JUAN DAVID GUTIÉRREZ MARÍN

Variações Ontogenéticas das Atividades Bioquímicas e Biológicas do Veneno da Serpente *Bothrops neuwiedi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2021

JUAN DAVID GUTIÉRREZ MARÍN

Variações Ontogenéticas das Atividades Bioquímicas e Biológicas do Veneno da Serpente *Bothrops neuwiedi*

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo

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

São Paulo

2021

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)

Gutiérrez Marín, Juan David Variações Ontogenéticas das Atividades Bioquímicas e Biológicas do Veneno da Serpente Bothrops neuwiedi / Juan David Gutiérrez Marín; orientadora Anita Mitico Tanaka Azevedo. -- São Paulo, 2021. 85 p. Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Bioquímica. 2. Biotecnologia. 3. Ontogenia. 4. Proteômica. 5. Venenos. I. Azevedo, Anita Mitico Tanaka, 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): Juan David Gutiérrez Marín

Título da Dissertação: Variações Ontogenéticas das Atividades Bioquímicas e Biológicas do Veneno da Serpente *Bothrops neuwiedi*.

Orientador: Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 20/10/2021 considerou o(a) candidato(a):

Assinatura: ..

(X) Aprovado(a) () Reprovado(a)

Instituição: Instituto Butantan

Examinador(a):

Examinador(a):

Examinador(a):

formanded re. 12 Porbe

Assinatura:[/].... Nome: Marcio Vinícius Bertacine Dias

Nome: Fernanda Calheta Vieira Portaro

Instituição: ICB-USP

founded reing Porbe

Assinatura: Nome: Rafael Stuani Floriano

Instituição: UOP

formand reins Porbe

Assinatura:¹ Nome: Anita Mitico Tanaka Azevedo

Instituição: Instituto Butantan

Presidente:

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Variação ontogenética das atividades bioquímica e biológica do veneno da serpente Bothrops neuwiedi", protocolada sob o CEUA nº 5453250718 (ID 001837), sob a responsabilidade de Anita Mitico Tanaka Azevedo e equipe; Karen de Morais Zani; Juan David Gutiérrez Marín; Lídia Jorge Tasima; Nathália da Costa Galizio; Sávio Stefanini SantAnna 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 do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 18/09/2019.

We certify that the proposal "Ontogenetic Variations of Biochemical and Biological Activities of Bothrops neuwiedi Snake Venom", utilizing 38 Reptiles (males and females), 100 Heterogenics mice (100 males), protocol number CEUA 5453250718 (ID 001837), under the responsibility of Anita Mitico Tanaka Azevedo and team: Karen de Morais Zani: Juan David Gutiérrez Marín: Lídia Jorge Tasima; Nathália da Costa Galizio; Sávio Stefanini SantAnna - 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 09/18/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2018 a 12/2020 Origem: Animais provenientes de outros estudos Espécie: Répteis sexo: Machos e Fêmeas idade: 0 a 20 anos N: 38 Linhagem: Bothrops neuwiedi Peso: 50 a 3000 g Origem: **Biotério** Central Espécie: Camundongos heterogênicos sexo: Machos idade: 2 a 4 semanas 100 N: Linhagem: Swiss Peso: 18 a 22 g

Área: Herpetologia

Local do experimento: Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

Comentários da CEUA: Protocolo com grau de invasividade 3, mas há um veterinário no grupo.

São Paulo, 02 de setembro de 2021

Atlaiie honor faino de Oliveire

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

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

Av. Vital Brasil, 1500 - Butantā 05503-900 São Paulo, SP - tel: 55(11) 3723-2132 - ramal 2132 Horário de atendimento: 2 ª a 6 ª das 09h às 11h e das 14h às 15h30 : e-mail: ceuaib@butantan.gov.br CEUA N 5453250718

ib butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Variação ontogenética das atividades bioquímica e biológica do veneno da serpente Bothrops neuwiedi (Continuação do protocolo 5453250718)", protocolada sob o CEUA nº 8116160321 (ID 002306), sob a responsabilidade de **Anita Mitico Tanaka Azevedo** *e equipe; Juan David Gutiérrez Marín* - 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 do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 26/05/2021.

