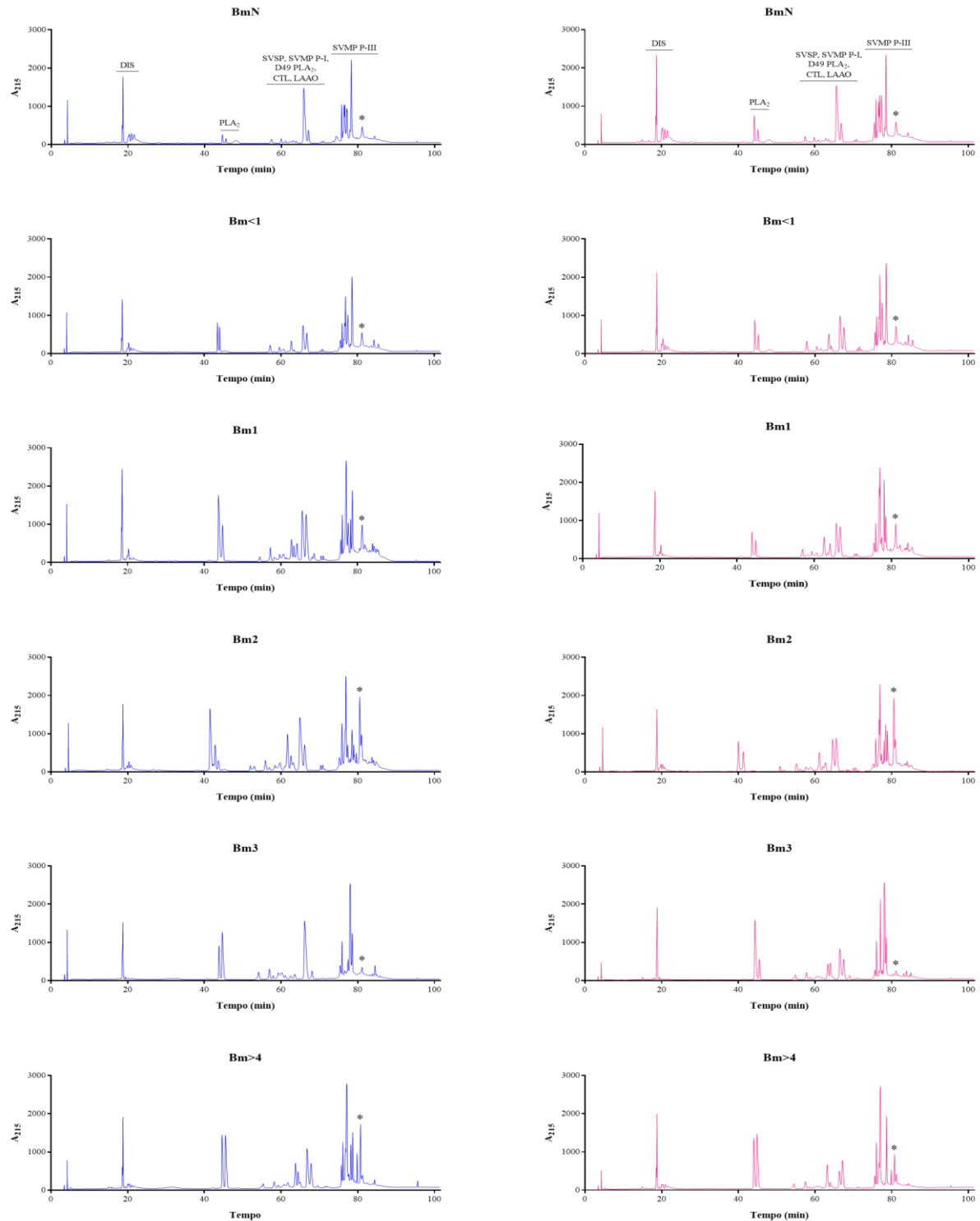
mantiveram também no Bm2. O veneno Bm3 apresentou diminuição dos picos e o Bm>4 também se manteve em uma intensidade semelhante. Nas fêmeas, estes picos aumentam apenas nos venenos Bm3 e Bm>4.

Um aumento de variabilidade foi observado nas proteínas na área entre 50 e 70 minutos, que compreendem serino proteases, PLA<sub>2</sub>s enzimáticas, CTLs e metaloproteases P-I, principalmente nos venenos Bm1 e Bm2, idades em que os machos apresentam maior quantidade de picos do que as fêmeas. Contudo, no veneno Bm3 macho essa variabilidade regride e o padrão parece se manter no grupo Bm>4 machos e fêmeas.

Na região de metaloproteases do tipo P-III é possível observar, também, um aumento de variabilidade e, nos grupos Bm2 e Bm>4, a aparição de um segundo pico de alta intensidade (marcado com \* nas Figura 3), que não é encontrado no veneno Bm3 e é menor nos venenos Bm>4 em relação aos Bm2. No entanto, no cromatograma dos venenos de Bm>4 machos e fêmeas, é possível identificar um pico próximo ao marcado (\*) que aumenta neste veneno.

Nota-se, também, que, em geral, a quantidade e a intensidade dos picos dos venenos das fêmeas são mais conservadas em diferentes idades quando comparados aos dos machos.

**Figura 3.** Perfil cromatográfico do pools de venenos de *B. moojeni* machos (azul) e fêmeas (rosa). Um miligrama de veneno foi aplicado em uma coluna de fase reversa C-18 25 × 0,4 mm (Teknokroma Europa 300), equilibrada previamente com a ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 5% (solução A), utilizando-se cromatógrafo AKTA Purifier UPC10 (GE Healthcare). A eluição foi realizada em gradiente de uma solução de ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 95% (solução B). DIS: desintegrinas; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; SVSP: serino proteases; SVMP P-I: metaloproteases tipo P-I; CTL: lectina tipo C; LAAO: L-amino ácido oxidase; SVMP P-III: metaloprotease tipo P-III. (\*) Pico que pode estar relacionado à atividade colagenolítica (4.5.2.).

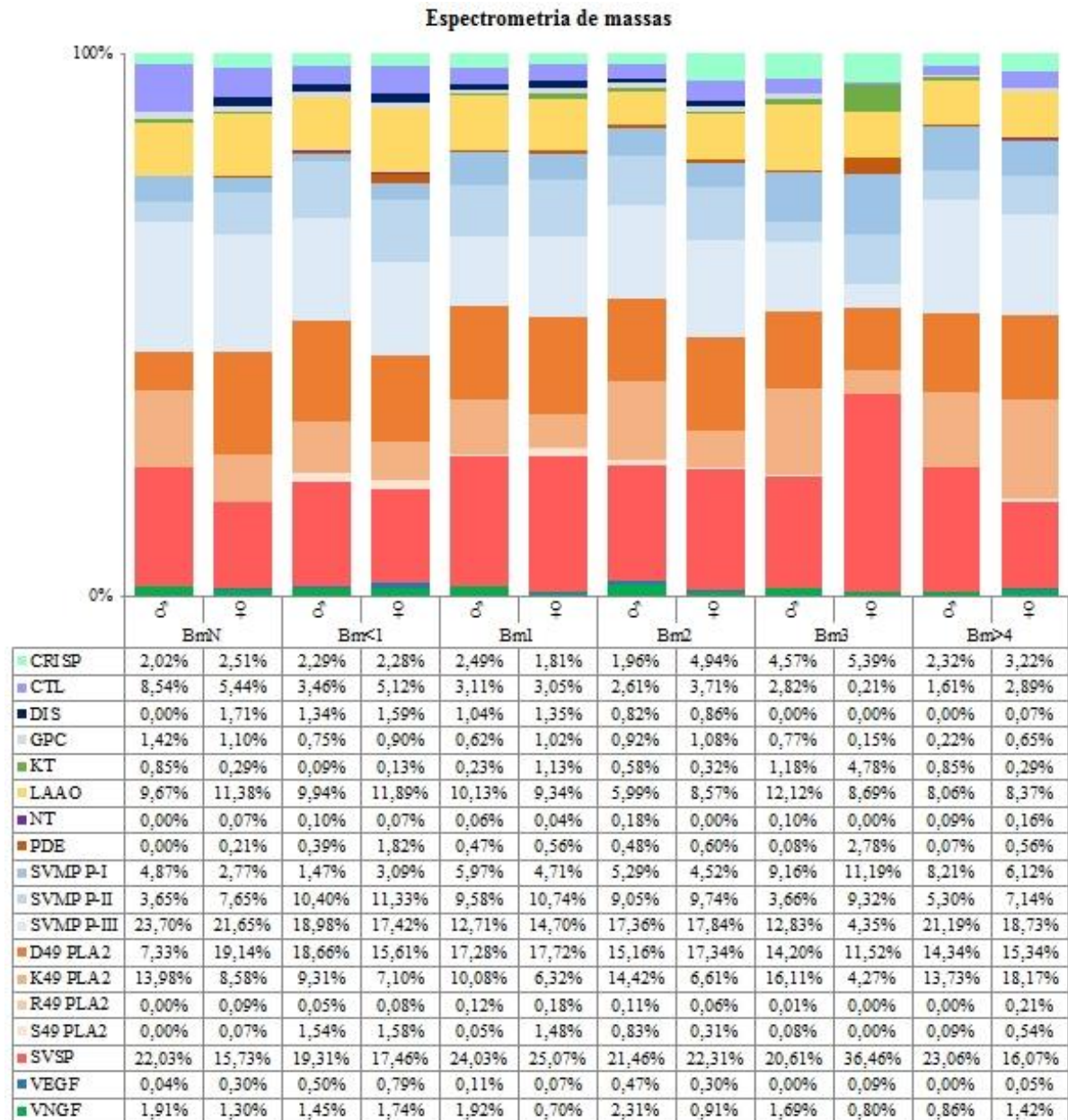


#### 4.4. Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF)

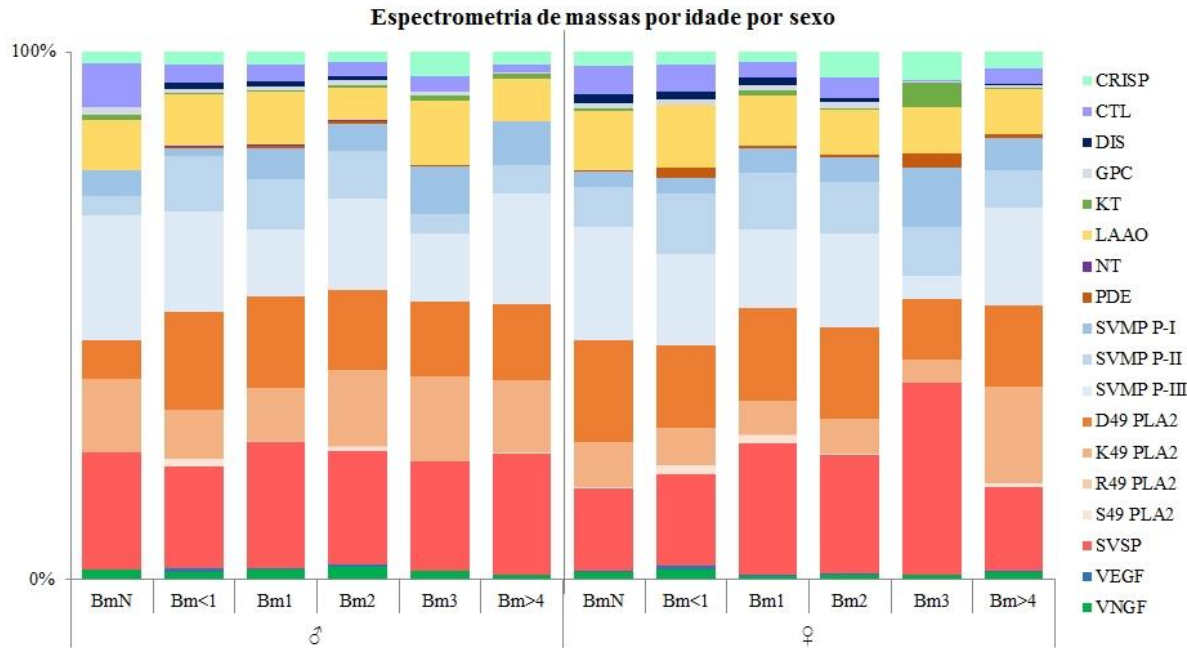
A espectrometria de massas dos 12 venenos apresentou diferenças qualitativas e quantitativas (Figura 4 e 5). O gráfico foi construído a partir da quantificação dos compostos identificados em cada amostra, listados nos Apêndices 1 e 2. O total de proteínas identificadas nos venenos de machos e de fêmeas foi de 232.

Destacam-se, entre os machos, a ausência de fosfodiesterases (PDEs) e nucleotidasas (NTs) nos venenos de neonatos, ausência de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nos venenos Bm3 e Bm>4, e presença de desintegrinas (DISs) apenas nos venenos Bm<1, Bm1 e Bm2. Por outro lado, entre as fêmeas, os grupos Bm2 e Bm>4 não apresentaram NTs, e o Bm3 não apresentou DISs. Todavia, essas famílias são minoritárias, ou seja, são pouco abundantes no total do veneno.

**Figura 4.** Abundância relativa das famílias de proteínas encontradas nos venenos de serpentes *B. moojeni* machos e fêmeas de idades diferentes por meio de espectrometria de massas. CRISP: proteína secretada rica em cisteína; CTL: lectina tipo C; DIS: desintegrina; GPC: peptídeo glutamil ciclotransferase; KT: inibidor de serino proteases do tipo Kunitz; LAAO: L-amino ácido oxidase; NT: 5'-nucleotidase; PDE: fosfodiesterase; SVMP: metaloprotease; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; SVSP: serino protease; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; VNGF: fator de crescimento neural.



**Figura 5.** Comparação da abundância relativa das famílias de proteínas encontradas nos venenos de serpentes *B. moojeni* de diferentes idades de cada sexo por meio de espectrometria de massas. CRISP: proteína secretada rica em cisteína; CTL: lectina tipo C; DIS: desintegrina; GPC: peptídeo glutamyl ciclotranferase; KT: inibidor de serino proteases do tipo Kunitz; LAAO: L-amino ácido oxidase; NT: 5'-nucleotidase; PDE: fosfodiesterase; SVMP: metaloprotease; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; SVSP: serino protease; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; VNGF: fator de crescimento neural.



Por outro lado, é interessante notar algumas variações quantitativas entre as PLA<sub>2</sub>s, serino proteases (SVSP), metaloproteases (SVMP), LAAOs e lectinas tipo C (CTL). Comparando a abundância de PLA<sub>2</sub>s entre as diferentes idades de machos (Figura 4), o veneno BmN apresentou menor concentração desta proteína, porém, maior concentração de CTLs do que os demais grupos deste sexo. No caso das fêmeas, a menor concentração de PLA<sub>2</sub>s ocorreu no grupo Bm3, no qual a abundância de serino proteases é maior em relação aos outros grupos, situação que se inverte no grupo Bm>4, apesar da proporção de serino proteases ser similar aos outros grupos deste mesmo sexo, como BmN e Bm<1. As metaloproteases, no entanto, mantiveram-se relativamente similares entre todos os grupos analisados.

Analisando as subfamílias de metaloproteases, pode-se observar que, nos machos, o veneno Bm1 possui pouca abundância do tipo P-I, enquanto os venenos Bm3 e Bm>4 são os que têm a maior concentração. Já as fêmeas parecem ter um padrão de aumento gradual desta subfamília, mas no veneno Bm3 é a predominante dentre as metaloproteases. Quanto ao tipo P-II, este é o tipo menos abundante no veneno BmN, aumenta drasticamente no veneno Bm<1 e, nas fêmeas, diminui ligeiramente conforme a idade aumenta, porém nos machos, houve

uma diminuição brusca no veneno Bm3. O tipo P-III foi o que menos variou entre as idades, exceto pelo veneno Bm3 fêmea, no qual este tipo foi o menos abundante. De forma geral, comparando machos e fêmeas da mesma idade, os venenos BmN, Bm3 e Bm>4 tiveram as maiores diferenças nas proporções dos diferentes tipos de metaloproteases.

Quanto aos grupos de PLA<sub>2</sub>s, as não enzimáticas (K49, R49 e S49) predominaram apenas no veneno BmN machos e Bm>4 fêmeas. Consequentemente, o inverso ocorreu com as PLA<sub>2</sub>s enzimáticas (D49), com o veneno BmN machos e o Bm>4 fêmeas contendo maior e menor quantidade dessas proteínas, respectivamente. As fêmeas dos grupos BmN e Bm>4 apresentaram mais PLA<sub>2</sub>s totais do que os machos e, entre os venenos Bm3, o de fêmeas apresentou pouca PLA<sub>2</sub>.

Algumas proteínas foram exclusivas de determinada idade e/ou sexo (Tabela 2). No caso dos machos, BmN teve apenas uma LAAO exclusiva; o grupo Bm<1 continha uma metaloprotease P-III, uma PLA<sub>2</sub> e uma CTL; o veneno Bm2 foi o que mais apresentou proteínas exclusivas, sendo 4 PLA<sub>2</sub>s, 3 CTL, uma serino protease e uma metaloprotease P-II; o veneno Bm3 continha 2 PLA<sub>2</sub>s; os grupos Bm1 e Bm>4 não apresentaram proteínas exclusivas entre as amostras de machos. Todos os venenos de fêmeas, exceto pelo BmN, apresentaram proteínas exclusivas: Bm<1 continha 3 PLA<sub>2</sub>s; o veneno Bm1 apresentou a maior quantidade de proteínas exclusivas, sendo 2 metaloproteases P-II e uma P-I, uma PLA<sub>2</sub>, uma CTL e uma serino protease; uma metaloprotease P-I, uma CTL e uma serino protease foram encontradas no veneno Bm2; no veneno Bm3 foram encontradas apenas duas PLA<sub>2</sub>s; e no Bm>4 foram encontradas uma metaloprotease P-III, uma CTL e uma PLA<sub>2</sub>. No total, os machos tiveram 6 proteínas exclusivas em comparação com as fêmeas, que tiveram 9 proteínas que não apareceram nos venenos de machos.

**Tabela 2.** Lista das proteínas exclusivas e suas funções separadas por idade e sexo. As proteínas marcadas em azul são exclusivas de machos e as proteínas marcadas em rosa são exclusivas de fêmeas.