We certify that the proposal "Ontogenetic Variations of Biochemical and Biological Activities of Bothrops neuwiedi Snake Venom (Continuation from protocol number 5453250718)", utilizing 100 Heterogenics mice (100 males), protocol number CEUA 8116160321 (ID 002306), under the responsibility of **Anita Mitico Tanaka Azevedo** and team; Juan David Gutiérrez Marín - 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 05/26/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

 Vigência da Proposta: de 06/2021 a 12/2021
 Área: Herpetologia

 Origem:
 Biotério Central

 Espécie:
 Camundongos heterogênicos
 sexo: Machos
 idade: 2 a 4 semanas
 N: 100

 Linhagem:
 Swiss
 Peso:
 18 a 22 g
 Peso:
 18 a 22 g

Local do experimento: Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

São Paulo, 02 de setembro de 2021

Atfaire honorfairo de Oliseire

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

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

"Raramente a verdade é pura, e nunca é simples."

Oscar Wilde

Agradecimentos

À minha mãe Fanny Marín, aquela mulher maravilhosa em quem me inspiro para ser uma pessoa melhor, quem amo como a ninguém e que sempre está aí para mim, todas minhas vitórias por pequenas que sejam também são tuas. Mas também agradeço à minha família toda, especialmente a minha tia, meus irmãos e meu pai, que sempre me motivaram para ir atrás dos meus sonhos, ainda separados pela distância, eles sempre estiveram presentes.

À minha orientadora a Dra. Anita M. Tanaka Azevedo, por ter aberto as portas do laboratório e por ter depositado sua confiança em mim, um estrangeiro que não conhecia em absoluto, esse ato gentil fez com que eu conseguisse oportunidades que não teria conseguido de outra forma. Sou muito grato por ter me orientado, escutado e ter me apoiado nesses três anos, com projetos loucos e incluso nos momentos difíceis. Agradeço muito ela por ter me orientado, animado a continuar com minha carreira científica, e por ser alguém com quem posso contar até para comprar sorvete de tapioca.

À minha amiga Johana Becerra, ela que sempre esteve para me apoiar e quem me ajudou em mais formas do que alguém poderia creditar desde que cheguei no Brasil. Essa amizade já é uma parte viva de mim, não faz ideia de quão grato eu sou com o universo por ter trazido você na minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, que mais do que colegas são meus amigos, acho que eles não sabem quão cálidos que podem ser, até o ponto de fazer um virar o dia ruim de uma pessoa para um bom dia que vale a pena. Além disso, são um grupo de trabalho maravilhoso, este trabalho tem uma fração de cada um deles.

A Nathália Galizio, uma pessoa maravilhosa e muito inteligente, com quem posso contar tanto para discutir sobre evolução quanto para jogar Overwatch. A Caroline Serino, quem é uma luz em momentos que as pessoas mais necessitam, ela é um pilar com que posso contar para me apoiar. Ao Weslei Aguiar, quem sempre consegue me entender, com quem ri, me queixei, fofoquei e aprendi. Ao Eduardo Lima, uma pessoa cheia de amor que faz com que as pessoas no seu redor se sentam cômodas. Ao Victor Koiti, com quem compartilho meu gosto pelo anime e sempre posso comentar. A Lídia Tasima, quem me ajudou bastante e sempre se mostrou disposta para apoiar. A Daniela Hatakeyama e Caroline Fabri, elas também me apoiaram em todo momento, nunca me deixaram sozinho quando precisei ajuda. A Daniel Carvalho, Luccas Padueli, Luisa Dias e tantas outras pessoas maravilhosas que estiveram aí no dia a dia para me apoiar.

À Dra. Karen de Morais Zani, quem se mostrou sempre disponível para me ajudar. À Dra. Kathleen Fernandes Grego, diretora do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, quem possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. Ao Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna, quem realizou as extrações do veneno e providenciou umas fotos maravilhosas de exemplares. A todo o pessoal de plantel do Laboratório de Herpetologia, por fazerem um incrível trabalho ao manter andando o laboratório. Ao Dr. Alexandre Tashima e seu aluno Jackson Miyamoto, pela sua colaboração e apoio que foram fundamentais para a análise de massas.

Agradeço ao Dr. Alexandre Tashima e Jackson Miyamoto da Univeridade Federal de São Paulo pela colaboração e ajuda sempre oportuna com a metodologia de espectrometria de massas.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e a Universidade de São Paulo. De igual forma, agradeço às secretárias Fabia e Eliane, graças à atenção delas foi possível resolver todas as questões se atravessaram no caminho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2018/25786-0), pelo apoio financeiro.

Às pessoas que deixei atrás sem saber que ia ser a última vez que ia estar com elas, porque tenho uma lembrança de todas elas, o apoio e animo que me deram para eu vir fazer este mestrado. Esta pequena conquista também é para vocês.