<i>Protein entry</i>	Família	Exclusividade	Função
O93364	LAAO	BmN	Produz H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pela catalização de L-aminoácidos, contribuindo para a toxicidade do veneno (MASSEY e CURTI, 1967).
Q90282	SVMP P-III	Bm<1	Inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno (ZHOU; DANGELMAIER; SMITH, 1996).
Q2PG83	D49 PLA <sub>2</sub>	Bm<1	Possui atividade enzimática (CHIJIWA et al, 2006).
PODJL3	CTL	Bm<1	Induz a agregação plaquetária sem necessidade de cofator (LI et al, 2004)



Q2PG83	D49 PLA <sub>2</sub>	Bm<1	Possui atividade enzimática (CHIJIWA et al, 2006).
Q9PVE9	D49 PLA <sub>2</sub>	Bm<1	Possui atividade enzimática e inibe a agregação plaquetária (TSAI et al, 2000).
P0DJJ8	K49 PLA <sub>2</sub>	Bm<1	Possui atividade miotóxica (YOSHIKUMI et al, 1990)
P31981	SVMP P-II	Bm1	Inibe a agregação plaquetária (SCARBOROUGH et al, 1993).
P0C6S0	SVMP P-I	Bm1	Possui atividade fibrinogenolítica e induz apoptose (BALDO et al, 2008).
Q805F6	SVMP P-II	Bm1	Inibe a agregação plaquetária (FUJII et al, 2002).
P0DMK0	K49 PLA <sub>2</sub>	Bm1	É miotóxica e pouco citotóxica (DE MOURA et al, 2014).
P0DJL3	CTL	Bm1	Induz a agregação plaquetária (LI et al, 2004).
Q8QHK3	SVSP	Bm1	Interfere na hemostasia (CALVETE et al, 2009).
Q805F6	SVMP P-II	Bm2	Inibe a agregação plaquetária induzida por ADP (MOISEEVA et al, 2008).
Q9PSM5	CTL	Bm2	Inibe a agregação plaquetária (FUJIMURA et al, 1995).
Q9PSF9	D49 PLA <sub>2</sub>	Bm2	Possui atividade enzimática e inibe de agregação plaquetária (NIKAI et al, 1994).
Q2YHJ4	K49 PLA <sub>2</sub>	Bm2	Não possui atividade enzimática, mas é edematogênica (WANG; PENG; TSAI, 2005)
Q71QE8	D49 PLA <sub>2</sub>	Bm2	Possui atividade enzimática e causa mionecrose e edema (OWNBY; COLBERG; WHITE, 1997).
P48650	S49 PLA <sub>2</sub>	Bm2	Potencializa a toxicidade do veneno (PETAN; KRIZAJ; PUNGERCAR, 2007).
Q8JGT6	CTL	Bm2	Ativador de plaquetas (TSAI et al, 2004).
E2DQZ5	CTL	Bm2	Induz a agregação plaquetaria (CHEN et al, 2011).
Q8QHK3	SVSP	Bm2	Interfere na hemostasia (CALVETE et al, 2009)
P0C7A9	SVMP P-I	Bm2	Ativador de protrombina e com atividade fibrino(geno)lítica (BERGER; PINTO; GUIMARÃES, 2008).
Q9PSM5	CTL	Bm2	Inibe a agregação plaquetária (FUJIMURA et al, 1995).
P81176	SVSP	Bm2	Possui atividade coagulante (MATSUI et al, 1998).
Q6H3C8	D49 PLA <sub>2</sub>	Bm3	Inibe a agregação plaquetária (TSAI et al, 2004).
Q2PG81	R49 PLA <sub>2</sub>	Bm3	Possui atividade miotóxica, edematogênica e fraca atividade enzimática (CHIJIWA et al, 2006).
Q6H3C8	D49 PLA <sub>2</sub>	Bm3	Possui atividade enzimática e inibe a agregação plaquetária (TSAI et al, 2004).

Q9PVF2	D49 PLA <sub>2</sub>	Bm3	Possui atividade enzimática e inibe a agregação plaquetária (TSAI et al, 2004).
A2CJE2	SVMP P-III	Bm>4	Interfere na hemostasia (SOTO et al, 2007).
P0DM53	CTL	Bm>4	Induz a hemaglutinação (MENDONÇA-FRANQUEIRO et al, 2011).
Q2YHJ4	K49 PLA <sub>2</sub>	Bm>4	Não possui atividade enzimática e é edematogênica (WANG; PENG; TSAI, 2005).
Q2PG81	K49 PLA <sub>2</sub>	Bm>4	Possui miotoxicidade e induz edema (CHIJWA et al, 2006)
P00623	D49 PLA <sub>2</sub>	♂	Possui atividade enzimática (HEINRIKSON; KRUEGER; KEIM, 1977).
Q1X6Y3	VGNF	♂	Parece ter influência sobre os neurônios de propriocepção (NOONAN e CHIPPINDALE, 2006).
Q6H3C6	D49 PLA <sub>2</sub>	♀	Possui atividade enzimática e inibe agregação plaquetária (TSAI et al, 2004).
Q9PSM4	CTL	♀	Induz a hemaglutinação (GOMEZ e ARAGON-ORTIZ, 1986).
Q6T5L0	SVSP	♀	Possui atividade fibrinogenolítica (JIAO et al, 2005).

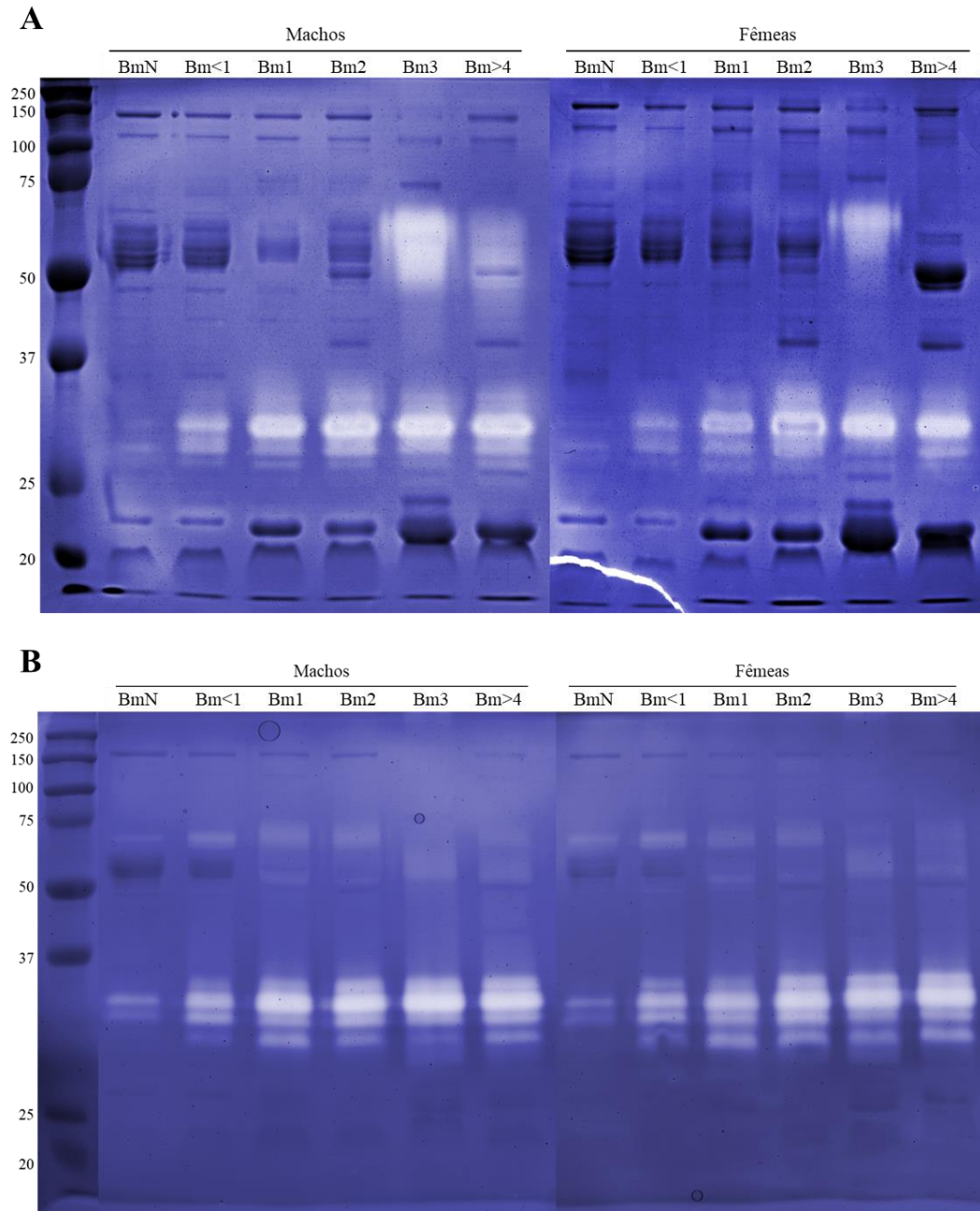
#### 4.5. Atividade proteolítica

##### 4.5.1. Zimografia

A atividade proteolítica em gel sobre colágeno e sobre caseína apresentou uma relação entre atividade e idade, ou seja, indivíduos mais jovens apresentaram menos atividade do que indivíduos mais velhos (Figura 6).

No gel de gelatina (Figura 6A), destaca-se um intensa atividade na região de entre 50-75 kDa no grupo Bm3 machos e fêmeas. Fato semelhante ocorreu na região próxima a 50 kDa do veneno Bm>4 machos. Ao utilizar caseína como substrato (Figura 6B), observa-se que, diferentemente da amostra Bm3 fêmeas, o grupo Bm3 machos apresentou atividade proteolítica menos intensa na área próxima a 30 kDa.

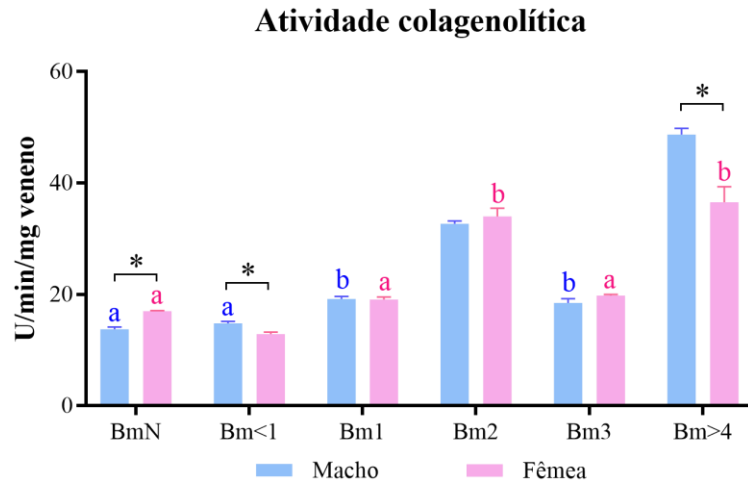
**Figura 6.** Zimografia em SDS-PAGE 12% dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas, contendo gelatina (A) ou caseína (B) como substrato.



#### 4.5.2. Atividade colagenolítica utilizando substrato azocoll

Quando a atividade colagenolítica foi feita em microplaca, utilizando o azocoll como substrato, foi observada atividade crescente conforme a idade das serpentes, exceto nos venenos Bm3, que apresentaram uma atividade semelhante à do veneno Bm1 (Figura 7). Quando analisados os venenos de acordo com o sexo, as diferenças mais acentuadas ocorreram entre os venenos BmN, em que a atividade do veneno das fêmeas foi maior, e Bm>4, em que, a atividade do veneno das fêmeas foi menor que a dos machos.

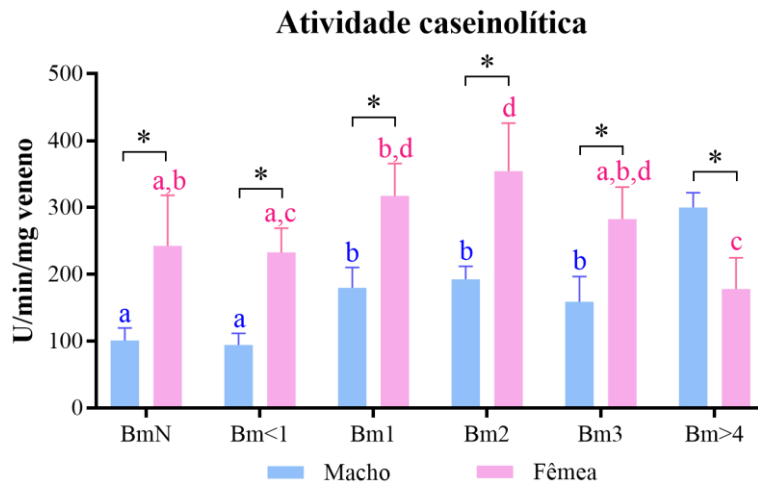
**Figura 7.** Atividade colagenolítica sobre o substrato azocoll dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo.



#### 4.5.3. Atividade caseinolítica utilizando caseína dimetilada

Utilizando caseína dimetilada como substrato no ensaio em microplaca (Figura 8), observa-se que os venenos de machos apresentaram aumento crescente de atividade proteolítica com a mais alta registrada no veneno Bm>4, mas o mesmo não ocorreu no veneno das fêmeas, em que há aumento de atividade até o grupo Bm2 e diminuição nos grupos Bm3 e Bm>4. Além disso, em todas as idades a atividade do veneno das fêmeas foi maior do que a dos machos, exceto o grupo Bm>4, em que o veneno de machos teve uma atividade maior. Comparando machos e fêmeas de mesma idade, em todos os grupos foi observada diferença significativa da atividade.

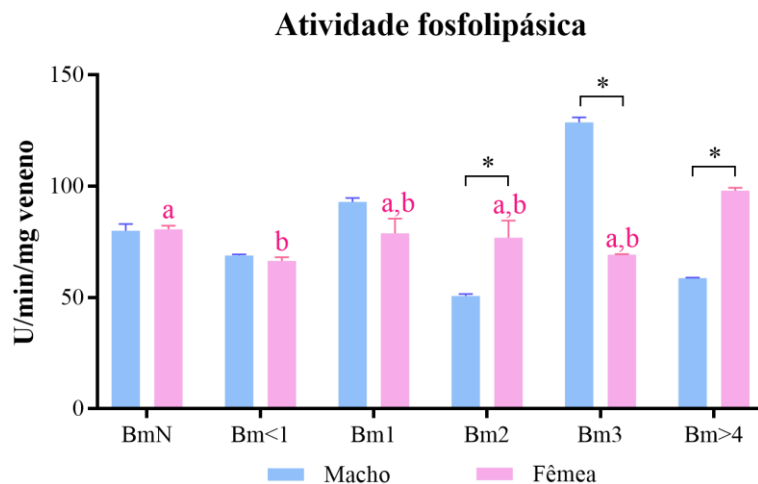
**Figura 8.** Atividade caseinolítica dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo.



#### 4.6. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica (Figura 9) dos venenos não parece estar relacionada com a idade e nem com o sexo das serpentes, uma vez que, não houve tendência de aumento ou diminuição da atividade de acordo com esses parâmetros. Contudo, o veneno Bm>4 fêmeas apresentou maior atividade em relação aos demais grupos deste mesmo sexo. Apenas nos grupos Bm2, Bm3 e Bm>4 houve diferença estatística entre o *pool* de machos e fêmeas.

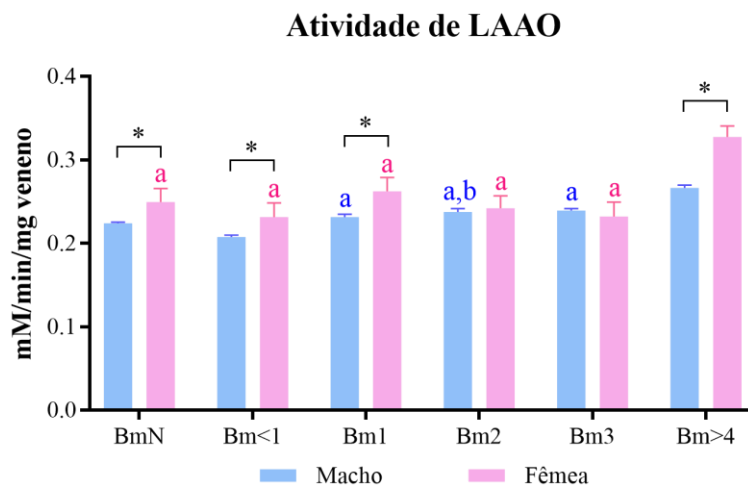
**Figura 9.** Atividade fosfolipásica dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo.



#### 4.7. Atividade de L-amino ácido oxidase

Em geral, a atividade de LAAO (Figura 10) não se altera de forma significativa entre as fêmeas, porém o grupo Bm>4 apresentou um aumento significativo em relação às demais idades. Entre os machos, apesar de haver diferença dos grupos BmN e Bm<1 para os Bm1, Bm2 e Bm3, o grupo Bm>4 também apresentou a maior atividade. Além disso, as fêmeas apresentaram atividade maior do que os machos, exceto nos venenos Bm3, em que o macho teve maior atividade, porém sem diferença estatística.

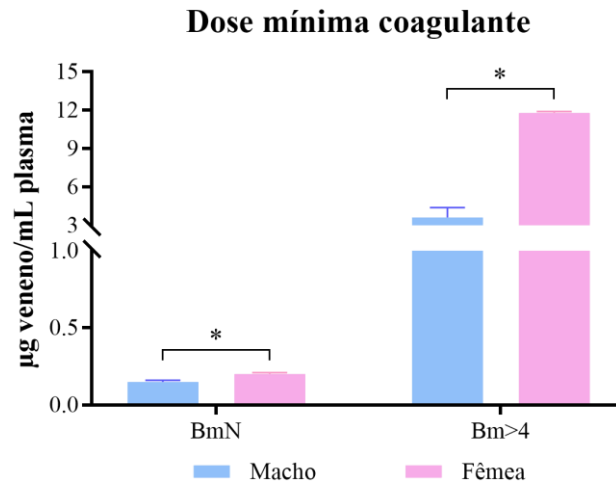
**Figura 10.** Atividade de LAAO dos venenos de *B. moojeni* de diferentes idades, machos e fêmeas. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as idades de cada sexo.



#### 4.8. Dose mínima coagulante (DMC)

A DMC determinada sobre o plasma de cavalo dos grupos BmN machos e fêmeas foi mais baixa do que a dos Bm>4. Entre os machos, o veneno BmN foi cerca de 24 vezes mais coagulante (BmN:  $0,15 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$  de plasma; e Bm>4:  $3,62 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$  de plasma) e, entre as fêmeas, a diferença foi de aproximadamente 58 vezes (BmN:  $0,20 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$  de plasma; e Bm>4:  $11,79 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$  de plasma). Em ambas as idades, o veneno dos machos foi mais coagulante em relação à fêmea, sendo 1,3 vezes entre os *pools* BmN e 3,2 vezes entre os Bm>4 (Figura 11).

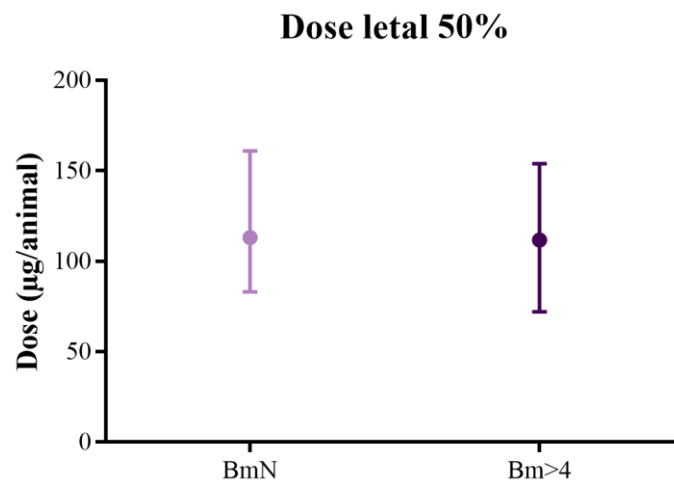
**Figura 11.** Dose mínima coagulante dos venenos de *B. moojeni* BmN e Bm>4. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre machos e fêmeas.



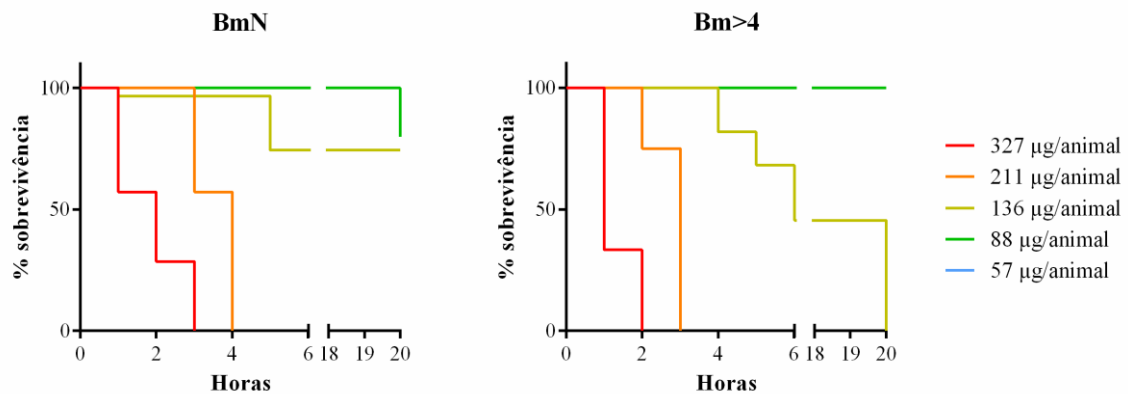
#### 4.9. Dose letal 50% (DL<sub>50</sub>)

Comparando a DL<sub>50</sub> de neonatos e adultos (Figura 12), foi possível observar que o veneno de Bm>4 possui uma dose letal um pouco menor (111,75 µg/animal; intervalo de confiança: 72,14—153,92) em relação ao BmN (113,02 µg/animal; intervalo de confiança: 83,12—161,04), porém, em virtude do amplo intervalo de confiança, não houve diferença estatística entre os resultados obtidos. Apesar de não haver diferença na dose letal entre os grupos, observou-se que o veneno do grupo Bm>4 agiu mais rapidamente do que o BmN (Figura 13).

**Figura 12.** Dose letal 50% dos venenos de *B. moojeni* BmN e Bm>4.



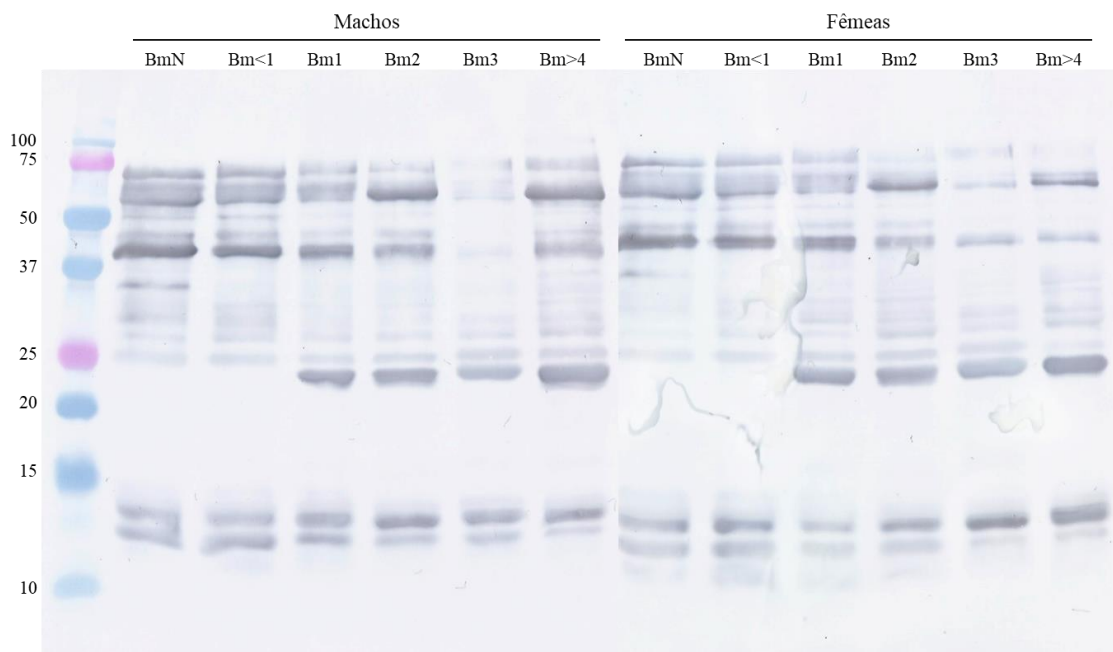
**Figura 13.** Tempo de ação após a injeção com o veneno de *B. moojeni* BmN e Bm>4 nos camundongos.



#### 4.10. Western blotting

Para a análise da interação entre as proteínas do veneno e o soro antiofídico, as amostras foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de PVDF e a revelação por substrato cromogênico mostrou que as proteínas dos venenos, em geral, foram reconhecidas pelo soro, uma vez que as bandas reveladas formam um perfil bastante similar ao visto nos géis (Figura 2). Nota-se, porém, uma escassez de bandas na região entre 25 e 37 kDa (serino proteases). Ainda, é possível observar que o reconhecimento de uma banda no veneno das fêmeas na região entre 10-15 kDa diminui com a idade (Figura 14).

**Figura 14.** Western blotting dos venenos de *B. moojeni* em diferentes idades, machos e fêmeas.





#### 4.11. ELISA

A titulação dos anticorpos obtida por meio do ELISA mostrou imunorreconhecimento similar entre todos os venenos (Tabela 3), exceto o Bm3. Considerando os venenos por sexo, apesar de estar dentro da mesma ordem de grandeza, o veneno Bm3 machos apresentou maior titulação, diferente das fêmeas da mesma idade, cujo título de anticorpos foi menor do que dos outros venenos analisados.

**Tabela 3.** Titulação de anticorpos do soro antitoxigênico por imunorreconhecimento dos venenos de *B. moojeni* em diferentes idades, machos e fêmeas.

<b>Idade</b>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
BmN	$5,7 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$
Bm<1	$6,9 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$
Bm1	$4,0 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$
Bm2	$5,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$
Bm3	$9,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$
Bm>4	$3,9 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$

**Tabela 4.** Resumo dos resultados obtidos pelos ensaios realizados descritos ao longo deste trabalho.

	BmN ( $\frac{\sigma}{\mu}$ )	Bm<1 ( $\frac{\sigma}{\mu}$ )	Bm1 ( $\frac{\sigma}{\mu}$ )	Bm2 ( $\frac{\sigma}{\mu}$ )	Bm3 ( $\frac{\sigma}{\mu}$ )	Bm>4 ( $\frac{\sigma}{\mu}$ )
Quantificação de proteínas (mg proteína/mg veneno)	$0,65 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,02$	$0,80 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,03$
	$0,67 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,01$	$0,74 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,01$	$1,32 \pm 0,03$
Total de proteínas identificadas (exclusivas)	118 (1)	196 (3)	193 (0)	208 (9)	150 (2)	137 (0)
	184 (0)	204 (3)	200 (6)	194 (3)	102 (2)	170 (4)
Atividade colagenolítica (U/min/mg veneno)	$13,7 \pm 0,4$	$14,8 \pm 0,4$	$19,2 \pm 0,5$	$32,7 \pm 0,5$	$18,5 \pm 0,8$	$48,7 \pm 1,1$
	$17,0 \pm 0,1$	$12,9 \pm 0,4$	$19,1 \pm 0,5$	$34,0 \pm 1,5$	$19,8 \pm 0,2$	$36,6 \pm 2,8$
Atividade caseinolítica (U/min/mg veneno)	$101,2 \pm 18,4$	$94,04 \pm 17,3$	$179,8 \pm 30,4$	$192,6 \pm 19,2$	$159,1 \pm 37,6$	$300,0 \pm 22,0$
	$264,6 \pm 71,0$	$232,6 \pm 36,5$	$317,4 \pm 48,2$	$354,2 \pm 72,1$	$282,8 \pm 47,9$	$178,1 \pm 46,5$
Atividade fosfolipásica (U/min/mg veneno)	$79,9 \pm 3,1$	$68,8 \pm 0,5$	$92,9 \pm 1,9$	$50,6 \pm 0,9$	$128,6 \pm 2,3$	$58,6 \pm 0,2$
	$80,6 \pm 1,69$	$66,4 \pm 1,6$	$78,8 \pm 6,6$	$76,8 \pm 7,7$	$69,1 \pm 0,3$	$98,0 \pm 1,3$
Atividade de LAAO (mM/min/mg veneno)	$0,224 \pm 0,001$	$0,208 \pm 0,002$	$0,231 \pm 0,003$	$0,238 \pm 0,004$	$0,239 \pm 0,002$	$0,266 \pm 0,003$
	$0,250 \pm 0,016$	$0,232 \pm 0,017$	$0,262 \pm 0,017$	$0,242 \pm 0,015$	$0,232 \pm 0,017$	$0,327 \pm 0,013$
Título dos anticorpos	$5,7 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$
	$5,5 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$5,6 \times 10^7$
DMC ( $\mu$ g veneno/mL plasma)	$0,15 \pm 0,01$	-	-	-	-	$3,62 \pm 0,79$
	$0,20 \pm 0,01$	-	-	-	-	$11,79 \pm 0,1$
DL <sub>50</sub> ( $\mu$ g veneno/animal)*	113,02	-	-	-	-	111,75
	(83,12— 161,04)	-	-	-	-	(72,04— 153,92)

\*O ensaio de DL<sub>50</sub> foi realizado utilizando-se *pools* compostos pelos venenos de machos e fêmeas.

## 5. Discussão

Ao estudar venenos de serpentes, é importante considerar que diversas variáveis podem influenciar nas análises devido à heterogeneidade do veneno e seus inúmeros mecanismos de ação, e relacioná-los a um organismo vivo é uma tarefa complexa. Os testes realizados neste trabalho tiveram, portanto, como objetivo, comparar a composição proteica e correlacioná-la às atividades inerentes do veneno, de acordo com o sexo, e, em várias idades da serpente *B. moojeni*.

A dosagem de proteínas mostrou uma maior concentração proteica dos venenos do grupo Bm>4 quando comparados aos demais, e as fêmeas apresentaram maior concentração proteica em relação aos machos, exceto nos grupos Bm1 e Bm2. Furtado e colaboradores (1991) analisaram os venenos de mães e suas respectivas ninhadas de nove espécies do gênero *Bothrops*, das quais quatro (*B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. erythromelas* e *B. jararacussu*) apresentaram maior concentração de proteínas no veneno das mães. Curiosamente, no caso da *B. moojeni*, o pool da ninhada recém-nascida apresentou maior concentração em relação à mãe. Além disso, estudos feitos comparando serpentes *B. jararaca* adultas mostraram uma maior concentração proteica no veneno das fêmeas quando comparadas com os machos, corroborando nosso estudo (FURTADO *et al.*, 2006).

A composição proteica analisada por SDS-PAGE, cromatografia e espectrometria de massas dos venenos apresentou diferenças ontogenéticas bastante evidentes. No SDS-PAGE, destacam-se o surgimento das bandas de fosfodiesterases a partir de Bm<1 e de metaloproteases P-I a partir de Bm1, além de aumento na região de serino proteases, VGNFs e CRISPs e de PLA<sub>2</sub>s, e diminuição de GPCs. Dentre as espécies do gênero *Bothrops*, diferenciações ontogenéticas foram encontradas nas espécies *B. jararaca* (ZELANIS *et al.*, 2009), *B. insularis* (ZELANIS; TRAVAGLIA-CARDOSO; FURTADO, 2008), *B. atrox* e *B. asper* (LÓPEZ-LOZANO *et al.*, 2002; SALDARRIAGA *et al.*, 2003), e em híbridos de *B. erythromelas* e *B. neuwiedi* (SANTORO *et al.*, 2015), especialmente nas regiões de proteínas de alta e baixa massa molecular.

Pelos resultados obtidos pela espectrometria de massas, foi possível identificar algumas proteínas exclusivas na comparação entre as diferentes idades, mas algumas se destacam pelas quantidades encontradas.

Nota-se que os venenos de neonatos machos e fêmeas não apresentaram proteínas exclusivas. Entre as diferentes idades de machos, o grupo Bm2 apresentou a maior quantidade de proteínas exclusivas (9 proteínas), ao passo que, entre as fêmeas, o grupo Bm1 apresentou

mais proteínas exclusivas (6 proteínas) em relação aos demais grupos. Isso sugere uma diferença no tempo de maturação sexual das serpentes, com as fêmeas passando por este processo em uma idade menor em relação aos machos, mesmo que isso não se reflita na diferença de tamanho entre os sexos (Tabela 1).

Ainda com relação à espectrometria de massas, observou-se que a maioria das proteínas exclusivas encontradas (Tabela 2) estão relacionadas aos efeitos procoagulante e anticoagulante dos venenos, o que, possivelmente, se reflete na ampla diferença na atividade procoagulante observada.

Observações clínicas de envenenamento causado por serpentes da espécie *B. jararaca* apontaram que venenos de animais adultos têm maior ação proteolítica do que coagulante (RIBEIRO e JORGE, 1990). No estudo realizado por Furtado e colaboradores (1991) com as mães e suas respectivas ninhadas, foi observada maior atividade proteolítica sobre caseína no veneno das mães de todas as espécies. Neste trabalho, a atividade proteolítica sobre colágeno ou caseína apresentou essa diferença entre filhotes e adultos e o aumento da atividade conforme a idade, com exceção do grupo Bm3, que apresentou baixa atividade sobre azocoll, e dos grupos Bm3 e Bm>4 fêmeas, em que a atividade sobre caseína foi inferior à obtida para Bm2 fêmeas. Além disso, o veneno das fêmeas se mostrou mais proteolítico quando o substrato utilizado foi a caseína, resultado similar ao obtido por Menezes e colaboradores (2006) com o veneno de *B. jararaca*.

O veneno mais proteolítico pode estar associada à digestão de presas maiores, como exemplificado em alguns trabalhos (REICHERT, 1936; THOMAS e POUGH, 1979; ZELLER, 1948), em que o tempo de digestão registrado foi menor quando o veneno era previamente injetado na presa, o que facilita e agiliza a degradação de tecidos, escamas, pelos e penas. Ressalta-se, contudo, que o colágeno é um substrato naturalmente degradado pelas proteases do veneno, ao contrário da caseína, um substrato não natural às mesmas, e o uso de substratos diferentes dependendo da metodologia (gelatina ou azocoll, caseína dimetilada ou caseína bovina) são fatores que podem contribuir para a diferença nos resultados obtidos.

Um detalhe interessante a ser notado é o pico demarcado nos cromatogramas, na região de metaloproteases P-III (Figura 3). Este pico pode ser responsável pelo aumento abrupto da atividade colagenolítica do veneno Bm2 e a baixa atividade do Bm3, observados no ensaio com azocoll. Esta relação já foi observada em um estudo realizado pelo nosso grupo recentemente, em que os venenos de *B. jararaca* que não continham este pico também apresentaram baixa atividade colagenolítica (GALIZIO *et al.*, 2018). Algumas metaloproteases P-III que poderiam estar associadas à esta atividade são a jararragina

(P30431), a acurragina (Q9W6M5) e a catrocolastatina, formada por VAP2A (A4PBQ9) e VAP2B (Q90282). Estas proteínas apresentaram diferenças quantitativas que coincidem com a atividade sobre azocoll e interação, de alguma forma, com o colágeno, degradando-o (acurragina) ou ligando-se a ele e impedindo-o de se ligar a outros receptores (jararragina e catrocolastatina) (LAING e MOURA-DA-SILVA, 2005; WANG e HUANG, 2002; ZHOU; SMITH; GROSSMAN, 1995).

Similarmente à atividade proteolítica, a atividade de LAAO dos venenos de serpentes mais velhas (Bm>4) foi maior tanto dos machos quanto das fêmeas. No entanto, Antunes e colaboradores (2010) registraram atividade mais intensa do veneno de *B. jararaca* neonatas. É importante ressaltar que a LAAO é uma enzima extremamente lábil, com alteração de atividade por influência de pH e temperatura, e pode sofrer proteólise por outras enzimas presentes no veneno (CURTI; MASSEY; ZMUDKA, 1968; MUNEKIYO e MACKESSY, 1991; TASHIMA *et al.*, 2012).

Quanto à atividade fosfolipásica, todos os venenos de machos apresentaram diferença estatística entre si, mas nota-se que os venenos Bm2 e Bm>4 têm menor atividade em relação aos venenos BmN, Bm<1 e Bm1, as menores idades. Uma atividade fosfolipásica mais intensa foi anteriormente registrada do veneno de serpentes *B. jararaca* neonatas (ANTUNES *et al.*, 2010). As PLA<sub>2</sub>s são proteínas que podem ou não ter atividade enzimática e suas ações são diversas: danos teciduais, miotoxicidade (local e sistêmica), inibidor e ativador de agregação plaquetária, anticoagulante, hemolítico, entre outros (KINI, 2003). Essa diversidade confere à esta família um extenso envolvimento nos casos de envenamento, agindo de diversas formas no organismo.

Algumas famílias de proteínas são, frequentemente, associadas à coagulopatia dos venenos, como serino proteases, PLA<sub>2</sub>s, CTLs, nucleotidasas e desintegrinas (BRAUD; BON; WISNER, 2000). Dentre os componentes que podem estar associados à procoagulação, destacam-se as trombina-símiles (serino proteases) e as CTLs, enquanto nucleotidasas e desintegrinas podem impedir a formação de coágulos, inibindo a agregação plaquetária. A abundância destas proteínas pode ter relação com os resultados obtidos para a DMC: o veneno de neonatos mais coagulantes do que o de adultos e o de machos mais coagulantes que o de fêmeas. Trombinas-símile e CTLs contabilizaram 14,52% e 12,86% do veneno BmN machos e fêmeas, respectivamente, e 12,19% e 9,74% do veneno Bm>4 machos e fêmea, respectivamente; já nucleotidasas e desintegrinas somaram 1,78% do veneno BmN fêmeas (machos não apresentaram nenhuma proteínas destas famílias por espectrometria de massas), e 0,09% e 0,23% no veneno Bm>4 machos e fêmeas, respectivamente. Todavia, cada proteína

possui características e efeitos próprios e interage com uma diversidade de outras proteínas e enzimas presentes no veneno, portanto a diferença quantitativa pode ser um indicativo, mas não deve ser o único parâmetro a ser considerado.

Apesar das diferenças observadas entre a composição e as atividades (Tabela 4), o veneno de neonatos se mostrou tão letal quanto o de adultos, corroborando com o resultado encontrado por Furtado e colaboradores (1991), em que a  $DL_{50}$  não apresentou diferença estatística, mas os camundongos injetados com o veneno Bm>4 morreram mais rapidamente. A letalidade do veneno de adultos e filhotes varia principalmente em espécies de hábitos alimentares generalistas, como *B. asper*, *B. atrox* e *B. jararaca* (ANTUNES *et al.*, 2010; SALDARRIAGA *et al.*, 2003). Contudo, também foram observadas diferenças ontogenéticas na letalidade do veneno de espécies especialistas, como *B. alternatus* e *B. cotiara* (FURTADO *et al.*, 1991).

Apesar de a composição ser diferente entre os grupos, as bandas de todos os venenos foram bem reconhecidas pelo soro antibotrópico e o título de anticorpos também foi similar entre os grupos. Já foi reportado que os venenos de fêmeas são mais reconhecidos por imunointeração do que de machos (AMORIM *et al.*, 2018) pelo método de *western blotting*, porém, neste trabalho, isso foi observado apenas nos grupos Bm1, Bm2 e Bm3. O veneno de neonatos de *B. jararaca* são menos antigênicos do que o de adultos (ANTUNES *et al.*, 2010), mas este estudo foi conduzido utilizando *pools* com venenos de machos e fêmeas misturados. Ainda assim, os títulos de anticorpos obtidos para cada veneno foram bastante similares.

Conhecendo a importância da variabilidade dos venenos e como isso afeta o conjunto geral de um *pool*, como demonstrado por outros estudos (GALIZIO *et al.*, 2018; MENEZES *et al.*, 2006; ZELANIS *et al.*, 2007), é necessário destacar que as serpentes de 3 anos de idade (grupo Bm3) apresentaram peculiaridades quanto à caracterização bioquímica e enzimática por serem de uma mesma ninhada em que havia apenas um macho e cinco fêmeas. Por exemplo, a atividade colagenolítica que, em geral, é maior no veneno de serpentes adultas, foi bem inferior à observada nos grupos Bm2 e Bm>4, assim como a ausência do pico de metaloprotease nos cromatogramas. Esta pode ser uma característica desta ninhada em particular. Estas observações salientam ainda mais a necessidade de estudos envolvendo a variabilidade intraespecífica dos venenos de serpentes, assim como uma abordagem dos venenos individuais (GALIZIO *et al.*, 2018; MENEZES *et al.*, 2006).

Vale lembrar que os animais utilizados neste estudo são mantidos em cativeiro e alimentados somente com camundongos e os filhotes nasceram de animais mantidos nestas condições e, ainda assim, apresentaram diferenças composicionais, enzimáticas e biológicas,

ressaltando a importância das variações ontogenéticas e entre sexos para uma melhor avaliação da eficácia do soro antibotrópico, mesmo considerando as variações intraespecíficas relatadas neste e em outros trabalhos.