Resumo

GUTIÉRREZ MARÍN, J. D. Variações Ontogenéticas das Atividades Bioquímicas e Biológicas do Veneno da Serpente *Bothrops neuwiedi*. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os venenos de serpentes são misturas complexas de moléculas com uma alta variabilidade fenotípica que afeta o conteúdo proteico e sua funcionalidade, sendo a idade uma das variáveis que os afetam. Existem espécies de serpentes peçonhentas que ainda carecem de estudos abrangentes sobre o conteúdo de veneno, sendo a Bothrops neuwiedi uma delas. Com a finalidade de realizar uma descrição completa das mudanças ontogenéticas do veneno de B. neuwiedi, foi feita uma descrição do conteúdo proteico, das atividades biológicas e do reconhecimento imunológico por parte do soro antiofídico, usando venenos de serpentes de 5 grupos etários, sendo divididos em serpentes neonatas, serpentes de um ano, dois anos, três anos e senis. Foi possível observar variação dependente da idade da abundância de certas famílias de proteínas. As metaloproteases P-III e as CRISPs apresentaram maior abundância no grupo senil comparado com os grupos mais jovens no caso dos machos e fêmeas, respectivamente. As LTC apresentaram uma diminuição da abundância dependente da idade em ambos os sexos. A abundância de fosfolipases A2 D49 somente apresentou um aumento dependente da idade no grupo dos machos. Por outro lado, a atividade enzimática da fosfolipase A2 apresentou uma diminuição dependente da idade. Quanto à ação letal dos venenos, o das serpentes senis abateu os camundongos com maior velocidade, além de ser ligeiramente mais letal do que o veneno das serpentes jovens, porém, foram menos hemorrágicos, o que demonstra um diferente tipo de funcionalidade biológica por parte das proteínas. Já no imunorreconhecimento, o soro antibotrópico reconheceu sem maiores diferenças os venenos de diferentes idades, porém, a neutralização do veneno por parte do soro foi diferencial, uma vez que ao se comparar a neutralização in vivo do veneno de serpentes de um ano e serpentes senis encontrou-se que é necessária uma quantidade maior de soro para neutralizar os efeitos do veneno das serpentes jovens. Conclui-se que o veneno de B. neuwiedi possui variações ontogenéticas com relação à sua composição e funcionalidade em características específicas, além do fato de precisar desenvolver melhores alternativas do tratamento antibotrópico para atender os acidentes ocasionados com serpentes de diferentes faixas etárias.

Palavras-chave: Ontogenia. B. neuwiedi. Veneno. Proteoma. Acidente ofídico.

Abstract

GUTIÉRREZ MARÍN, J. D. **Ontogenetic Variations of the Biochemical and Biological Activities of** *Bothrops neuwiedi* **snake venom.** 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Snake venoms are complex mixtures of molecules with a high phenotypic variability that affects protein content and functionality, likewise, it is also known that age is one of the factors that influence these variations. There are species of venomous snakes that still lack comprehensive studies on their venom content, with *Bothrops neuwiedi* being one of them. In order to provide a complete description of the ontogenetic changes of B. neuwiedi's venom, it was made a description of the protein content, biological activities and immunological recognition by the antivenom serum, using snake venoms from 5 age groups, being divided into neonate snakes, one year old, 2 years old, 3 years old and senile snakes. It was possible to observe age-dependent variation in the abundance of certain protein families. P-III metalloproteases and CRISPS showed greater abundance in the senile group compared to younger groups among the males and females, respectively. CTL showed an age-dependent decrease in abundance in both sexes. The abundance of phospholipases A₂ D49 only showed an agedependent increase in the male group. On the other hand, the phospholipase activity showed an agedependent decrease. Concerning the lethal activity, the senile snake venom killed mice speeder than venom from youngest snakes, in addition to being slightly more lethal, however, it was less hemorrhagic, which demonstrates a different type of biological functionality on the part of proteins. In immunorecognition, the antibothropic serum recognized without major differences the venoms of different ages, however, the neutralization of the venom by the serum was differential, since when comparing the *in vivo* neutralization of the venom from one year old snakes and senile snakes it was found that a larger amount of serum is needed to neutralize the effects of the venom from younger snakes. It is concluded that the B. neuwiedi venom has ontogenetic variations in relation to its composition and functionality in specific characteristics, in addition to the fact that it needs to develop better alternatives for antibothropic treatment to attend accidents caused by snakes of different age groups.