## 6. Conclusão

A análise da composição e das atividades dos venenos evidenciaram diferenças importantes entre os grupos estudados. Divergências marcantes foram observadas quanto à idade e ao sexo das serpentes principalmente quanto às atividades proteolítica e coagulante. Apesar disso, não houve diferença significativa quanto à dose letal *per se*, mas, sim, quanto à rapidez com que o veneno age, indicando que o veneno dos adultos levou a óbito a presa mais rapidamente. Além disso, o soro antitoxico foi capaz de reconhecer todos os venenos de forma semelhante, o que pode indicar uma resposta eficiente no tratamento de acidentes envolvendo serpentes filhotes ou adultas, machos ou fêmeas.



## Referências bibliográficas

- AMORIM, F. B. *et al.* Proteopectidomic, functional and immunoreactivity characterization of *Bothrops moojeni* snake venom: Influence of snake gender on venom composition. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 177, 2018.
- ALAPE-GIRÓN, A. *et al.* Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations research articles. p. 3556-3571, 2008.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, v. 55, n. 2, p. 200-204, 1999.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S.; SANTOS, M. C. Is the venom related to diet and tail color during *Bothrops moojeni* ontogeny? **Journal of Herpetology**, v. 30, n. 2, p. 285-288, 1996.
- ANTUNES, C. T. *et al.* Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, p. 1443-1458, 2010.
- ARAUJO, H. S. S.; WHITE, S. P.; OWNBY, C. L. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins: A highly conserved class of proteins. **Toxicon**, v. 34, n. 11/12, p. 1237-1242, 1996.
- BAGCCHI, S. Experts call for snakebite to be re-established as a neglected tropical disease. **BMJ**, v. 351, 2015.
- BALDO, C. *et al.* BnPI, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwied* venom; Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 54-65, 2008.
- BRADFORD, M. M. Bradford, M. M. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.
- BERGER, M.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES J. A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 15, n. 4, p. 488-501, 2008.
- BRASIL. **Acidentes por animais peçonhentos.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 20 abr 2018.
- BRASIL. **Casos de acidentes por serpentes: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000 a 2016.** 2018.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-859, 2000.
- CALVETE, J. J. *et al.* Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomics and combinatorial peptide ligand library approaches. **Journal of Proteome**, v. 8, n. 6, p. 3055-3067, 2009.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1405-1414, 2007.
- CARDOSO, D.; YAMAGUCHI, I; MOURA-DA-SILVA, A. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**, p. 367-379, 2003.

- CARONE, S. E. I. *et al.* A new L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 25-35, 2017.
- CHEN, Z. M. *et al.* Jerdonuxin, a novel snake C-type lectin with platelet aggregation activity from *Trimeresurus jerdonii* venom. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 109-116, 2011.
- CHIJIWA, T. *et al.* Discovery of novel [Arg<sup>49</sup>]phospholipase A<sub>2</sub> isoenzymes from *Protobothrops elegans* venom and regional evolution of Crotalinae snake venom phospholipase A<sub>2</sub> isoenzymes in the southwestern islands of Japan and Taiwan. **Toxicon**, v. 48, n. 6, p. 672-682, 2006.
- CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 38, 2017.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.
- CURTI, B.; MASSEY, V.; ZMUDKA, M. Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 9, p. 2306-2314, 1968.
- DA SILVA, F. M. *et al.* Sexual dimorphism and ontogenetic changes of Amazonian pit vipers (*Bothrops atrox*). **Zoologischer Anzeiger**, v. 271, p. 15-25, 2017.
- DE MOURA, A. A. *et al.* Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- DENNIS, E. A. *et al.* Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. **FASEB**, p. 2068-2077, 1991.
- DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.
- FINNEY, D. J. Probit Analysis, 3 ed. **Ed. Cambridge University Press: Cambridge**, 1971.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005.
- FOX, D. J.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.
- FRANÇA, F. O. S.; MALAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Ed. Sarvier: São Paulo**, p. 72-86, 2003.
- FRANCO, F. L. Origem e Diversidade das Serpentes. In: Animais Peçonhentos no Brasil, 2 ed. **Ed. Sarvier: São Paulo**, p. 540, 2009.
- FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome Research**, v. 15, n. 3, p. 403-420, 2005.

- FUJII, Y. *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic studies of dimeric disintegrins from the venom of two *Agkistrodon* snakes. **Acta Crystallographica Section D**, v. 58, n. PT 1, 145-147, 2002.
- FUJIMURA, Y. *et al.* Isolation and characterization of *jararaca* GPIIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 74, n. 2, p. 743-750, 1995.
- FURTADO, M. F. *et al.* Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offsprings. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 219-226, 1991.
- FURTADO, M. F.; COLLETTI, G. M. D. D.; SILVA, W. D. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. **Memórias 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.
- GAY, C. *et al.* Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically importante pitviper in Northeastern Argentina. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 1, 2015.
- GHAZARYAN, N. A. *et al.* Phospholipases A<sub>2</sub> from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive forms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, n. 2, p. 463-468, 2015.
- GOMES, M. A. L.; ARAGÓN-ORTIZ, F. Purification and some properties of hemagglutinating protein mutina from bushmaster *Lachesis muta* snake venom. **Revista de Biología Tropical**, v. 34, n. 1, p. 49-53, 1986.
- GOMES, M. S. R. *et al.* Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 153, n. 3, p. 290-300, 2011.
- GUÉRCIO, R. A. P. *et al.* Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, v. 4, n. 11, 2006.
- GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. **Toxicon**, v. 29, n. 10, p. 1273-1277, 1991.
- GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958-975, 2009.
- GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.
- GUTIÉRREZ, J. M., *et al.* Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. **Toxicon**, v. 28, n. 4, p. 419-426, 1990.
- HANNA, S. L. *et al.* Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

- Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2495-2508, 2000.
- HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: A laboratory manual. **Ed. Cold Spring Harbor Laboratory: New York**, p. 471-510, 1988.
- HEATWOLE, H; DAVISON, E. A review of caudal luring in snakes with notes on its occurrence in the Saharan sand viper, *Cerastes vipera*. **Herpetologica**, v. 32, n. 3, p. 332-336, 1976.
- HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. Amino acid sequence of phospholipase A<sub>2</sub>-alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A<sub>2</sub> based upon structural determinants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 14, p. 4913-4921, 1977.
- 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.
- HOGUE-ANGELETTI, R. A.; BRADSHAW, R. A. Nerve growth factors in snake venoms. **Ed. Springer: Berlin, Heidelberg**, p. 276-294, 1979.
- HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 4, n. 10, p. 1149-1155, 1996.
- JIAO, H.-M. *et al.* Shedaoenase, a novel fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon shedaoenthesis* Zhao. **Acta Biochemica et Biophysica Sinica (Shanghai)**, v. 37, n. 12, p. 835-842, 2005.
- JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Intraspecific variation in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. **Toxicon**, v. 2, n. 3, p. 187-195, 1964.
- JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 327-338, 2004.
- KANG, T. S. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, n.23, p. 4544-4576, 2011.
- KAWASAKI, T. *et al.* Complete amino acid sequence and identification of the platelet glycoprotein Ib-binding site of jararaca GPIb-BP, a snake venom protein isolated from *Bothrops jararaca*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10635-10639, 1996.
- KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.
- KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. **Analytical Biochemistry**, v. 298, n. 1, p. 136-139, 2001.
- KONDO, H. *et al.* Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 13, p. 43-52, 1960.

- KOUYOUUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 2, p. 84-90, 1989.
- 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.
- LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 987-996, 2005.
- LEIVA, M. A. G.; ARAGÓN-ORTIZ, F. Purification and some properties of hemagglutinating protein mutina from bushmaster *Lachesis muta* snake venom. **Revista de Biologia Tropical**, v. 34, n. 1, 1986.
- LI, X. *et al.* Pupureotin: a novel di-dimeric C-type lectin-like protein from *Trimeresurus purpureomaculatus* venom is stabilized by noncovalent interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 1, p. 53-62, 2004.
- LI, Z.-Y.; YU, T.-F.; LIAN, E. C.-Y. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1349-1358, 1994.
- LOMONTE, B. *et al.* Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. **Toxicon**, v. 21, n. 3, p. 379-384, 1983.
- LÓPEZ-LOZANO, J. L., *et al.* Ontogenetic variation of metalloproteinases in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 997-1006, 2002.
- LU, Q. *et al.* Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors . Structure-function relationships and effects on haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1089-1098, 2005.
- LU, W. *et al.* Isolation and pharmacological characterization of a new cytotoxic L-amino aci oxidase from *Bungarus multicinctus* snake venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 311-320, 2018.
- MACKESSY, S. P.; TU, A. T. Biology of the sea snakes and biochemistry of their venoms. In: *Toxin-related Diseases: Poisons Originating from Plants, animals, and Spoilage*, A.T. Tu. **Ed. Oxford and IBH Publishing Co: New Delhi**. p. 305-351, 1993.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.
- MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. **Biology of the Vipers**, p. 307-328, 2002.
- MASSEY, V.; CURTI, B. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 6, p. 1259-1264, 1967.
- MATSUI, T. *et al.* Puification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, aa serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, n. 3, p. 569-575, 1998.
- MEBS, D. Toxicity in animals. Trends in evolution? **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 87-96, 2001.

- MEBS, D. Venom components with other important biological activities. In: Handbook of Toxinology, W.T.M. Shier, D. Ed. **Marcel Dekker Inc: New York**, p. 761-776, 1990.
- MEBS, D.; KORNALIK, F. Intraspecific variation in content of a basic toxin in Eastern diamondblack rattlesnake (*Crutalus adamanteus*) venom. **Toxicon**, v. 22, n. 5, p. 831-833, 1984.
- MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P. *Et al.* Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from *Bothrops atrox* snake venom. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)**, v. 43, n. 3, p. 181-192, 2011.
- 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.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica – Dados**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13712-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 10 jul 2018.
- MOISEEVA, N. *et al.* Structure of acostatin, a dimeric disintegrin from Southern copperhead (*Agkistrodon contortrix contortrix*), at 1.7 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D**, v. 64, n. PT 4, p. 466-470, 2008.
- MORISSETTE, J. *et al.* Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. **Biophysical Journal**, v. 68, n. 6, p. 2280-2288, 1995.
- MUNEKIYO, S. M.; MACKESSY, S. P. Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119B, n. 1, p. 119-127, 1998.
- MUSHINSKY, H. R. Foraging ecology, in: Snakes: Ecology and Evolutionary Biology, R. A. Siegel. **Ed. MacMillan: New York**, p. 1624-1629, 1987.
- NAKASHIMA, K. *et al.* Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipases A<sub>2</sub> isoenzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 13, p. 5964-5968, 1993.
- NICOLAU, C. A. *et al.* An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214-231, 2017.
- NIKAI, T. *et al.* Characterization and amino-terminal sequence of phospholipase A<sub>2</sub>-II from the venom of *Agkistrodon bilineatus* (common cantil). **International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 43-48, 1994.
- NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 4, p. 653-659, 2003.
- NOONAN, B. P.; CHIPPINDALE, P. T. Dispersal and vicariance: The complex evolutionary history of boid snakes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 2, p. 347-358, 2006.
- OGAWA, T. *et al.* Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 1-14, 2005.

- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R.; WHITE, S. P. Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Toxicon**, v. 35, n. 1, p. 111-124, 1997.
- PESSATTI, M. L. *et al.* Screening of *Bothrops* snake venoms for L-amino acid oxidase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 197-210, 1995.
- PETAN, T.; KRIŽAJ, I.; PUNGERČAR, J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue decreases its Ca<sup>2+</sup>-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. **Biochemistry**, v. 46, n. 44, p. 12795-12809, 2007.
- RAMIREZ, G.A.; FLETCHER-JUNIOR, P. L.; POSSANI, L. D. Characterization of the venom from *Crotalus molossus nigrescens* Gloyd (black tail rattlesnake): isolation of two proteases. **Toxicon**, v. 28, n. 3, p. 285-297, 1990.
- RAW, I., *et al.* Antivenoms in Brazil: preparation. In: Handbook of Natural Toxins, A.T.T. Tu. **Ed. Marcel Dekker Inc.: New York**, p. 557-581, 1991.
- REICHERT, E. *Bothrops jararacussu*. **Blätter für Aquarien- und Terrarien-Kunde**, v. 47, p. 228-231, 1936.
- REID, H. A.; THEAKSTON, R. D. G. Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snakes age. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, n. 5, p. 1053-1057, 1978.
- RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 6, p. 436-442, 1990.
- RICHARDS, D. P.; BARLOW, A.; WÜSTER, W. Venom lethality and diet: Differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (*Echis*). **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 110-116, 2012.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Venomous Animals and their venoms. W. Burcherl, E.E. Buckley, and V. Deulofeu. **Ed. Academic Press: New York**, p. 345-841, 1971.
- SALDARRIAGA, M. M. *et al.* Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, p. 405-411, 2003.
- SANTORO, M. L. *et al.* Ontogenetic variation in biological activities of venoms from hybrids between *B. erythromelas* and *B. neuwied* snakes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0145516, 2015.
- SANTOS-FILHO, N. A. **Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A<sub>2</sub> ácida toxica isolada da peçonha de *Bothrops moojeni***. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2009.

- SCARBOROUGH, R. M. *et al.* Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 2, p. 1068-1065, 1993.
- SERRANO, S. M. T. *et al.* A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501-510, 2005.
- SERRANO, S. M. T.; 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.
- SHEVCHENKO, A. *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.
- SOTO, J. G. *et al.* Molecular evolution of *PIII-SVMP* and *RDG disintegrin* genes from the genus *Crotalus*. **Gene**, v. 389, n. 1, p. 66-72, 2007.
- SOUSA, L. F. *et al.* Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 9, e2442, 2013.
- STOSCHECK, C. M.; M. P. DEUTSCHER. Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification. **Electrophoretic Methods**, v. 182, p. 425-488, 1990.
- SUNTRAVAT, M.; NUCHPRAYOON, I.; PÉREZ, J. C. Comparative study of anticoagulant and procoagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X). **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 544-553, 2010.
- TAI, H. *et al.* TMVA, a snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom, activates platelet via GPIIb. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 649-656, 2004.
- TAKEDA, S.; TAKEYA, H; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 1, 164-176, 2012.
- TASHIMA, A. K. *et al.* Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 11, p. 1245-1262, 2012.
- TEIXEIRA, C. F. P. *et al.* Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, p. 107-115, 2005.
- 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.
- THOMAS, R. G.; POUGH, F. H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon**, v. 17, n. 3, p. 221-228, 1979.



- TSAI, I.-H. *et al.* Geographic variations, cloning, and functional analysis of the venom acidic phospholipases A<sub>2</sub> of *Crotalus viridis viridis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 411, n. 2, p. 289-296, 2003.
- TSAI, I.-H. *et al.* Phospholipases A<sub>2</sub> from *Callosellasma rhodostoma* venom gland cloning and sequencing of 10 of the cDNAs, three-dimensional modelling and chemical modification of the major isozyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 22, p. 6684-6691, 2000.
- TSAI, I.-H. *et al.* Venom phospholipases A<sub>2</sub> of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): Molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Biochemical Journal**, v. 377, n. 1, p. 215-223, 2004.
- VILCA-QUISPE, A. *et al.* Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 745-753, 2010.
- VILLARROEL, M. S., *et al.* Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 42/43, p. 311-323, 1978/79.
- WANG, W.-J.; HUANG, T.-F. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Thrombosis and Hemostasis**, v. 84, n. 4, p. 641-650, 2002.
- WANG, Y.-M.; PENG, H.-F.; TSAI, I.-H. Unusual venom phospholipases A<sub>2</sub> of two primitive tree vipers *Trimeresurus puniceus* and *Trimeresurus borneensis*. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 12, p. 3015-3025, 2005.
- WIJEYEWICKREMA, L. C. *et al.* Nerve growth factor inhibits metalloproteinase-disintegrins and blocks ectodomain shedding of platelet glycoprotein VI. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 16, p. 11793-11799, 2010.
- WITTCOFF, H. The phosphatides. **Ed. Reinhold Publishing Corporation: New York**, p. 99-115, 1951.
- YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. **Molecular Diversity**, v. 10, n. 4, p. 515-527, 2006.
- YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cystein-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 227-231, 2004.
- YOSHIZUMI, K. *et al.* Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49-phospholipase A<sub>2</sub> with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). **Toxicon**, v. 28, n. 1, p. 43-54, 1990.
- ZELANIS, A. *et al.* Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: an ontogenetic approach. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, n. 145, p. 601-609, 2007.
- ZELANIS, A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; FURTADO, M. F. D. Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, n. 1, p. 43-50, 2008.

- ZELANS, A. *et al.* Analysis of the ontogenetic variation in the proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2278-2291, 2009.
- ZELLER, E. A. Enzymes of snake venoms and their biological significance. **Advances in Enzymology**, v. 83, p. 459, 1948.
- ZHANG, Y.-J. *et al.* Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochemical and Biophysical Reserach Communcations**, v. 309, n. 3, p. 598-604, 2003.
- ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C.; SMITH, J. B. The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. **Biochemical and Biophysical Reaserch Communications**, v. 219, n. 3, p. 720-726, 1996.
- ZHOU, Q.; SMITH, J. B.; GROSSMAN, M. H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochemical Journal**, v. 307, n. 2, p. 411-417, 1995.

## Apêndice

**Apêndice 1.** Proteínas encontradas por espectrometria de massas nos venenos de machos em diferentes idades. CRISP: proteína secretada rica em cisteína; CTL: lectina tipo C; DIS: desintegrina; GPC: peptídeo glutamyl ciclotranferase; KT: inibidor de serino proteases do tipo Kunitz; LAAO: L-amino ácido oxidase; NT: 5'-nucleotidase; PDE: fosfodiesterase; SVMP P-I: metaloprotease do tipo P-I; SVMP P-II: metaloprotease do tipo P-II; SVMP P-III: metaloprotease do tipo P-III; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; SVSP: serino protease; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; VNGF: fator de crescimento neural. Proteínas destacadas em negrito são exclusivas de uma idade; proteínas destacadas em azul são exclusivas de machos.