Keywords: Ontogeny. B. neuwiedi. Venom. Proteome. Snake bite.

Lista de ilustrações

Figura 1. Bothrops neuwiedi e a sua distribuição geográfica no Brasil. A) B. neuwiedi fêmea adulta. B) B. neuwiedi macho adulto. C) B. neuwiedi macho (filhote). C) Distribuição geográfica de B. neuwiedi, a área que habita a espécie está marcada em vermelho, a área marcada em amarelo indica a distribuição de uma outra espécie do complexo neuwiedi (B. erythromelas), a área marcada em azul ciano indica a região em que as duas espécies mencionadas são simpátricas. Fotos de B. neuwiedi: Sávio Stefanini Sant'Anna. Mapa distribuição geográfica: da Santoro et al.. 2015......23

Figura 4. Perfil cromatográfico de proteínas do veneno de *Bothrops neuwiedi* macho senil em coluna C18. Esquema de eluição: primeiros 5 minutos foi injetado no sistema uma solução de acetonitrila 95% contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (solução B), a uma concentração do 5% em solução de TFA 0,1% (solução A); seguido por um aumento de 5 para 25% da solução B por 10 minutos; em seguida, um aumento de 25 para 45% da solução B por 60 minutos; um aumento de 45 a 70% da solução B por 10 minutos; e, finalmente, um aumento de 70 para 100% da solução B nos últimos 10 minutos. Cada pico foi manualmente coletado e submetido a SDS-PAGE, em condições redutoras. Os picos 1 a 17 foram submetidos em SDS (15%) e os picos 18 a 27 em SDS 12%. São indicadas as

 Figura 16. Titulação de anticorpos do soro antibotrópico por ELISA dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo. O cálculo da titulação de anticorpos é realizado a partir do valor da diluição

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

- °C Graus Celsius
- $\mu g-Microgram as$
- $\mu L Microlitro$
- ANOVA Análise de variância
- B. alternatus Bothrops alternatus
- B. atrox Bothrops atrox
- B. asper Bothrops asper
- B. erythromelas Bothrops erythromelas
- B. jararaca Bothrops jararaca
- B. jararacussu Bothrops jararacussu
- B. leucurus Bothrops leucurus
- B. moojeni Bothrops moojeni
- B. neuwiedi Bothrops neuwiedi
- CaCl₂ Cloreto de cálcio
- CEUAIB Comitê de ética no uso de animais do Instituto Butantan
- CGP Cliclotransferase glutamil peptídica
- $CoCl_2 Cloreto$ de cobalto
- CO2 Dióxido de carbono
- CRISP Proteína secretora rica em cisteína
- CTL Lectina tipo C
- DE50 Dose efetiva média
- DIS Disintegrina
- DL₅₀ Dose letal média

DMC – Dose Mínima Coagulante

- DMH Dose Mínima Hemorrágica
- DTT-Ditiotreitol
- ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
- H Horas
- H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄ Ácido sulfúrico
- HCl Ácido clorídrico
- HPLC Cromatografía líquida de alta eficiência
- HYA-Hialuronidase
- IAA Iodoacetamida
- FAntiH Fator anti-hemorrágico
- KCl-Cloreto de potássio
- kDa Quilo daltons
- LAAO L-aminoácido oxidase
- LTC Lecitinas tipo C
- M-Molar
- N-Neonatos
- MS Mass spectrometry
- MS/MS Tandem mass spectrometry
- mg Miligrama
- $\min-Minutos$
- mM-Milimolar
- PDE Fosfodiesterase

NaCl - Cloreto de sódio Nmol – Nanomol NOBA - 4-nitro-3-octanoloxy ácido benzóico NUC - Nucleotidase PBS - Tampão fosfato salino pH - Potencial hidrogeniônico PLA₂-Fosfolipase A₂ PLA₂ D49 – Fosfolipase A₂ com ácido aspártico na posição 49 PLA₂ K49 – Fosfolipase A₂ com lisina na posição 49 RP-HPLC - Cromatografía líquida de alta eficiência em fase reversa S – Senis SDS – Dodecil sulfato de sódio SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS SVMP – Metaloprotease SVSV - Serinoprotease TCA - Ácido tricloroacético TFA – Ácido trifluoroacético Tris - Tris(hidroximetil)aminometano VNGF - Fator de crescimento neuronal