Descrição	Organismo	Família	Protein entry	Massa (Da)	Nº de peptídeos	Cobertura (%)	BmN	Bm<1	Bm1	Bm2	Bm3	Bm>4
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Bothrops asper</i>	P-II SVMP	Q072L5	54818,86	74	98,95	8296	80716	59268	39940	9642	-
Zinc metalloproteinase/disintegrin VMP-II	<i>Crotalus viridis viridis</i>	P-II SVMP	C9E1R9	55068,19	43	69,67	-	18502	12978	50864	13893	15028
Basic phospholipase A2 homolog 2	<i>Bothrops moojeni</i>	K49 PLA2	Q9I834	14685,51	48	100,00	667251	875046	754936	1174742	875876	834933
Zinc metalloproteinase/disintegrin (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-II SVMP	P31989	18581,26	28	98,14	-	148217	-	252522	53309	59149
Cysteine-rich venom protein ablomin	<i>Gloydus blomhofii</i>	CRISP	Q8JI40	27826,80	41	100,00	28379	74784	30957	64869	163435	125230
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BjussuMP-1 (Fragment)	<i>Bothrops jararacussu</i>	P-III SVMP	Q1PHZ4	63923,76	101	97,07	45242	625776	298921	188338	259712	203719
Cysteine-rich venom protein	<i>Protobothrops jerdonii</i>	CRISP	Q7ZZN9	27777,79	38	87,92	18467	112284	90346	108457	120391	21948
Cysteine-rich venom protein	<i>Vipera berus</i>	CRISP	B7FDI1	27421,44	42	87,87	21223	50809	5365	17832	20470	23064
Cysteine-rich venom protein catrin	<i>Crotalus atrox</i>	CRISP	Q7ZT99	27558,99	41	97,50	8127	9505	1850	39132	54445	8900
Cysteine-rich venom protein triflin	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	CRISP	Q8JI39	27664,76	50	87,92	61950	116420	12687	18788	52356	32349
Cysteine-rich venom protein piscivorin	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	CRISP	Q7ZTA0	27593,99	42	83,75	37325	24348	16465	45546	9112	10080
Disintegrin batroxostatin	<i>Bothrops atrox</i>	P-II SVMP	P18618	8419,94	12	100,00	-	12897	310158	301734	14198	25822
Cysteine-rich venom protein	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	CRISP	P79845	27600,58	28	50,42	-	55737	21272	43996	151872	134276

Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Bothrops jararaca</i>	P-II SVMP	Q98SP2	54752,21	109	100,00	80099	330014	134878	197897	89739	62057
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Gloydius brevicaudus</i>	P-II SVMP	Q9PVK9	54607,45	71	93,15	20773	351073	184487	169744	47108	165493
Zinc metalloproteinase/disintegrin PMMP-2	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	P-II SVMP	E9NW27	55667,31	79	97,73	-	523405	711141	318597	34148	64698
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	P-II SVMP	O57413	55489,90	85	97,92	-	44251	164980	90690	82623	150278
Disintegrin DisBa-01	<i>Bothrops alternatus</i>	P-II SVMP	Q801Z4	8920,57	14	100,00	-	52283	11520	3993	14889	9510
Disintegrin sasaimin	<i>Cerrophidion sasai</i>	P-II SVMP	C0HJM5	8298,82	8	94,44	-	25040	-	-	26900	64653
Helicopsin (Fragments)	<i>Helicops angulatus</i>	CRISP	P0DJG8	2619,94	6	100,00	12476	30395	18929	23250	20213	11977
Snake venom metalloproteinase BnP1 (Fragments)	<i>Bothrops pauloensis</i>	P-I SVMP	P0C6S0	9685,13	15	100,00	-	12119	-	4223	4643	-
Cysteine-rich venom protein LIO1 (Fragment)	<i>Erythrolamprus poecilogyrus</i>	CRISP	Q2XXQ0	27383,25	28	100,00	35648	1303	16147	13671	21466	13343
Cysteine-rich venom protein	<i>Echis coloratus</i>	CRISP	P0DMT4	25611,34	35	100,00	9894	11814	15748	20564	37924	9359
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Bothrops insularis</i>	P-II SVMP	Q5XUW8	54567,67	105	87,82	-	70769	75656	50837	18215	20923
Snake venom metalloproteinase BnP2 (Fragments)	<i>Bothrops pauloensis</i>	P-I SVMP	P0C6S1	8008,07	21	92,75	12083	51855	104085	27390	118078	162306
Snake venom metalloproteinase leucurolysin-A	<i>Bothrops leucurus</i>	P-I SVMP	P84907	23361,50	61	100,00	36738	93356	120989	161489	176438	53172
Basic phospholipase A2 homolog BaTX	<i>Bothrops alternatus</i>	K49 PLA2	P86453	14695,50	44	100,00	29042	9597	22925	46540	78083	21936
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like jararhagin (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	P30431	66150,04	77	76,71	-	40525	18285	131482	30415	573393
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BITM06A	<i>Bothrops insularis</i>	P-III SVMP	Q8QG88	70508,26	89	86,89	19969	97638	36263	211780	25065	290007
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothropasin	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	O93523	70437,19	83	84,43	19969	-	36263	-	25065	-
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like batroxstatin-1	<i>Bothrops atrox</i>	P-III SVMP	C5H5D2	48310,15	56	98,11	765558	1140769	517519	692609	180812	455552
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VAP2A	<i>Crotalus atrox</i>	P-III SVMP	A4PBQ9	70201,82	73	74,46	-	-	13044	40999	-	122836
<b>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VAP2B</b>	<b><i>Crotalus atrox</i></b>	<b>P-III SVMP</b>	<b>Q90282</b>	<b>70472,21</b>	<b>52</b>	<b>51,56</b>	<b>-</b>	<b>3302</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Zinc metalloproteinase-disintegrin-like	<i>Crotalus durissus durissus</i>	P-III SVMP	Q2QA02	70515,28	63	64,70	-	173863	131633	558017	4862	125413
Basic phospholipase A2 homolog M1-3-3	<i>Bothrops asper</i>	K49 PLA2	Q9PVE3	16357,73	49	100,00	860419	1140576	796052	798619	995401	1126294
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like acurhagin	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	P-III SVMP	Q9W6M5	70766,71	76	71,64	76516	42920	9661	254248	57180	239005
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like catroriarin (Fragment)	<i>Crotalus atrox</i>	P-III SVMP	A2CJE4	20694,11	24	75,43	-	44977	214553	334433	-	256421
Snake venom metalloproteinase BmooMPalpha-I	<i>Bothrops asper</i>	P-I SVMP	P85314	23621,54	45	98,05	205175	27333	630670	514233	438676	648435
Basic phospholipase A2 myotoxin III	<i>Bothrops jararaca</i>	D49 PLA2	P20474	16549,88	35	100,00	35764	329262	541534	775189	240059	730842
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-4 (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q0NZX7	11443,31	6	59,79	-	111100	20753	-	1637	-
Snake venom metalloproteinase BpMP-1 (Fragments)	<i>Bothrops pauloensis</i>	P-I SVMP	C0HJU2	19769,20	26	60,57	-	7805	3005	29894	2907	4403
Basic phospholipase A2 homolog	<i>Agkistrodon piscivorus conanti</i>	K49 PLA2	C0HKC1	14759,61	20	76,03	-	54118	20972	76642	-	6993
Snake venom metalloproteinase BpirMP (Fragment)	<i>Bothrops pirajai</i>	P-I SVMP	P0DL29	20367,13	32	68,69	-	-	-	24854	155394	7292
Snake venom metalloproteinase neuwiedase (Fragment)	<i>Bothrops pauloensis</i>	P-I SVMP	Q9I9R4	22809,65	46	100,00	18860	24216	68770	55163	16510	69363
Snake venom metalloproteinase BjussuMP-2 (Fragment)	<i>Bothrops jararacussu</i>	P-I SVMP	Q7T1T4	42470,33	64	90,24	50228	25345	67692	38759	325923	38899
Snake venom metalloproteinase BaP1	<i>Bothrops asper</i>	P-I SVMP	P83512	46505,98	66	97,06	51586	53897	71379	278483	61421	25016
Thrombin-like enzyme leucurobin	<i>Bothrops leucurus</i>	SVSP	P0DJ86	25107,39	39	93,51	139686	300116	150021	570925	-	798311
Thrombin-like enzyme batroxobin	<i>Bothrops atrox</i>	SVSP	P04971	28872,95	33	97,25	29085	1059664	629429	789221	-	-
Venom plasminogen activator	<i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>	SVSP	E5L0E5	28762,35	30	74,42	28566	181630	219363	118919	31121	20865
Snake venom serine proteinase 12	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	J3RY93	29411,40	42	91,54	781273	68626	45326	55852	329454	555489
Snake venom serine proteinase 4a	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	J3SDX0	29607,58	40	100,00	26343	196386	308661	325432	14729	54448
Acidic phospholipase A2 DE-I	<i>Ovophis okinavensis</i>	D49 PLA2	P00625	16382,21	26	100,00	206939	289424	179475	120334	4950	1774
<b>Zinc metalloproteinase/disintegrin</b>	<b><i>Agkistrodon contortrix contortrix</i></b>	<b>P-II SVMP</b>	<b>Q805F6</b>	<b>55166,31</b>	<b>26</b>	<b>46,38</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>7132</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Basic phospholipase A2 bothropstoxin-2	<i>Bothrops jararacussu</i>	D49 PLA2	P45881	16563,78	28	99,28	-	314157	6369	172677	54711	29139
Basic phospholipase A2	<i>Bothrops leucurus</i>	D49 PLA2	P86974	14509,18	22	97,54	-	-	-	30949	1821	29139
Thrombin-like enzyme calobin-1	<i>Gloydius ussuriensis</i>	SVSP	Q91053	29592,48	42	98,09	335536	433521	456150	483729	85873	308364
Phospholipase A2 homolog 1	<i>Bothrops atrox</i>	K49 PLA2	Q6JK69	16381,68	44	96,38	-	34852	-	753603	5479	-
Acidic phospholipase A2 A'	<i>Gloydius halys</i>	D49 PLA2	O42192	14464,80	23	100,00	41549	57963	111508	105039	141070	291074
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-1 (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q0NZY0	19319,87	17	100,00	462425	431315	85070	134955	73601	84814
Acidic phospholipase A2	<i>Gloydius blomhoffii</i>	D49 PLA2	P20249	14462,71	20	100,00	-	26853	15140	95369	-	-
Acidic phospholipase A2 BpirPLA2-I	<i>Bothrops pirajai</i>	D49 PLA2	C9DPL5	14434,72	26	100,00	-	29653	-	220216	19204	44332
L-amino-acid oxidase (Fragment)	<i>Bothrops moojeni</i>	LAAO	Q6TGQ8	54892,89	105	88,91	15160	7080	7893	6770	1996	1697
L-amino-acid oxidase (Fragment)	<i>Bothrops jararacussu</i>	LAAO	Q6TGQ9	56630,92	119	88,73	6249	170455	105569	35822	17860	4598
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like HF3	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q98UF9	69862,46	64	83,33	-	88075	74225	120198	80932	203202
Acidic phospholipase A2 3	<i>Trimeresurus gramineus</i>	D49 PLA2	P81480	14523,72	29	93,44	5232	105892	23444	96265	149083	2512
Acidic phospholipase A2	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	D49 PLA2	Q7SID6	14830,10	20	100,00	-	145668	70826	68891	1811	174321
Acidic phospholipase A2 1	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	D49 PLA2	Q91506	14413,73	26	93,44	14867	79779	32777	75473	1445	-
Acidic phospholipase A2 Cvv-E6a	<i>Crotalus viridis viridis</i>	D49 PLA2	Q800C4	16031,82	12	95,65	-	14302	48824	26530	2789	1996
Acidic phospholipase A2 Tpu-E6c (Fragments)	<i>Trimeresurus puniceus</i>	D49 PLA2	P0DJP4	14606,83	23	86,89	3896	24521	32011	14635	10859	-
Acidic phospholipase A2 A	<i>Gloydius halys</i>	D49 PLA2	O42191	14725,09	12	81,45	7330	-	4301	57494	13006	23156
Acidic phospholipase A2 BA2	<i>Gloydius halys</i>	D49 PLA2	O42190	14600,00	16	77,42	827	11670	10494	12870	-	-
Acidic phospholipase A2 4	<i>Trimeresurus gramineus</i>	D49 PLA2	P81479	14590,76	23	76,23	-	-	-	32059	149083	-
Acidic phospholipase A2	<i>Gloydius halys</i>	D49 PLA2	P14418	14772,19	14	84,68	-	7010	1975	2998	3369	-

Acidic phospholipase A2 CM-II	<i>Bitis nasicornis</i>	D49 PLA2	P00621	14349,59	22	100,00	3199	7787	12899	4998	18868	10971
Basic phospholipase A2 Ts-G6D49	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	D49 PLA2	Q6H3C5	14617,08	19	99,18	6814	15055	33090	22218	-	-
Acidic phospholipase A2 6	<i>Trimeresurus gramineus</i>	D49 PLA2	P70088	16521,15	36	88,41	18072	84323	26902	66009	4674	16106
Acidic phospholipase A2	<i>Bitis gabonica</i>	D49 PLA2	P00620	14060,18	13	88,14	-	7769	-	13808	-	-
Acidic phospholipase A2 pgPLA 1b/pgPLA 2b	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	D49 PLA2	Q92147	16506,27	23	75,36	10784	72951	188863	142840	5249	-
Acidic phospholipase A2 jerdoxin	<i>Protobothrops jerdonii</i>	D49 PLA2	Q8JIY9	16437,33	34	100,00	5373	230432	163601	115293	27525	95349
Acidic phospholipase A2 BthA-1	<i>Bothrops jararacussu</i>	D49 PLA2	Q8AXY1	16254,06	27	97,10	-	99313	235876	156096	5675	-
Basic phospholipase A2 APC-D49	<i>Agkistrodon piscivorus conanti</i>	D49 PLA2	C0HKC4	14787,47	28	97,56	-	110924	115267	135916	17650	8240
Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBb	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	D49 PLA2	P0CG56	14965,65	18	85,25	63298	-	17690	6400	41625	95318
Phospholipase A2 crotoxin basic chain CBa2	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	D49 PLA2	P24027	16766,92	25	100,00	26977	20763	29539	8794	30110	32510
Acidic phospholipase A2 beta	<i>Crotalus adamanteus</i>	D49 PLA2	P00623	16230,98	11	99,28	-	-	-	-	67127	5231
Acidic phospholipase A2 Tpu-E6b	<i>Trimeresurus puniceus</i>	D49 PLA2	Q2YHJ5	14740,94	44	100,00	6020	60494	42777	9087	20579	4293
Acidic phospholipase A2 Cvv-E6b	<i>Crotalus viridis viridis</i>	D49 PLA2	Q7ZTA6	16238,10	17	94,93	-	14698	1870	7238	5877	2915
<b>Acidic phospholipase A2 Ts-A6</b>	<b><i>Trimeresurus stejnegeri</i></b>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q6H3C8</b>	<b>16505,15</b>	<b>18</b>	<b>86,23</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>10266</b>	<b>-</b>
Acidic phospholipase A2	<i>Lachesis stenophrys</i>	D49 PLA2	P84651	14699,98	16	100,00	1899	90877	-	-	868	-
Basic phospholipase A2 caudoxin	<i>Bitis caudalis</i>	D49 PLA2	P00622	14161,80	30	100,00	-	246439	410017	299560	-	-
Basic phospholipase A2 sistruxin B	<i>Sistrurus tergeminus</i>	D49 PLA2	Q6EER2	16642,73	23	100,00	41170	102837	79535	14874	4306	13660
Acidic phospholipase A2 Ts-A3	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	D49 PLA2	Q6H3C9	16346,27	25	100,00	3900	-	3545	2891	10458	19157
Acidic phospholipase A2 Tgc-E6	<i>Trimeresurus gracilis</i>	D49 PLA2	A8E2V8	16487,37	45	100,00	8983	17605	38592	11641	11947	199285
Acidic phospholipase A2	<i>Bothrops pictus</i>	D49 PLA2	Q9I8F8	14530,73	12	85,25	-	4649	-	7899	19081	8424

Acidic phospholipase A2 1	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	D49 PLA2	P06859	16333,15	25	100,00	-	756989	152282	19280	-	-
<b>Acidic phospholipase A2 PePLA2</b>	<b><i>Protobothrops elegans</i></b>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q2PG83</b>	<b>16167,03</b>	<b>15</b>	<b>92,03</b>	<b>-</b>	<b>25966</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Acidic phospholipase A2 2	<i>Bothrops asper</i>	D49 PLA2	P86389	14992,44	23	92,74	737	35760	14184	5519	-	-
Acidic phospholipase A2 BlatPLA2	<i>Bothriechis lateralis</i>	D49 PLA2	C0HJC1	14689,07	14	100,00	9325	37865	3757	3077	839	23580
Acidic phospholipase A2 Tpu-E6a	<i>Trimeresurus puniceus</i>	D49 PLA2	Q2YHJ6	16318,18	14	88,41	-	22016	-	967	2406	9759
Acidic phospholipase A2 Tbo-E6	<i>Trimeresurus borneensis</i>	D49 PLA2	Q2YHJ3	16302,18	22	88,41	-	17881	29747	11160	-	-
Basic phospholipase A2 10	<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	D49 PLA2	P86806	15027,76	21	96,72	-	-	2480	-	2997	2357
Basic phospholipase A2 Mtx-b	<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	D49 PLA2	P62023	16705,88	19	92,75	3106	150415	8910	131289	-	2262
Basic phospholipase A2 F15	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	D49 PLA2	POCAS5	15278,16	14	67,21	63692	-	2341	-	-	99235
Basic phospholipase A2 9	<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	D49 PLA2	P86805	14974,65	26	100,00	-	7918	14328	26340	126554	-
Acidic phospholipase A2	<i>Bothrops jararaca</i>	D49 PLA2	P81243	15102,36	31	100,00	-	19052	38000	10568	-	-
Acidic phospholipase A2 BmooPLA2	<i>Bothrops moojeni</i>	D49 PLA2	G3DT18	16478,13	16	98,55	1883	19146	7042	5827	-	-
Acidic phospholipase A2 BITP01A	<i>Bothrops insularis</i>	D49 PLA2	Q8QG87	16557,38	30	86,96	-	44148	50988	21714	4531	5468
Acidic phospholipase A2 BE-I-PLA2	<i>Bothrops erythromelas</i>	D49 PLA2	Q2HZ28	16233,83	22	97,10	1308	1398	4392	4289	-	-
Basic phospholipase A2 trimicrotoxin	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	D49 PLA2	Q90W39	16466,75	20	97,83	-	63472	109894	47663	-	1903
Acidic phospholipase A2 Ts-A4	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	D49 PLA2	Q6H3C7	16469,32	12	63,31	4877	9134	13248	6287	7966	-
Acidic phospholipase A2 2	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	D49 PLA2	Q9I968	16537,45	36	100,00	10853	161438	175242	29967	374461	86545
Acidic phospholipase A2 S1E6-a (Fragment)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	D49 PLA2	Q9PVF1	15168,60	15	100,00	-	28149	1446	-	5674	18368
Acidic phospholipase A2 Cvv-E6f	<i>Crotalus viridis viridis</i>	D49 PLA2	Q800C3	16440,30	23	100,00	-	220568	331598	190898	54724	37083
Basic phospholipase A2 Tbo-G6D49	<i>Trimeresurus borneensis</i>	D49 PLA2	Q2YHJ2	16540,59	29	94,20	9535	20655	27373	31688	216037	18168



Acidic phospholipase A2 CH-E6'	<i>Crotalus horridus</i>	D49 PLA2	D6MKR0	16307,08	19	99,28	148268	379144	177789	256146	-	26893
Basic phospholipase A2 PLA-B'	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	D49 PLA2	Q8JIG0	16501,62	20	98,55	4809	55948	6557	-	38810	16030
Acidic phospholipase A2 H1E6	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	D49 PLA2	Q9PVF2	16484,29	8	63,31	4877	-	-	-	-	4017
Acidic phospholipase A2 BpPLA2-TXI	<i>Bothrops pauloensis</i>	D49 PLA2	D0UGJ0	16078,96	17	100,00	388	3789	10791	3712	-	-
Acidic phospholipase A2 2	<i>Trimeresurus gramineus</i>	D49 PLA2	P81478	14591,74	10	56,56	-	-	3813	-	3067	1761
Acidic phospholipase A2 SpII RP4	<i>Bothrops alternatus</i>	D49 PLA2	P86456	14541,01	14	100,00	12244	31108	19865	30512	-	-
Acidic phospholipase A2 S1E6-b (Fragment)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	D49 PLA2	Q9PVF0	15150,56	15	100,00	-	20729	13710	17605	4578	18368
Phospholipase A2 (Fragment)	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	D49 PLA2	B3EWP6	7138,93	4	56,67	-	52129	-	47193	2696	-
Acidic phospholipase A2 5	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	D49 PLA2	P82896	14678,02	14	100,00	1498	50755	25587	30004	-	-
Phospholipase A2 3 (Fragments)	<i>Bothrops diporus</i>	D49 PLA2	C0HJP9	5713,39	10	100,00	-	-	2511	127839	6017	-
L-amino-acid oxidase (Fragment)	<i>Bothrops pauloensis</i>	LAAO	B5AR80	57198,74	106	100,00	64671	112005	75660	83666	19715	125807
Basic phospholipase A2 homolog 4a	<i>Bothrops asper</i>	K49 PLA2	P0C616	16486,80	31	99,27	-	232901	364999	333815	-	-
L-amino acid oxidase (Fragment)	<i>Bothrops pictus</i>	LAAO	X2L4E2	56747,89	101	89,56	509449	384474	360284	438658	619166	709233
<b>L-amino-acid oxidase</b>	<b><i>Crotalus adamanteus</i></b>	<b>LAAO</b>	<b>O93364</b>	<b>59061,76</b>	<b>109</b>	<b>99,22</b>	<b>2995</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	P81824	26426,18	31	86,92	28467	162679	439416	397603	478490	453423
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like brevilysin H6	<i>Gloydus brevicaudus</i>	P-III SVMP	P0C7B0	70441,96	57	72,62	47404	333292	42123	303153	193193	348628
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-2 (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q0NZX9	25939,93	25	80,73	99484	113025	185277	394435	50241	110285
Snaclec alboaggregin-A subunit beta'	<i>Trimeresurus albolabris</i>	CTL	P81114	14543,72	7	50,41	54736	175259	399192	197417	-	-
Snaclec aspercetin subunit beta (Fragment)	<i>Bothrops asper</i>	CTL	P0DJC9	7335,04	9	100,00	44109	477638	84269	115849	27092	210419
Snaclec CHH-B subunit beta	<i>Crotalus horridus</i>	CTL	P81509	14287,68	20	100,00	889828	125830	152543	64341	374532	59249