SUMÁRIO

1	In	tro	lução	22
2	0	bjet	ivos	28
	2.1	0	bjetivo geral	28
	2.2	0	bjetivos específicos	28
3	Μ	[atei	rial e métodos	29
	3.1	А	nimais e amostras	29
	3.	1.1	Venenos	29
	3.	1.2	Soro antiofídico	29
	3.2	С	aracterização proteica do veneno	30
	3.2	2.1	Eletroforese em gel unidimensional	30
	3.2	2.2	Cromatografia líquida de alta eficiência	30
	3.2	2.3	Espectrometria de massas (MS/MS)	30
	3.3	С	aracterização bioquímica do veneno	33
	3	3.1	Atividade L-amino ácido oxidase	33
	3	3.2	Atividade fosfolipase A ₂	33
	3	3.3	Atividade caseinolítica	34
	3	3.4	Atividade colagenolítica	34
	3	3.5	Zimografia	34
	3	3.6	Atividade coagulante	35
	3.4	А	tividade biológica do veneno	35
	3.4	4.1	Atividade hemorrágica	35
	3.4	4.2	Dose letal média	36
	3.5	А	nálise de reconhecimento imunológico do veneno	36
	3.:	5.1	Western blotting	36
	3.5	5.2	ELISA	37
	3.5	5.3	Dose efetiva média	37
	3.6	Α	nálise estatística	38
4	R	ESU	JLTADOS	39
	4.1	С	aracterização proteica do veneno	.39
	4.	1.1	Eletroforese em gel unidimensional (SDS-PAGE)	39

	4.1.2	Cromatografia líquida de alta eficiência40				
	4.1.3	Espectrometria de massas (MS/MS)				
4	.2 0	Caracterização bioquímica do veneno46				
	4.2.1	Atividade de LAAO				
	4.2.1	Atividade de PLA ₂				
	4.2.2	Atividade caseinolítica				
	4.2.3	Atividade colagenolítica				
	4.2.4	Zimografia				
	4.2.5	Atividade coagulante				
4	.3 C	Caracterização biológica do veneno51				
	4.3.1	Atividade hemorrágica				
	4.3.2	Dose letal média				
4	.1 A	nálise de reconhecimento imunológico do veneno53				
	4.1.1	Western blotting				
	4.1.2	<i>ELISA</i>				
	4.1.3	Dose efetiva média				
5	Discu	ssão				
6	Conc	l usões				
7	Refer	ências bibliográficas				
Apêndices						

1 Introdução

O acidente ofídico é uma intoxicação causada pela inoculação de veneno pela picada de uma serpente, que ocorre em muitos países tropicais e subtropicais e é classificada como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (CHIPPAUX, 2017). Aproximadamente entre 4,5 e 5,4 milhões pessoas são picadas por serpentes anualmente no mundo, sendo que aproximadamente 2,7 milhões desses casos são considerados como acidente por envenenamento ofídico e precisam de atenção clínica, dos quais aproximadamente entre 80 mil a 125 mil casos levam ao óbito e, o número de casos que acabam em morbidades e incapacidades permanentes é o triplo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Já no caso do Brasil, a média de acidentes é de 24 mil por ano, e só no ano 2019 houveram 152 óbitos (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN NET, 2021). Embora número de acidentes é elevado, menos do 0,5% destes casos acabam no óbito. A baixa proporção de mortes ocasionadas por acidentes ofídicos ocorre devido à existência da soroterapia, que é o único tratamento existente (BON, 1996; GUTIÉRREZ et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A terapia antiveneno, baseada na soroterapia, foi desenvolvida na última década do século 19, e embora tenha tido melhorias tecnológicas ao longo da sua existência, ela é essencialmente a mesma até o dia de hoje (BON, 1996; CUNHA, 2017). Ela é, basicamente, a administração intravenosa de antivenenos específicos, os quais são soros contendo anticorpos ou fragmentos de anticorpos purificados do plasma de grandes mamíferos (geralmente cavalos, mas também ovelhas, cabras ou coelhos), que foram imunizados previamente com inoculações de venenos em doses sub letais (BERMÚDEZ-MÉNDEZ et al., 2018; GUTIÉRREZ; LEÓN; BURNOUF, 2011). Doses adicionais de inóculos são feitos durante meses, com doses crescentes, sendo estes inóculos uma mistura de venenos de diferentes espécies, produzindo um antiveneno poliespecífico (LALLOO; THEAKSTON, 2003; THEAKSTON; REID, 1983).

Já no Brasil, a família Viperidae e a família Elapidae são os dois grupos de serpentes peçonhentas que habitam o país, sendo que Viperidae está representada pelos gêneros *Bothrops, Bothrocophias, Crotalus* e *Lachesis* (BÉRNILS; COSTA, 2015). O gênero *Bothrops* é o principal responsável pelos acidentes ofídicos no país, sendo que no 2019 aproximadamente um 85% dos

22

acidentes totais foram atribuídos a este gênero (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN NET, 2021), mostrando que *Bothrops* possui uma grande relevância para a saúde pública.

Figura 1. Bothrops neuwiedi e a sua distribuição geográfica no Brasil. A) *B. neuwiedi* fêmea adulta. B) *B. neuwiedi macho* adulto. C) *B. neuwiedi* macho (filhote). C) Distribuição geográfica de *B. neuwiedi*, a área que habita a espécie está marcada em vermelho, a área marcada em amarelo indica a distribuição de uma outra espécie do complexo neuwiedi (*B. erythromelas*), a área marcada em azul ciano indica a região em que as duas espécies mencionadas são simpátricas. Fotos de *B. neuwiedi*: Sávio Stefanini Sant'Anna. Mapa da distribuição geográfica: Santoro *et al.*, 2015.



As espécies do gênero *Bothrops* são abundantes, com uma ampla distribuição geográfica, uma vez que elas conseguiram colonizar com sucesso a maior parte do território sul-americano (MELGAREJO, 2009; WÜSTER et al., 2008). Uma destas espécies é *Bothrops neuwiedi* (Wagler, 1824), ela é uma espécie que habita os estados de Bahia, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Paraná (GUEDES; NOGUEIRA; MARQUES, 2014; SANTORO et al., 2015). *B. neuwiedi* pertencia incialmente a um complexo de espécies, conhecido como popularmente complexo neuwiedi (DO AMARAL, 1925; SILVA; RODRIGUES, 2008). Após longa discussão taxonômica e filogenética, culminou com a divisão desse complexo em 7 espécies levando em consideração caracteres morfológicos (DA SILVA; RODRIGUES, 2008), sendo elas *B. neuwiedi, B. diporus, B. lutzi, B. mattogrossensis, B. pauloensis, B. pubescens* e *B. marmoratus*.

B. neuwiedi (Figura 1) é uma serpente terrestre que mostra preferência por áreas abertas, sendo que a maioria dos seus registros ocorrem na Mata Atlântica e Cerrado, adicionalmente, se tem limitados registros na Caatinga (GUEDES; NOGUEIRA; MARQUES, 2014). Atualmente é considerado que esta espécie possui uma dieta especialista de pequenos mamíferos, porém tem sido reportada a ingestão de outras pressas, como rãs e lagartos (GUEDES; NOGUEIRA; MARQUES, 2014; MARTINS, M., MARQUES, O. A. V., SAZIMA, 2002).Como dito anteriormente, *Bothrops* é o principal responsável pelos acidentes ofídicos na América do Sul, e devido à alta incidência de acidentes com espécies de *Bothrops*, o envenenamento botrópico é considerado um grande problema de saúde pública no Brasil (LOPES-DE-SOUZA et al., 2019; MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2016). O envenenamento causado por esse gênero é caracterizado por importantes danos teciduais locais, incluindo hemorragia, necrose e edema, além de distúrbios na coagulação sanguínea (CAMEY; VELARDE; SANCHEZ, 2002; MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2016). Em ocasiões, esses efeitos podem ser atribuídos a componentes específicos do veneno, porém, é usual que diferentes toxinas ajam de forma sinérgica, fazendo com que várias toxinas estejam implicadas em um mesmo processo (FRANÇA; MALAQUE, 2009).

Os venenos de serpentes são conjuntos diversos de compostos bioativos, também chamados de coquetéis complexos (CASEWELL et al., 2013). Aproximadamente 90% do peso seco dos venenos é constituído por proteínas, que no caso do veneno de *Bothrops*, estas proteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos: As enzimas, sendo elas serinoproteases (SVSPs), metaloproteases (SVMPs), L-aminoácido oxidases (LAAOs), fosfolipases (PLA₂s), e as proteínas sem atividade enzimática, como disintegrinas (DIS), lectinas tipo C (LTC), toxinas CRISP, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, fatores de crescimento neural e endotelial, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; FRY; WÜSTER, 2004; FRY, 2005; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; MARKLAND, 1998; SERRANO et al., 2005). A função mais comum destas toxinas normalmente é subjugar (mediante imobilização) e abater a presa, a fim de conseguir ingerir a mesma de forma segura e eficaz (RICHARDS;

BARLOW; WÜSTER, 2012). Além da subjugação da presa, os venenos de serpentes também são usados como recurso para defesa e para levar a cabo a digestão da presa (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; KAZANDJIAN et al., 2021).