Snake venom serine protease HS114	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	Q5W959	28527,14	40	80,62	636680	1312517	977368	746455	687718	741405
Zinc metalloproteinase leucurolysin-B (Fragment)	<i>Bothrops leucurus</i>	P-III SVMP	P86092	38143,88	49	97,84	230935	379282	100377	504939	192731	163306
Thrombin-like enzyme asperase	<i>Bothrops asper</i>	SVSP	Q072L6	28703,23	34	84,94	120089	746438	550342	747836	526365	231814
Phospholipase A2 homolog	<i>Echis coloratus</i>	S49 PLA2	P0DMT3	14504,22	10	80,17	-	187475	1530	159352	-	-
Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin	<i>Protobothrops jerdonii</i>	P-II SVMP	P83912	55982,19	84	92,77	199150	818745	365349	807976	106202	166671
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like EoVMP2	<i>Echis ocellatus</i>	P-III SVMP	Q2UXQ5	71650,55	60	86,30	394654	462381	629971	232420	329949	196098
Disintegrin-like leberagin-C	<i>Macrovipera lebetina transmediterranea</i>	P-III SVMP	C0LZJ5	24231,26	22	74,15	148645	267146	133255	229699	291964	167906
Basic phospholipase A2 Bs-N6	<i>Bothriechis schlegelii</i>	D49 PLA2	Q6EER4	16335,43	23	100,00	16539	81223	72574	35842	22369	55025
Basic phospholipase A2 Ceg-N6	<i>Cerrophidion godmani</i>	D49 PLA2	Q6EER5	14824,62	18	57,38	14080	6771	22178	16676	3961	97766
Basic phospholipase A2 homolog bothropstoxin-1	<i>Bothrops jararacussu</i>	K49 PLA2	Q90249	16295,66	48	97,08	9168	84963	23574	39414	11236	-
L-amino-acid oxidase	<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	LAAO	B0VXW0	58968,43	100	98,64	17248	22525	40774	20451	-	7826
Basic phospholipase A2 homolog Pgo-K49	<i>Cerrophidion godmani</i>	K49 PLA2	Q8UVU7	16313,57	19	78,10	-	-	4483	29510	-	2305
Snake venom serine protease homolog	<i>Bothrops jararacussu</i>	SVSP	Q7T229	29338,42	34	98,08	-	126222	317559	175102	-	-
Snake venom metalloproteinase atroxlysin-1	<i>Bothrops atrox</i>	P-I SVMP	P85420	23317,34	25	92,08	4285	4635	-	306413	1854	334913
Thrombin-like enzyme bothrombin	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	P81661	26268,74	28	100,00	-	92437	323410	505405	20001	138198
L-amino-acid oxidase	<i>Crotalus adamanteus</i>	LAAO	F8S0Z5	59166,09	110	98,64	16738	59934	323599	60173	144952	124381
L-amino acid oxidase Lm29	<i>Lachesis muta</i>	LAAO	J7H670	58931,49	96	100,00	225892	223427	189563	59258	4792	72421
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-3 (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q0NZX8	23062,87	21	72,45	432940	603395	154058	123867	31155	19546
<b>Snaclec GPIB-binding protein subunit beta</b>	<b><i>Bothrops jararaca</i></b>	<b>CTL</b>	<b>Q9PSM5</b>	<b>14697,09</b>	<b>6</b>	<b>47,15</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>227530</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Snake venom serine protease HS112	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	Q5W960	28672,76	20	89,02	361212	406489	209127	331114	412110	113600

Snake venom serine protease pictobin (Fragment)	<i>Bothrops pictus</i>	SVSP	U5YCR8	28467,23	27	100,00	24129	82678	35048	42858	-	107773
Basic phospholipase A2 homolog MT1	<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	K49 PLA2	P49121	16573,88	19	77,37	-	54118	20972	-	-	2095
Basic phospholipase A2 homolog 1	<i>Bothrops moojeni</i>	K49 PLA2	P82114	14536,36	37	100,00	39844	40649	182139	676634	300135	296727
Basic phospholipase A2 homolog BmatTX-I (Fragment)	<i>Bothrops matogrossensis</i>	K49 PLA2	P0DMJ9	5854,56	10	100,00	12921	10261	42354	-	28793	15404
Phospholipase A2 homolog	<i>Echis carinatus sochureki</i>	S49 PLA2	P0DMT2	14663,30	13	79,51	-	240032	10638	-	11044	14526
Thrombin-like enzyme bhalternin	<i>Bothrops alternatus</i>	SVSP	P0CG03	28672,50	18	79,62	-	29239	80926	261971	-	116153
Zinc metalloproteinase barnettlysin-1	<i>Bothrops barnetti</i>	P-I SVMMP	P86976	21322,16	14	55,94	13885	7763	6793	16173	3596	35260
L-amino-acid oxidase (Fragments)	<i>Bothrops atrox</i>	LAAO	P0CC17	13700,22	26	100,00	166767	12689	29100	141121	467941	283430
Snake venom metalloproteinase HT-1 (Fragment)	<i>Crotalus ruber ruber</i>	P-III SVMMP	Q9PSN7	25197,81	9	51,85	-	35869	31887	35367	-	-
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like Eoc1	<i>Echis ocellatus</i>	P-III SVMMP	Q2UXR0	70918,30	19	43,16	-	185726	55804	262354	-	-
Basic phospholipase A2 homolog	<i>Cerrophidion godmani</i>	K49 PLA2	P81165	14512,29	14	66,94	-	9559	2295	10526	-	-
L-amino-acid oxidase	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	LAAO	P0DI84	55090,00	83	88,64	-	385308	297139	253646	412804	-
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like 3a	<i>Crotalus adamanteus</i>	P-III SVMMP	J3S830	70950,42	20	41,48	-	83874	42095	48505	-	-
Venom plasminogen activator LV-PA	<i>Lachesis muta muta</i>	SVSP	Q27J47	28746,44	17	84,88	-	8528	266920	241075	83761	163727
Snake venom metalloproteinase basparin-A (Fragments)	<i>Bothrops asper</i>	P-III SVMMP	P84035	7010,05	4	69,84	-	16938	34385	13019	-	-
Basic phospholipase A2 homolog Cax-K49	<i>Crotalus atrox</i>	K49 PLA2	Q8UVZ7	16395,81	15	64,96	-	13775	21303	10589	-	-
L-amino acid oxidase Bs29 (Fragment)	<i>Bothriechis schlegelii</i>	LAAO	A0A024BTN9	56775,56	58	85,94	-	179157	97133	38068	-	-
Basic phospholipase A2 homolog	<i>Cerastes cerastes</i>	K49 PLA2	P82950	14510,19	14	80,99	-	4001	10592	5786	-	-
L-amino acid oxidase	<i>Cerastes cerastes</i>	LAAO	X2JCV5	58841,75	62	92,05	-	66316	114839	32574	-	-
L-amino-acid oxidase	<i>Demansia vestigiata</i>	LAAO	A6MFL0	59262,33	48	76,40	50053	349713	89504	130669	8250	-

L-amino-acid oxidase (Fragments)	<i>Macrovipera lebetina</i>	LAAO	P81375	12548,85	13	100,00	5401	130258	41625	7785	12019	17837
<b>Basic phospholipase A2 2 (Fragment)</b>	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q9PSF9</b>	<b>4325,90</b>	<b>4</b>	<b>76,92</b>	-	-	-	<b>12557</b>	-	-
Snaclec bothroinsularin subunit alpha	<i>Bothrops insularis</i>	CTL	P0C929	15608,25	6	80,30	-	26840	-	52213	-	-
L-amino-acid oxidase	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	LAAO	P81382	58620,22	71	99,61	-	74547	56677	59543	-	-
Basic phospholipase A2 homolog Tpu-K49a	<i>Trimeresurus puniceus</i>	K49 PLA2	Q2YHJ9	16692,32	7	38,41	-	14474	6606	16019	-	-
<b>Basic phospholipase A2 homolog Tbo-K49</b>	<i>Trimeresurus borneensis</i>	<b>K49 PLA2</b>	<b>Q2YHJ4</b>	<b>16501,98</b>	<b>7</b>	<b>50,00</b>	-	-	-	<b>6657</b>	-	-
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	<i>Bothrops jararaca</i>	GPC	Q9YIB5	42489,45	53	88,04	70974	90493	10094	73788	89883	36876
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	<i>Boiga dendrophila</i>	GPC	A7ISW2	42218,09	49	89,13	92922	113450	125337	152539	15770	-
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	<i>Gloydius blomhoffii</i>	GPC	Q90YA8	42552,50	41	70,65	-	3729	5355	28237	3363	-
Basic phospholipase A2 BmTX-I	<i>Bothrops moojeni</i>	D49 PLA2	P0C8M1	14879,68	15	95,04	27044	214221	75100	73365	50725	44807
<b>Basic phospholipase A2 Cvv-N6</b>	<i>Crotalus viridis viridis</i>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q71QE8</b>	<b>16798,19</b>	<b>7</b>	<b>27,54</b>	-	-	-	<b>34625</b>	-	-
<b>Basic phospholipase A2 homolog ecarpholin S</b>	<i>Echis carinatus</i>	<b>S49 PLA2</b>	<b>P48650</b>	<b>14617,21</b>	<b>5</b>	<b>57,38</b>	-	-	-	<b>70337</b>	-	-
Venom nerve growth factor	<i>Bothrops jararacussu</i>	VNGF	Q90W38	27617,89	22	80,50	924	335518	55597	249223	52763	10426
<b>Neurotrophin-3 (Fragment)</b>	<i>Anilius scytale</i>	<b>VNGF</b>	<b>Q1X6Y3</b>	<b>18710,21</b>	<b>4</b>	<b>41,82</b>	-	<b>7404</b>	-	<b>251084</b>	-	-
Beta-fibrinogenase brevinase	<i>Gloydius blomhoffii</i>	SVSP	Q9PT51	26409,51	7	46,35	-	7264	28876	11324	-	23679
Thrombin-like enzyme halystase	<i>Gloydius blomhoffii</i>	SVSP	P81176	27167,66	16	71,43	-	-	14294	-	20632	-
Venom nerve growth factor 2	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	VNGF	Q3HXZ0	27790,22	16	56,79	1035	-	-	57308	25491	5798
L-amino-acid oxidase	<i>Daboia russelii</i>	LAAO	G8XQX1	57287,19	63	78,77	-	18664	19070	13258	-	-
L-amino-acid oxidase	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	LAAO	Q6WP39	59000,48	63	94,57	-	181797	179443	95410	3692	-
L-amino-acid oxidase (Fragments)	<i>Daboia siamensis</i>	LAAO	Q4F867	46713,87	41	69,04	-	25551	36212	26248	-	-

Venom nerve growth factor	<i>Macrovipera lebetina</i>	VNGF	P25428	27774,12	12	61,48	1035	-	-	5294	454	-
L-amino-acid oxidase	<i>Gloydius halys</i>	LAAO	Q6STF1	57524,09	73	81,15	38600	346408	151448	92596	13228	6983
L-amino-acid oxidase	<i>Echis ocellatus</i>	LAAO	B5U6Y8	56922,72	68	92,86	-	15485	69915	64329	-	-
Thrombin-like enzyme bilineobin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	SVSP	Q9PSN3	27162,92	11	69,79	15915	26481	73969	19421	39664	-
Thrombin-like enzyme kangshuanmei	<i>Gloydius brevicaudus</i>	SVSP	P85109	27116,53	9	54,66	-	11894	15952	5819	-	-
Cysteine-rich venom protein 2	<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	CRISP	B0VXV6	27397,73	22	96,65	-	122761	327891	137418	-	-
Thrombin-like enzyme ancrod	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	SVSP	P26324	27254,74	11	47,01	23148	-	9034	-	6986	-
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Protobothrops jerdonii</i>	P-II SVMP	P0C6E4	56191,79	24	51,35	-	240042	44112	131041	-	18412
Snaclec trimecetin subunit beta	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	CTL	Q5FZI5	17034,10	12	77,08	-	21418	7583	8142	-	-
Disintegrin CTF-II	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	P-II SVMP	P23323	9012,75	4	64,00	-	-	-	31668	-	67916
Cysteine-rich secretory protein	<i>Crotalus adamanteus</i>	CRISP	F8S0Y4	27541,68	16	58,33	-	26299	4555	11019	-	-
Basic phospholipase A2 BP-I	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	K49 PLA2	P0DJJ8	16335,75	6	36,23	-	10888	-	20108	-	-
Basic phospholipase A2 homolog promutoxin	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	R49 PLA2	Q2PWA3	16241,64	7	43,48	-	8519	13162	25851	892	-
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin	<i>Bothrops jararaca</i>	VEGF	Q90X23	16890,16	13	87,67	2165	-	12613	64897	-	-
<b>Basic phospholipase A2 PeBP(R)-I/II</b>	<b><i>Protobothrops elegans</i></b>	<b>R49 PLA2</b>	<b>Q2PG81</b>	<b>16284,64</b>	<b>8</b>	<b>60,58</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>845</b>	<b>-</b>
Snaclec bothroinsularin subunit beta	<i>Bothrops insularis</i>	CTL	P0C930	15273,69	4	27,56	-	18758	15506	-	-	-
Acidic phospholipase A2 2 (Fragments)	<i>Bothrops insularis</i>	D49 PLA2	P84397	12964,94	3	31,78	-	31824	-	39647	-	-
<b>Snaclec purpureotin subunit beta</b>	<b><i>Trimeresurus purpureomaculatus</i></b>	<b>CTL</b>	<b>P0DJL3</b>	<b>14897,42</b>	<b>2</b>	<b>22,76</b>	<b>-</b>	<b>20127</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin	<i>Bothrops erythromelas</i>	VEGF	Q6J936	16877,12	12	73,97	2165	140494	12613	64897	-	-
Snaclec bothrojaracin subunit beta	<i>Bothrops jararaca</i>	CTL	Q56EB0	17691,59	5	62,67	-	7673	15506	3908	-	-

Basic phospholipase A2 homolog zhaermitoxin	<i>Protobothrops mangshanensis</i>	R49 PLA2	P84776	14783,77	9	72,73	-	4812	14746	4677	-	-
<b>Snaclec mucetin subunit beta</b>	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	<b>CTL</b>	<b>Q8JGT6</b>	<b>17239,25</b>	<b>2</b>	<b>38,36</b>	-	-	-	<b>14301</b>	-	-
<b>Snaclec jerdonuxin subunit beta</b>	<i>Protobothrops jerdonii</i>	<b>CTL</b>	<b>E2DQZ5</b>	<b>17608,77</b>	<b>7</b>	<b>63,51</b>	-	-	-	<b>1824</b>	-	-
Snaclec flavocetin-A subunit beta	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	CTL	Q8AV98	17388,29	6	56,08	-	88790	26604	37560	-	-
Snake venom serine proteinase 14	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	J3SDW9	28098,86	13	51,78	-	122243	63187	100509	91584	-
Snake venom 5'-nucleotidase	<i>Crotalus adamanteus</i>	NT	F8S0Z7	65309,44	30	63,78	-	28768	13990	48929	14924	15819
Venom phosphodiesterase 1	<i>Crotalus adamanteus</i>	PDE	J3SEZ3	98255,02	50	68,63	-	107622	105579	133811	12036	10991
Venom nerve growth factor	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	VNGF	Q9DEZ9	27574,91	21	75,52	210642	21247	9772	13828	61139	94083
Snake venom metalloproteinase hemorrhagic factor 2	<i>Lachesis muta muta</i>	P-I SVMP	P22796	22937,98	11	84,00	170657	99692	271957	10142	-	-
Venom nerve growth factor 2	<i>Notechis scutatus scutatus</i>	VNGF	Q3HXY6	28194,53	16	78,69	2590	21642	293274	37701	22008	1995
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Gloydius brevicaudus</i>	P-II SVMP	Q9YII9	54056,54	33	51,68	113766	178470	86024	53588	11236	-
Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-5	<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	KT	Q90W97	9373,39	3	69,88	-	25315	50378	52324	-	-
Venom nerve growth factor 2	<i>Tropidechis carinatus</i>	VNGF	Q3HXX7	28132,33	12	68,03	-	-	50902	9464	-	1559
<b>Snake venom serine protease catroxase-1</b>	<i>Crotalus atrox</i>	<b>SVSP</b>	<b>Q8QHK3</b>	<b>29309,28</b>	<b>11</b>	<b>52,67</b>	-	-	-	<b>19577</b>	-	-
Venom nerve growth factor 2	<i>Naja sputatrix</i>	VNGF	Q5YF89	27486,61	11	57,26	4310	17232	24240	17672	79294	30488
Snake venom serine protease ussurase	<i>Gloydius ussuriensis</i>	KT	Q8UUJ1	26700,87	15	65,67	98419	-	469	108794	168250	143116
Disintegrin CV-11-alpha	<i>Cerastes vipera</i>	DIS	Q3BK16	12725,48	5	50,45	-	34416	-	45419	-	-
Snake venom serine protease salmonase	<i>Gloydius brevicaudus</i>	SVSP	Q9PTL3	29548,47	10	65,76	-	-	204416	-	107838	46686
Disintegrin lebein-1-alpha	<i>Macrovipera lebetina</i>	DIS	P83253	12726,25	5	90,99	-	337143	233442	180603	-	-

**Apêndice 2.** Proteínas encontradas por espectrometria de massas nos venenos de fêmeas em diferentes idades. CRISP: proteína secretada rica em cisteína; CTL: lectina tipo C; DIS: desintegrina; GPC: peptídeo glutamyl ciclotranferase; KT: inibidor de serino proteases do tipo Kunitz; LAAO: L-amino ácido oxidase; NT: 5'-nucleotidase; PDE: fosfodiesterase; SVMP P-I: metaloprotease do tipo P-I; SVMP P-II: metaloprotease do tipo P-II; SVMP P-III: metaloprotease do tipo P-III; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; SVSP: serino protease; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; VNGF: fator de crescimento neural. Proteínas destacadas em negrito são exclusivas de uma idade; proteínas destacadas em vermelho são exclusivas de fêmeas.

Descrição	Organismo	Família	Protein entry	Massa (Da)	Nº de peptídeos	Cobertura (%)	BmN	Bm<1	Bm1	Bm2	Bm3	Bm>4
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Bothrops asper</i>	P-II SVMP	Q072L5	54818,86	74	98,95	61827	108462	81474	194665	318214	-
Zinc metalloproteinase/disintegrin VMP-II	<i>Crotalus viridis viridis</i>	P-II SVMP	C9E1R9	55068,19	43	69,67	33043	37635	12402	63866	-	-
Basic phospholipase A2 homolog 2	<i>Bothrops moojeni</i>	K49 PLA2	Q9I834	14685,51	48	100,00	704814	623008	770328	755922	48704	599294
Zinc metalloproteinase/disintegrin (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-II SVMP	P31989	18581,26	28	98,14	137249	179263	271404	157243	-	-
Cysteine-rich venom protein ablomin	<i>Gloydius blomhofii</i>	CRISP	Q8JI40	27826,80	41	100,00	78723	46800	32984	113487	21253	63985
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BjussuMP-1 (Fragment)	<i>Bothrops jararacussu</i>	P-III SVMP	Q1PHZ4	63923,76	101	97,07	996076	798305	182106	219932	43453	120596
Cysteine-rich venom protein	<i>Protobothrops jerdonii</i>	CRISP	Q7ZZN9	27777,79	38	87,92	28904	83794	94610	100105	-	13519
Cysteine-rich venom protein	<i>Vipera berus</i>	CRISP	B7FDI1	27421,44	42	87,87	166366	110272	26639	65477	-	-
Cysteine-rich venom protein catrin	<i>Crotalus atrox</i>	CRISP	Q7ZT99	27558,99	41	97,50	45525	8242	19651	133124	12251	-
Cysteine-rich venom protein triflin	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	CRISP	Q8JI39	27664,76	50	87,92	57277	205192	16708	28500	12251	11592
Cysteine-rich venom protein piscivorin	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	CRISP	Q7ZTA0	27593,99	42	83,75	63898	39591	47927	597218	8382	11286
Disintegrin batroxostatin	<i>Bothrops atrox</i>	P-II SVMP	P18618	8419,94	12	100,00	-	102161	34116	-	-	-
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Bothrops jararaca</i>	P-II SVMP	Q98SP2	54752,21	109	100,00	286237	225427	281388	152772	165773	133784
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Gloydius brevicaudus</i>	P-II SVMP	Q9PVK9	54607,45	71	93,15	179320	423196	114055	220870	14796	7747

Zinc metalloproteinase/disintegrin PMMP-2	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	P-II SVMP	E9NW27	55667,31	79	97,73	203639	434811	768389	904525	60349	205870
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	P-II SVMP	O57413	55489,90	85	97,92	92351	138882	168540	54360	147705	260150
Disintegrin DisBa-01	<i>Bothrops alternatus</i>	P-II SVMP	Q801Z4	8920,57	14	100,00	14063	31378	38307	-	-	47381
<b>Disintegrin basilicin</b>	<b><i>Crotalus basiliscus</i></b>	<b>P-II SVMP</b>	<b>P31981</b>	<b>8387,99</b>	<b>6</b>	<b>58,33</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>163421</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Disintegrin sasaimin	<i>Cerrophidion sasai</i>	P-II SVMP	C0HJM5	8298,82	8	94,44	102286	48369	35346	-	-	-
Helicopsin (Fragments)	<i>Helicops angulatus</i>	CRISP	P0DJG8	2619,94	6	100,00	19370	42697	9923	27674	-	28091
<b>Snake venom metalloproteinase BnP1 (Fragments)</b>	<b><i>Bothrops pauloensis</i></b>	<b>P-I SVMP</b>	<b>P0C6S0</b>	<b>9685,13</b>	<b>15</b>	<b>100,00</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>47740</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Cysteine-rich venom protein LIO1 (Fragment)	<i>Erythrolamprus poecilogyrus</i>	CRISP	Q2XXQ0	27383,25	28	100,00	4955	9472	6898	13581	-	-
Cysteine-rich venom protein	<i>Echis coloratus</i>	CRISP	P0DMT4	25611,34	35	100,00	27127	10685	12651	11152	10295	16121
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Bothrops insularis</i>	P-II SVMP	Q5XUW8	54567,67	105	87,82	143491	171476	41549	129053	14697	112140
Snake venom metalloproteinase BnP2 (Fragments)	<i>Bothrops pauloensis</i>	P-I SVMP	P0C6S1	8008,07	21	92,75	24164	21440	102892	33105	241919	65653
Snake venom metalloproteinase leucurolysin-A	<i>Bothrops leucurus</i>	P-I SVMP	P84907	23361,50	61	100,00	162608	157941	142022	156221	111290	112808
Basic phospholipase A2 homolog BaTX	<i>Bothrops alternatus</i>	K49 PLA2	P86453	14695,50	44	100,00	51168	53556	37962	27452	96504	32867
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like jararhagin (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	P30431	66150,04	77	76,71	79738	55836	21215	116149	-	196568
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BITM06A	<i>Bothrops insularis</i>	P-III SVMP	Q8QG88	70508,26	89	86,89	13399	102641	39068	294554	5118	186688
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothropasin	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	O93523	70437,19	83	84,43	52915	-	39068	-	5118	-
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like batroxstatin-1	<i>Bothrops atrox</i>	P-III SVMP	C5H5D2	48310,15	56	98,11	1018961	967206	674074	527981	-	236049
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VAP2A	<i>Crotalus atrox</i>	P-III SVMP	A4PBQ9	70201,82	73	74,46	6951	7461	24963	73365	-	100709
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VAP2B	<i>Crotalus atrox</i>	P-III SVMP	Q90282	70472,21	52	51,56	34479	-	-	34140	-	-



Zinc metalloproteinase-disintegrin-like	<i>Crotalus durissus durissus</i>	P-III SVMP	Q2QA02	70515,28	63	64,70	18366	101840	3323	661107	39777	347041
Basic phospholipase A2 homolog M1-3-3	<i>Bothrops asper</i>	K49 PLA2	Q9PVE3	16357,73	49	100,00	250778	839982	278072	382086	163385	1287744
<b>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like scutiarin (Fragment)</b>	<b><i>Crotalus scutulatus scutulatus</i></b>	<b>P-III SVMP</b>	<b>A2CJE2</b>	<b>20889,39</b>	<b>28</b>	<b>75,71</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>574825</b>
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like acurhagin	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	P-III SVMP	Q9W6M5	70766,71	76	71,64	129623	10816	6908	329702	-	189133
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like catroriarin (Fragment)	<i>Crotalus atrox</i>	P-III SVMP	A2CJE4	20694,11	24	75,43	235515	45206	93753	418935	-	-
Snake venom metalloproteinase BmooMPalpha-I	<i>Bothrops asper</i>	P-I SVMP	P85314	23621,54	45	98,05	228878	51648	319312	437329	347750	416344
Basic phospholipase A2 myotoxin III	<i>Bothrops jararaca</i>	D49 PLA2	P20474	16549,88	35	100,00	60137	436743	272132	390518	12764	280749
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-4 (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q0NZX7	11443,31	6	59,79	-	-	54980	56543	-	-
<b>Snake venom metalloproteinase bothrojaractivase (Fragments)</b>	<b><i>Bothrops jararaca</i></b>	<b>P-I SVMP</b>	<b>P0C7A9</b>	<b>7166,29</b>	<b>11</b>	<b>86,67</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>26989</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Snake venom metalloproteinase BpMP-1 (Fragments)	<i>Bothrops pauloensis</i>	P-I SVMP	C0HJU2	19769,20	26	60,57	-	36707	19212	9373	-	9067
Basic phospholipase A2 homolog	<i>Agkistrodon piscivorus conanti</i>	K49 PLA2	C0HKC1	14759,61	20	76,03	54987	-	-	44844	-	37074
Snake venom metalloproteinase BpirMP (Fragment)	<i>Bothrops pirajai</i>	P-I SVMP	P0DL29	20367,13	32	68,69	-	-	6998	8733	-	-
Snake venom metalloproteinase neuwiedase (Fragment)	<i>Bothrops pauloensis</i>	P-I SVMP	Q9I9R4	22809,65	46	100,00	28911	76100	71589	36841	23273	22072
Snake venom metalloproteinase BjussuMP-2 (Fragment)	<i>Bothrops jararacussu</i>	P-I SVMP	Q7T1T4	42470,33	64	90,24	67245	20367	84253	55919	104688	103354
Snake venom metalloproteinase BaP1	<i>Bothrops asper</i>	P-I SVMP	P83512	46505,98	66	97,06	56615	28774	67444	46909	62170	42848
Thrombin-like enzyme leucurobin	<i>Bothrops leucurus</i>	SVSP	P0DJ86	25107,39	39	93,51	183399	283943	152519	151973	1313476	1977
Thrombin-like enzyme batroxobin	<i>Bothrops atrox</i>	SVSP	P04971	28872,95	33	97,25	560938	916435	775084	926590	-	694422
Venom plasminogen activator	<i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>	SVSP	E5L0E5	28762,35	30	74,42	82365	74649	234396	106217	-	53675
Snake venom serine proteinase 12	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	J3RY93	29411,40	42	91,54	93345	63007	181565	31800	-	29330

Snake venom serine proteinase 4a	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	J3SDX0	29607,58	40	100,00	253536	242838	193069	121855	50226	123093
Acidic phospholipase A2 DE-I	<i>Ovophis okinavensis</i>	D49 PLA2	P00625	16382,21	26	100,00	223209	283059	102017	121457	-	11356
<b>Zinc metalloproteinase/disintegrin</b>	<b><i>Agkistrodon contortrix contortrix</i></b>	<b>P-II SVMP</b>	<b>Q805F6</b>	<b>55166,31</b>	<b>26</b>	<b>46,38</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>13763</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Basic phospholipase A2 bothropstoxin-2	<i>Bothrops jararacussu</i>	D49 PLA2	P45881	16563,78	28	99,28	230136	979	124735	143107	-	-
Basic phospholipase A2	<i>Bothrops leucurus</i>	D49 PLA2	P86974	14509,18	22	97,54	192973	3954	-	350429	-	-
Thrombin-like enzyme calobin-1	<i>Gloydius ussuriensis</i>	SVSP	Q91053	29592,48	42	98,09	507545	701473	210035	833508	-	129404
Phospholipase A2 homolog 1	<i>Bothrops atrox</i>	K49 PLA2	Q6JK69	16381,68	44	96,38	132017	24330	218885	21522	-	24153
Acidic phospholipase A2 A'	<i>Gloydius halys</i>	D49 PLA2	O42192	14464,80	23	100,00	40919	41256	17274	51524	7171	132547
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-1 (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q0NZY0	19319,87	17	100,00	566212	132571	213392	84158	-	49997
<b>Basic phospholipase A2 homolog BmatTX-II (Fragment)</b>	<b><i>Bothrops matogrossensis</i></b>	<b>K49 PLA2</b>	<b>P0DMK0</b>	<b>3137,51</b>	<b>9</b>	<b>100,00</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>445</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Acidic phospholipase A2	<i>Gloydius blomhoffii</i>	D49 PLA2	P20249	14462,71	20	100,00	10746	80173	24604	182300	35291	90812
Acidic phospholipase A2 BpirPLA2-I	<i>Bothrops pirajai</i>	D49 PLA2	C9DPL5	14434,72	26	100,00	7921	43571	22492	82030	-	-
L-amino-acid oxidase (Fragment)	<i>Bothrops moojeni</i>	LAAO	Q6TGQ8	54892,89	105	88,91	7937	91229	35483	6655	-	5567
L-amino-acid oxidase (Fragment)	<i>Bothrops jararacussu</i>	LAAO	Q6TGQ9	56630,92	119	88,73	99164	18780	94193	70402	4136	30531
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like HF3	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q98UF9	69862,46	64	83,33	83013	99462	131716	102837	13735	61357
Acidic phospholipase A2 3	<i>Trimeresurus gramineus</i>	D49 PLA2	P81480	14523,72	29	93,44	18960	41113	34663	29900	31495	19816
Acidic phospholipase A2	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	D49 PLA2	Q7SID6	14830,10	20	100,00	243633	235539	21731	67591	27786	21782
Acidic phospholipase A2 1	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	D49 PLA2	Q91506	14413,73	26	93,44	166072	93907	70927	31434	4401	35693
Acidic phospholipase A2 Cvv-E6a	<i>Crotalus viridis viridis</i>	D49 PLA2	Q800C4	16031,82	12	95,65	5911	21374	15085	37055	77873	18724

Acidic phospholipase A2 Tpu-E6c (Fragments)	<i>Trimeresurus puniceus</i>	D49 PLA2	P0DJP4	14606,83	23	86,89	77185	28546	6555	14352	-	-
Acidic phospholipase A2 A	<i>Gloydius halys</i>	D49 PLA2	O42191	14725,09	12	81,45	6568	5193	-	1703	5412	1225
Acidic phospholipase A2 BA2	<i>Gloydius halys</i>	D49 PLA2	O42190	14600,00	16	77,42	9279	8991	7112	14324	-	4073
Acidic phospholipase A2 4	<i>Trimeresurus gramineus</i>	D49 PLA2	P81479	14590,76	23	76,23	-	-	8713	54576	-	-
Acidic phospholipase A2	<i>Gloydius halys</i>	D49 PLA2	P14418	14772,19	14	84,68	5932	3219	13815	2971	-	5831
Acidic phospholipase A2 CM-II	<i>Bitis nasicornis</i>	D49 PLA2	P00621	14349,59	22	100,00	2903	19006	20123	14009	-	8587
Basic phospholipase A2 Ts-G6D49	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	D49 PLA2	Q6H3C5	14617,08	19	99,18	6224	42417	14437	10214	40111	14778
Acidic phospholipase A2 6	<i>Trimeresurus gramineus</i>	D49 PLA2	P70088	16521,15	36	88,41	45812	17726	70220	91279	2337	70288
Acidic phospholipase A2	<i>Bitis gabonica</i>	D49 PLA2	P00620	14060,18	13	88,14	1855	8717	3013	4679	-	4013
Acidic phospholipase A2 pgPLA 1b/pgPLA 2b	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	D49 PLA2	Q92147	16506,27	23	75,36	37760	56009	2170	14849	-	27762
Acidic phospholipase A2 jerdoxin	<i>Protobothrops jerdonii</i>	D49 PLA2	Q8JIY9	16437,33	34	100,00	96328	145881	98708	359056	26212	47133
Acidic phospholipase A2 BthA-1	<i>Bothrops jararacussu</i>	D49 PLA2	Q8AXY1	16254,06	27	97,10	82359	91188	245903	246856	468842	255357
Basic phospholipase A2 APC-D49	<i>Agkistrodon piscivorus conanti</i>	D49 PLA2	C0HKC4	14787,47	28	97,56	21121	149196	127757	95769	19180	148445
Phospholipase A2 crotoxin basic subunit CBb	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	D49 PLA2	P0CG56	14965,65	18	85,25	-	20234	33210	2121	-	-
Phospholipase A2 crotoxin basic chain CBa2	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	D49 PLA2	P24027	16766,92	25	100,00	95521	-	43704	84369	2430	29793
Acidic phospholipase A2 Tpu-E6b	<i>Trimeresurus puniceus</i>	D49 PLA2	Q2YHJ5	14740,94	44	100,00	76601	85399	76202	140328	-	20351
Acidic phospholipase A2 Cvv-E6b	<i>Crotalus viridis viridis</i>	D49 PLA2	Q7ZTA6	16238,10	17	94,93	3499	9858	160435	-	-	33049
<b>Acidic phospholipase A2 Ts-A6</b>	<b><i>Trimeresurus stejnegeri</i></b>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q6H3C8</b>	<b>16505,15</b>	<b>18</b>	<b>86,23</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2337</b>	<b>-</b>
Acidic phospholipase A2	<i>Lachesis stenophrys</i>	D49 PLA2	P84651	14699,98	16	100,00	51464	62526	28486	104180	-	5550

Basic phospholipase A2 caudoxin	<i>Bitis caudalis</i>	D49 PLA2	P00622	14161,80	30	100,00	429649	249421	271813	203234	14251	432754
Basic phospholipase A2 sistruxin B	<i>Sistrurus tergeminus</i>	D49 PLA2	Q6EER2	16642,73	23	100,00	7571	23047	21380	11076	-	-
<b>Acidic phospholipase A2 CTs-A3</b>	<b><i>Trimeresurus stejnegeri</i></b>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q6H3C6</b>	<b>14588,04</b>	<b>11</b>	<b>90,98</b>	<b>-</b>	<b>11169</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1040</b>
Acidic phospholipase A2 Ts-A3	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	D49 PLA2	Q6H3C9	16346,27	25	100,00	7220	11169	12571	13767	-	8115
Acidic phospholipase A2 Tgc-E6	<i>Trimeresurus gracilis</i>	D49 PLA2	A8E2V8	16487,37	45	100,00	20105	6320	100539	44040	38781	13575
Acidic phospholipase A2	<i>Bothrops pictus</i>	D49 PLA2	Q9I8F8	14530,73	12	85,25	16747	3114	13456	14804	-	-
Acidic phospholipase A2 1	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	D49 PLA2	P06859	16333,15	25	100,00	548730	20210	10313	497622	-	7855
<b>Acidic phospholipase A2 PePLA2</b>	<b><i>Protobothrops elegans</i></b>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q2PG83</b>	<b>16167,03</b>	<b>15</b>	<b>92,03</b>	<b>-</b>	<b>52438</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Acidic phospholipase A2 2	<i>Bothrops asper</i>	D49 PLA2	P86389	14992,44	23	92,74	7772	10661	5747	5481	-	924
Acidic phospholipase A2 BlatPLA2	<i>Bothriechis lateralis</i>	D49 PLA2	C0HJC1	14689,07	14	100,00	9527	19921	-	11892	-	1226
Acidic phospholipase A2 Tpu-E6a	<i>Trimeresurus puniceus</i>	D49 PLA2	Q2YHJ6	16318,18	14	88,41	6442	7525	8208	14111	22939	6338
Acidic phospholipase A2 Tbo-E6	<i>Trimeresurus borneensis</i>	D49 PLA2	Q2YHJ3	16302,18	22	88,41	7077	5169	13159	19700	-	20479
Basic phospholipase A2 10	<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	D49 PLA2	P86806	15027,76	21	96,72	-	3504	3383	1492	2430	-
Basic phospholipase A2 Mtx-b	<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	D49 PLA2	P62023	16705,88	19	92,75	14494	24698	3957	14097	-	240893
Basic phospholipase A2 F15	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	D49 PLA2	P0CAS5	15278,16	14	67,21	773	-	678	1161	-	-
Basic phospholipase A2 9	<i>Crotalus durissus cumanensis</i>	D49 PLA2	P86805	14974,65	26	100,00	24351	31498	3903	7853	2430	56759
Acidic phospholipase A2	<i>Bothrops jararaca</i>	D49 PLA2	P81243	15102,36	31	100,00	23248	21814	9709	49627	-	11050
Acidic phospholipase A2 BmooPLA2	<i>Bothrops moojeni</i>	D49 PLA2	G3DT18	16478,13	16	98,55	40852	23084	12915	36296	-	-
Acidic phospholipase A2 BITP01A	<i>Bothrops insularis</i>	D49 PLA2	Q8QG87	16557,38	30	86,96	25824	47310	45268	60296	-	-

Acidic phospholipase A2 BE-I-PLA2	<i>Bothrops erythromelas</i>	D49 PLA2	Q2HZ28	16233,83	22	97,10	14257	10434	61714	-	-	-
Basic phospholipase A2 trimicrotoxin	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	D49 PLA2	Q90W39	16466,75	20	97,83	65150	73481	17155	20609	2501	7631
Acidic phospholipase A2 Ts-A4	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	D49 PLA2	Q6H3C7	16469,32	12	63,31	15400	22869	8788	9118	4744	-
Acidic phospholipase A2 2	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	D49 PLA2	Q9I968	16537,45	36	100,00	300420	78554	77265	96722	10709	5796
Acidic phospholipase A2 S1E6-a (Fragment)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	D49 PLA2	Q9PVF1	15168,60	15	100,00	33046	22958	13278	28062	-	5754
Acidic phospholipase A2 Cvv-E6f	<i>Crotalus viridis viridis</i>	D49 PLA2	Q800C3	16440,30	23	100,00	158972	349534	619255	381316	-	95638
Basic phospholipase A2 Tbo-G6D49	<i>Trimeresurus borneensis</i>	D49 PLA2	Q2YHJ2	16540,59	29	94,20	49651	49337	45888	270917	19830	20116
Acidic phospholipase A2 CH-E6'	<i>Crotalus horridus</i>	D49 PLA2	D6MKR0	16307,08	19	99,28	425340	326007	371685	40799	-	14134
<b>Acidic phospholipase A2 S1E6-c</b>	<b><i>Calloselasma rhodostoma</i></b>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q9PVE9</b>	<b>16605,47</b>	<b>9</b>	<b>80,58</b>	<b>-</b>	<b>20517</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Basic phospholipase A2 PLA-B'	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	D49 PLA2	Q8JIG0	16501,62	20	98,55	26488	8529	67692	19271	-	26161
<b>Acidic phospholipase A2 H1E6</b>	<b><i>Calloselasma rhodostoma</i></b>	<b>D49 PLA2</b>	<b>Q9PVF2</b>	<b>16484,29</b>	<b>8</b>	<b>63,31</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4744</b>	<b>-</b>
Acidic phospholipase A2 BpPLA2-TXI	<i>Bothrops pauloensis</i>	D49 PLA2	D0UGJ0	16078,96	17	100,00	11180	359433	-	45200	-	13850
Acidic phospholipase A2 2	<i>Trimeresurus gramineus</i>	D49 PLA2	P81478	14591,74	10	56,56	-	6728	-	1004	-	-
Acidic phospholipase A2 SpII RP4	<i>Bothrops alternatus</i>	D49 PLA2	P86456	14541,01	14	100,00	31670	11931	50147	36413	-	14055
Acidic phospholipase A2 S1E6-b (Fragment)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	D49 PLA2	Q9PVF0	15150,56	15	100,00	-	15922	225444	14704	18295	8003
Phospholipase A2 (Fragment)	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	D49 PLA2	B3EWP6	7138,93	4	56,67	-	77809	-	-	-	63924
Acidic phospholipase A2 5	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	D49 PLA2	P82896	14678,02	14	100,00	60392	63420	10626	13650	-	-
Phospholipase A2 3 (Fragments)	<i>Bothrops diporus</i>	D49 PLA2	C0HJP9	5713,39	10	100,00	-	8474	4114	79377	-	-
L-amino-acid oxidase (Fragment)	<i>Bothrops pauloensis</i>	LAAO	B5AR80	57198,74	106	100,00	32087	131844	79087	63038	200957	141018