As metaloproteases (SVMPs) são enzimas que estão envolvidas em diversos processos do envenenamento, tais como a inibição de agregação plaquetária, degradação de fatores da cascata da coagulação sanguínea, a formação de edema e hemorragia. (FOX; SERRANO, 2005; TEIXEIRA et al., 2005). As SVMP do veneno de serpentes são classificadas em três classes: As SVMP P-I, que apresentam apenas o domínio proteinase, as SVMP P-II que apresentam tanto o domínio proteinase como um domínio disintegrina, e as SVMP P-III que apresentam, além dos domínios proteinase e disintegrina, um domínio rico em cisteína (FOX; SERRANO, 2005, 2008).

As serinoproteases (SVSPs) encontram-se no veneno de praticamente todas as espécies de viperídeos. Especificamente em *Bothrops*, as SVSPs podem chegar a representar aproximadamente o 15% do proteoma do veneno da maioria das espécies do gênero (SOUSA et al., 2013; TASOULIS; ISBISTER, 2017). Essas enzimas de atividade proteolítica apresentam ações farmacológicas relacionadas à hemostasia, sendo que possuem diferentes atividades, tais como fibrinogenólise, ativação do fator V, atividade trombina-símile, ativação da proteína C, ativação do plasminogênio e indução da agregação plaquetária (MENALDO et al., 2013; PÉREZ et al., 2007).

As L-Aminoácido Oxidases (LAAOs) possuem uma massa molecular entre 110 e 150 kDa, são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos livres em alfacetoácidos, produzindo amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como compostos secundários (TAN; FUNG, 2008). Devido ao seu potencial citotóxico sobre diversos patógenos e linhagens celulares tumorais, as LAAOs são de grande interesse científico (DU; CLEMETSON, 2002; LEE et al., 2011; SUN et al., 2010). Acredita-se que os efeitos das LAAOs devem-se aos efeitos secundários do H_2O_2 produzido pela enzima, uma vez ele induz a apoptose celular, agindo assim como um auxiliador no processo de envenenamento (ANDE et al., 2006; DU; CLEMETSON, 2002; RODRIGUES et al., 2009).

As fosfolipases (PLAs) são uma família de enzimas que realizam a clivagem de fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios. As PLAs mais abundantes no veneno de serpentes são as fosfolipases A₂ (PLA₂s), elas são enzimas de aproximadamente 14 kDa, e é conhecido que suas funções no envenenamento abrangem diversos efeitos, tais como inflamação, formação de edema, hemorragia, miotoxicidade, neurotoxicidade, e ação anticoagulante (DE PAULA et al., 2009; KINI, 2003; KINI; EVANS, 1989). Adicionalmente, as PLA₂s do veneno de serpentes são classificadas em dois grupos, um deles é o das PLA₂ D49, que possuem um ácido aspártico na posição 49, e o outro grupo é das PLA₂s K49, que apresentam uma lisina na posição 49, sendo que as primeiras apresentam atividade enzimática, enquanto as PLA₂s K49 não apresentam dita atividade, porém, tem sido reportado que estão relacionadas na atividade miotóxica no veneno (KANASHIRO et al., 2002).

A evolução da função dos venenos de serpente e a diversificação das suas toxinas tem sido foco de pesquisa e debate (FRY et al., 2003). É sabido que os venenos de serpentes apresentam uma grande variabilidade, a qual pode ocorrer tanto ao nível intra quanto o interespecífico, de acordo com diversos fatores que a influenciam, sendo alguns dos principais: sazonalidade, distribuição geográfica, sexo e idade (AMORIM et al., 2018; BARLOW et al., 2009; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; FURTADO; COLLETTO; SILVA, 1991; QUEIROZ et al., 2008; TAN et al., 2017; WILLIAMS; WHITE, 1992). Essas variações têm sido objeto investigação tanto para descrever os diferentes fenótipos de venenos, quanto na busca de um melhoramento na produção de soros antiofídicos e de novos produtos de interesse biotecnológicos (FURTADO; COLLETTO; SILVA, 1991; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006).