Basic phospholipase A2 homolog 4a	<i>Bothrops asper</i>	K49 PLA2	POC616	16486,80	31	99,27	425730	172369	14418	506956	-	241805
L-amino acid oxidase (Fragment)	<i>Bothrops pictus</i>	LAAO	X2L4E2	56747,89	101	89,56	725423	361535	777924	654723	300862	334118
L-amino-acid oxidase	<i>Crotalus adamanteus</i>	LAAO	O93364	59061,76	109	99,22	-	-	4699	-	17559	-
Platelet-aggregating proteinase PA-BJ (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	P81824	26426,18	31	86,92	9452	315899	414138	605299	-	314624
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like brevilysin H6	<i>Gloydius brevicaudus</i>	P-III SVMP	POC7B0	70441,96	57	72,62	77259	114170	40646	173892	51325	111034
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-2 (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMP	Q0NZX9	25939,93	25	80,73	108473	239232	109096	312354	-	57516
Snaclec alboaggregin-A subunit beta'	<i>Trimeresurus albolabris</i>	CTL	P81114	14543,72	7	50,41	-	336945	301766	-	7905	91138
Snaclec aspercetin subunit beta (Fragment)	<i>Bothrops asper</i>	CTL	P0DJC9	7335,04	9	100,00	463553	326820	287019	298347	4300	147196
Snaclec CHH-B subunit beta	<i>Crotalus horridus</i>	CTL	P81509	14287,68	20	100,00	298945	264162	57051	525811	4765	61931
Snake venom serine protease HS114	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	Q5W959	28527,14	40	80,62	976581	788516	1269931	1083512	942072	424337
Zinc metalloproteinase leucurolysin-B (Fragment)	<i>Bothrops leucurus</i>	P-III SVMP	P86092	38143,88	49	97,84	370206	502910	139896	361265	8086	497135
Thrombin-like enzyme asperase	<i>Bothrops asper</i>	SVSP	Q072L6	28703,23	34	84,94	186804	341386	620388	434482	42508	124033
Phospholipase A2 homolog	<i>Echis coloratus</i>	S49 PLA2	P0DMT3	14504,22	10	80,17	-	5599	324791	65657	-	71019
Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin	<i>Protobothrops jerdonii</i>	P-II SVMP	P83912	55982,19	84	92,77	257579	879572	317827	621572	14588	305873
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like EoVMP2	<i>Echis ocellatus</i>	P-III SVMP	Q2UXQ5	71650,55	60	86,30	288065	310110	575004	343065	158009	125048
Disintegrin-like leberagin-C	<i>Macrovipera lebetina transmediterranea</i>	P-III SVMP	C0LZJ5	24231,26	22	74,15	91544	209170	222048	67698	-	77091
Basic phospholipase A2 Bs-N6	<i>Bothriechis schlegelii</i>	D49 PLA2	Q6EER4	16335,43	23	100,00	26790	12005	59888	28167	20646	18105
Basic phospholipase A2 Ceg-N6	<i>Cerrophidion godmani</i>	D49 PLA2	Q6EER5	14824,62	18	57,38	3871	14026	30888	16644	2501	49877
Basic phospholipase A2 homolog bothropstoxin-1	<i>Bothrops jararacussu</i>	K49 PLA2	Q90249	16295,66	48	97,08	186009	48417	23556	48816	-	1948

L-amino-acid oxidase	<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	LAAO	B0VXW0	58968,43	100	98,64	31476	106479	44988	82346	-	18987
Basic phospholipase A2 homolog Pgo-K49	<i>Cerrophidion godmani</i>	K49 PLA2	Q8UVU7	16313,57	19	78,10	9519	6223	5926	6458	-	2918
Snake venom serine protease homolog	<i>Bothrops jararacussu</i>	SVSP	Q7T229	29338,42	34	98,08	13989	162307	258986	332683	217224	67460
Snake venom metalloproteinase atroxlysin-1	<i>Bothrops atrox</i>	P-I SVMMP	P85420	23317,34	25	92,08	-	399853	5898	194435	-	119042
Thrombin-like enzyme bothrombin	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	P81661	26268,74	28	100,00	151989	102688	542237	490093	29891	12316
L-amino-acid oxidase	<i>Crotalus adamanteus</i>	LAAO	F8S0Z5	59166,09	110	98,64	56011	162388	34453	91268	17559	44430
L-amino acid oxidase Lm29	<i>Lachesis muta</i>	LAAO	J7H670	58931,49	96	100,00	24263	226900	109864	165771	8285	21450
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-3 (Fragment)	<i>Bothrops jararaca</i>	P-III SVMMP	Q0NZX8	23062,87	21	72,45	683844	534312	171512	248630	26309	12511
<b>Snaclec GPIB-binding protein subunit beta</b>	<b><i>Bothrops jararaca</i></b>	<b>CTL</b>	<b>Q9PSM5</b>	<b>14697,09</b>	<b>6</b>	<b>47,15</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>180666</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>C-type lectin LmsL</b>	<b><i>Lachesis stenophrys</i></b>	<b>CTL</b>	<b>Q9PSM4</b>	<b>16736,47</b>	<b>4</b>	<b>45,93</b>	<b>326161</b>	<b>334787</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>147712</b>
<b>C-type lectin galatrox (Fragments)</b>	<b><i>Bothrops atrox</i></b>	<b>CTL</b>	<b>P0DM53</b>	<b>9470,65</b>	<b>2</b>	<b>32,47</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3994</b>
Snake venom serine protease HS112	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	Q5W960	28672,76	20	89,02	408804	363052	399419	316698	27197	266325
Snake venom serine protease pictobin (Fragment)	<i>Bothrops pictus</i>	SVSP	U5YCR8	28467,23	27	100,00	63456	38271	106758	44256	22655	83874
Basic phospholipase A2 homolog MT1	<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	K49 PLA2	P49121	16573,88	19	77,37	54987	91773	3391	44844	-	37074
Basic phospholipase A2 homolog 1	<i>Bothrops moojeni</i>	K49 PLA2	P82114	14536,36	37	100,00	65007	19404	53639	17200	30344	301283
Basic phospholipase A2 homolog BmatTX-I (Fragment)	<i>Bothrops matogrossensis</i>	K49 PLA2	P0DMJ9	5854,56	10	100,00	10803	4515	7011	10051	-	18757
Phospholipase A2 homolog	<i>Echis carinatus sochureki</i>	S49 PLA2	P0DMT2	14663,30	13	79,51	15611	430701	12438	21274	-	15380
Thrombin-like enzyme bhalternin	<i>Bothrops alternatus</i>	SVSP	P0CG03	28672,50	18	79,62	8123	55779	97599	224391	-	11152
Zinc metalloproteinase barnettlysin-1	<i>Bothrops barnetti</i>	P-I SVMMP	P86976	21322,16	14	55,94	-	16415	59430	66610	-	-

L-amino-acid oxidase (Fragments)	<i>Bothrops atrox</i>	LAAO	P0CC17	13700,22	26	100,00	123936	160656	80977	85519	8438	142856
Snake venom metalloproteinase HT-1 (Fragment)	<i>Crotalus ruber ruber</i>	P-III SVMP	Q9PSN7	25197,81	9	51,85	32310	42039	24538	-	-	29049
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like Eoc1	<i>Echis ocellatus</i>	P-III SVMP	Q2UXR0	70918,30	19	43,16	101469	456019	482254	618247	-	21903
Basic phospholipase A2 homolog	<i>Cerrophidion godmani</i>	K49 PLA2	P81165	14512,29	14	66,94	2556	8328	-	1810	-	1690
L-amino-acid oxidase	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	LAAO	P0DI84	55090,00	83	88,64	347461	243089	113364	508232	7005	105629
Zinc metalloproteinase-disintegrin-like 3a	<i>Crotalus adamanteus</i>	P-III SVMP	J3S830	70950,42	20	41,48	-	52013	86520	-	-	-
Venom plasminogen activator LV-PA	<i>Lachesis muta muta</i>	SVSP	Q27J47	28746,44	17	84,88	9153	112553	134419	193847	9493	66610
Snake venom metalloproteinase basparin-A (Fragments)	<i>Bothrops asper</i>	P-III SVMP	P84035	7010,05	4	69,84	-	18651	8331	7116	-	-
Basic phospholipase A2 homolog Cax-K49	<i>Crotalus atrox</i>	K49 PLA2	Q8UVZ7	16395,81	15	64,96	3800	23097	-	3473	-	48478
L-amino acid oxidase Bs29 (Fragment)	<i>Bothriechis schlegelii</i>	LAAO	A0A024BTN9	56775,56	58	85,94	13943	558052	158366	150521	15631	37602
Basic phospholipase A2 homolog	<i>Cerastes cerastes</i>	K49 PLA2	P82950	14510,19	14	80,99	-	4685	14413	-	-	3792
L-amino acid oxidase	<i>Cerastes cerastes</i>	LAAO	X2JCV5	58841,75	62	92,05	61913	69359	85644	52700	14964	207506
L-amino-acid oxidase	<i>Demansia vestigiata</i>	LAAO	A6MFL0	59262,33	48	76,40	175346	516189	107672	92418	16646	45847
L-amino-acid oxidase (Fragments)	<i>Macrovipera lebetina</i>	LAAO	P81375	12548,85	13	100,00	179718	104675	11250	10629	-	13049
Snaclec bothroinsularin subunit alpha	<i>Bothrops insularis</i>	CTL	P0C929	15608,25	6	80,30	51109	27600	-	7649	-	-
L-amino-acid oxidase	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	LAAO	P81382	58620,22	71	99,61	30805	60974	16307	58054	2403	18202
Basic phospholipase A2 homolog Tpu-K49a	<i>Trimeresurus puniceus</i>	K49 PLA2	Q2YHJ9	16692,32	7	38,41	25454	21908	9498	-	5485	132941
<b>Basic phospholipase A2 homolog Tbo-K49</b>	<b><i>Trimeresurus borneensis</i></b>	<b>K49 PLA2</b>	<b>Q2YHJ4</b>	<b>16501,98</b>	<b>7</b>	<b>50,00</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>132941</b>
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	<i>Bothrops jararaca</i>	GPC	Q9YIB5	42489,45	53	88,04	108224	86488	135747	61554	12072	34007



Glutaminy-peptide cyclotransferase	<i>Boiga dendrophila</i>	GPC	A7ISW2	42218,09	49	89,13	145299	119753	92672	220474	-	69406
Glutaminy-peptide cyclotransferase	<i>Gloydius blomhoffii</i>	GPC	Q90YA8	42552,50	41	70,65	-	41634	3593	24893	-	-
Basic phospholipase A2 BmTX-I	<i>Bothrops moojeni</i>	D49 PLA2	P0C8M1	14879,68	15	95,04	177989	135184	161383	58052	-	14678
Venom nerve growth factor	<i>Bothrops jararacussu</i>	VNGF	Q90W38	27617,89	22	80,50	279639	276247	92677	92379	-	43954
Beta-fibrinogenase brevinase	<i>Gloydius blomhoffii</i>	SVSP	Q9PT51	26409,51	7	46,35	11001	22161	8183	-	-	-
<b>Thrombin-like enzyme halystase</b>	<b><i>Gloydius blomhoffii</i></b>	<b>SVSP</b>	<b>P81176</b>	<b>27167,66</b>	<b>16</b>	<b>71,43</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>227</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Venom nerve growth factor 2	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	VNGF	Q3HXZ0	27790,22	16	56,79	-	-	-	89799	-	10512
L-amino-acid oxidase	<i>Daboia russelii</i>	LAAO	G8XQX1	57287,19	63	78,77	62904	24532	15258	9019	23758	20574
L-amino-acid oxidase	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	LAAO	Q6WP39	59000,48	63	94,57	539839	217987	237867	134295	19496	17990
L-amino-acid oxidase (Fragments)	<i>Daboia siamensis</i>	LAAO	Q4F867	46713,87	41	69,04	22140	11033	42857	17973	20614	13207
L-amino-acid oxidase	<i>Gloydius halys</i>	LAAO	Q6STF1	57524,09	73	81,15	63685	177059	54090	126547	14295	65829
L-amino-acid oxidase	<i>Echis ocellatus</i>	LAAO	B5U6Y8	56922,72	68	92,86	23467	32797	21213	45308	7670	53774
Thrombin-like enzyme bilineobin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	SVSP	Q9PSN3	27162,92	11	69,79	6163	44400	-	54814	-	2812
Thrombin-like enzyme kangshuanmei	<i>Gloydius brevicaudus</i>	SVSP	P85109	27116,53	9	54,66	12942	13789	12165	13056	-	-
Cysteine-rich venom protein 2	<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	CRISP	B0VXV6	27397,73	22	96,65	86780	70335	124508	143935	369917	370670
Thrombin-like enzyme ancrod	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	SVSP	P26324	27254,74	11	47,01	-	13356	-	23809	-	-
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Protobothrops jerdonii</i>	P-II SVMPP	P0C6E4	56191,79	24	51,35	143076	214415	52590	221353	4962	44230
<b>Alpha-fibrinogenase shedaoenase</b>	<b><i>Gloydius shedaoensis</i></b>	<b>SVSP</b>	<b>Q6T5L0</b>	<b>27100,55</b>	<b>11</b>	<b>49,58</b>	<b>-</b>	<b>6130</b>	<b>-</b>	<b>239</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Snaclec trimecetin subunit beta	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	CTL	Q5FZI5	17034,10	12	77,08	10468	41601	3534	-	-	9377

Disintegrin CTF-II	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	P-II SVMP	P23323	9012,75	4	64,00	-	-	-	21126	9775	-
Cysteine-rich secretory protein	<i>Crotalus adamanteus</i>	CRISP	F8S0Y4	27541,68	16	58,33	-	1733	18559	163520	-	-
<b>Basic phospholipase A2 BP-I</b>	<b><i>Protobothrops flavoviridis</i></b>	<b>K49 PLA2</b>	<b>P0DJJ8</b>	<b>16335,75</b>	<b>6</b>	<b>36,23</b>	<b>-</b>	<b>14870</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Basic phospholipase A2 homolog promutoxin	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	R49 PLA2	Q2PWA3	16241,64	7	43,48	14287	15269	19698	6690	-	1817
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin	<i>Bothrops jararaca</i>	VEGF	Q90X23	16890,16	13	87,67	-	89829	8304	42422	3713	4330
<b>Basic phospholipase A2 PeBP(R)-I/II</b>	<b><i>Protobothrops elegans</i></b>	<b>R49 PLA2</b>	<b>Q2PG81</b>	<b>16284,64</b>	<b>8</b>	<b>60,58</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>31042</b>
Snaclec bothroinsularin subunit beta	<i>Bothrops insularis</i>	CTL	P0C930	15273,69	4	27,56	18525	15879	1777	-	-	-
Acidic phospholipase A2 2 (Fragments)	<i>Bothrops insularis</i>	D49 PLA2	P84397	12964,94	3	31,78	-	25089	2744	-	-	6544
<b>Snaclec purpureotin subunit beta</b>	<b><i>Trimeresurus purpureomaculatus</i></b>	<b>CTL</b>	<b>P0DJL3</b>	<b>14897,42</b>	<b>2</b>	<b>22,76</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>8099</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin	<i>Bothrops erythromelas</i>	VEGF	Q6J936	16877,12	12	73,97	69931	126980	8304	42422	3713	4330
Snaclec bothrojaracin subunit beta	<i>Bothrops jararaca</i>	CTL	Q56EB0	17691,59	5	62,67	18525	15879	-	-	-	-
Basic phospholipase A2 homolog zhaoermiatoxin	<i>Protobothrops mangshanensis</i>	R49 PLA2	P84776	14783,77	9	72,73	7216	6980	21586	11379	-	-
Snaclec jerdonuxin subunit beta	<i>Protobothrops jerdonii</i>	CTL	E2DQZ5	17608,77	7	63,51	3297	20674	-	-	-	-
Snaclec flavocetin-A subunit beta	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	CTL	Q8AV98	17388,29	6	56,08	63140	25862	35713	38202	-	-
Snake venom serine proteinase 14	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	J3SDW9	28098,86	13	51,78	17607	146390	73730	277773	22858	160462
Snake venom 5'-nucleotidase	<i>Crotalus adamanteus</i>	NT	F8S0Z7	65309,44	30	63,78	15152	18051	9922	-	-	26193
Venom phosphodiesterase 1	<i>Crotalus adamanteus</i>	PDE	J3SEZ3	98255,02	50	68,63	49159	501089	127011	168589	224442	89256
Venom nerve growth factor	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	VNGF	Q9DEZ9	27574,91	21	75,52	-	144885	8142	3691	-	96909
Snake venom metalloproteinase hemorrhagic factor 2	<i>Lachesis muta muta</i>	P-I SVMP	P22796	22937,98	11	84,00	70940	43374	144707	207345	10659	87058

Venom nerve growth factor 2	<i>Notechis scutatus scutatus</i>	VNGF	Q3HXY6	28194,53	16	78,69	6571	37865	23192	38258	-	54728
Zinc metalloproteinase/disintegrin	<i>Gloydius brevicaudus</i>	P-II SVMP	Q9YI19	54056,54	33	51,68	107740	126192	49427	15287	-	24951
Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-5	<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	KT	Q90W97	9373,39	3	69,88	-	-	38930	40496	123765	42228
<b>Snake venom serine protease catroxase-1</b>	<b><i>Crotalus atrox</i></b>	<b>SVSP</b>	<b>Q8QHK3</b>	<b>29309,28</b>	<b>11</b>	<b>52,67</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4729</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Venom nerve growth factor 2	<i>Naja sputatrix</i>	VNGF	Q5YF89	27486,61	11	57,26	13708	20771	35567	34947	64426	21282
Snake venom serine protease ussurase	<i>Gloydius ussuriensis</i>	KT	Q8UUJ1	26700,87	15	65,67	67715	36255	218493	49940	261462	3357
Disintegrin CV-11-alpha	<i>Cerastes vipera</i>	DIS	Q3BK16	12725,48	5	50,45	60060	11777	25243	-	-	-
Snake venom serine protease salmonase	<i>Gloydius brevicaudus</i>	SVSP	Q9PTL3	29548,47	10	65,76	67715	-	13565	49940	261462	3357
Disintegrin lebein-1-alpha	<i>Macrovipera lebetina</i>	DIS	P83253	12726,25	5	90,99	334566	425177	281589	242250	-	10570