As variações ontogenéticas da composição do veneno são observadas em diferentes espécies de serpentes (ANDRADE; ABE, 1999; CALVETE, 2017; DA SILVA AGUIAR et al., 2020; GIBBS et al., 2011; HATAKEYAMA et al., 2021; MACKESSY, 1988; PLA et al., 2017; ROKYTA et al., 2017; ZELANIS et al., 2009). Em algumas espécies, o veneno de indivíduos jovens resulta ter uma maior toxicidade do que o veneno de adultos, os quais apresentam uma maior atividade proteolítica, como o caso de *Crotalus durissus* (GUTIÉRREZ et al., 1991). Já no caso de *Bothrops*, estudos recentes têm comparado as variações do veneno em diferentes faixas etárias. Por exemplo, *B. asper* apresentou uma maior abundância de PLA₂ K49 nos indivíduos adultos, assim como de SVMP P-I, em contraste com os indivíduos jovens que apresentaram uma maior quantidade de SVMP P-III (MORA-OBANDO et al., 2020). No caso de *B. jararacussu*,

também foi observado o aumento da PLA₂ K49, em um padrão dependente de idade, assim como a atividade miotóxica foi maior nos adultos, comparando com os juvenis, que apresentaram maior atividade colagenolítica (DA SILVA AGUIAR et al., 2020).

Tem sido demonstrado que o veneno dos filhotes de espécies do gênero *Bothrops* apresentam maior atividade coagulante em relação ao dos indivíduos adultos, sendo que em algumas ocasiões os adultos podem apresentar uma maior atividade proteolítica (ANDRADE; ABE, 1999; FURTADO et al., 1991; GUÉRCIO et al., 2006; KAMIGUTI, 1988; PEREIRA, 2006). Por outro lado, foi observado que filhotes de *B. jararacussu* possuíam maior atividade hemorrágica e coagulante do que os venenos de adultos, sendo que estes últimos apresentaram um aumento de atividade de PLA₂ (DA SILVA AGUIAR et al., 2020). Além disso, foi observado que acidentes ofídicos ocasionados por serpentes filhotes de *B. atrox* apresentaram-se mais hemorrágicos do que os acidentes com serpentes adultas da mesma espécie (NASCIMENTO DA COSTA et al., 2020), o que demonstra que as variações ontogenéticas na composição do veneno também são relevantes no acidente ofídico.

Porém, embora tenham sido descritas mudanças ontogenéticas do veneno para várias espécies de *Bothrops*, a variação ontogenética do veneno de *B. neuwiedi* ainda não foi estudada. Desta forma, o objetivo deste trabalho é estudar a influência da ontogenia na variação da composição e atividades do veneno da serpente *B. neuwiedi*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo analisar a composição proteica e as atividades do veneno da serpente *Bothrops neuwiedi* em diferentes faixas de idade, comparando tais aspectos entre os diferentes grupos de idade e sexo.

2.2 Objetivos específicos

- 2.1.1 Descrever o conteúdo proteico do veneno por meio de SDS-PAGE, cromatografia líquida de alta performance e análise por espectrometria de massas;
- 2.1.2 Mensurar as atividades enzimáticas, tais como de L-amino ácido oxidase, fosfolipásica, proteolítica, coagulante;
- 2.1.3 Mensurar as atividades biológicas, sendo elas atividade hemorrágica e sua letalidade;
- 2.1.4 Analisar o imunorreconhecimento do veneno pelo soro antibotrópico por meio de ELISA, *western blotting* e teste de dose efetiva.

3 Material e métodos

3.1 Animais e amostras

3.1.1 Venenos

Os venenos foram extraídos de espécimes de serpente *B. neuwiedi* mantidos em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, todos eles nascidos em cativeiro, com exceção de três indivíduos provenientes da natureza entre os anos 2008 e 2009. As serpentes foram alimentadas com camundongos, no caso dos filhotes a alimentação é feita a cada duas semanas e, uma vez consideradas adultas, a cada 30 dias. Todas as serpentes são mantidas em ambientes com temperatura controlada entre os 23 e 26 °C (GREGO et al., 2021).

As extrações foram realizadas uma semana após a alimentação. Previamente à extração, as serpentes foram colocadas em uma câmara com CO_2 e deixadas entre 4 a 10 minutos para serem anestesiadas, a fim de reduzir o estresse animal e a probabilidade de acidente por picada (GREGO et al., 2021). Todas as amostras extraídas foram analisadas em forma de *pool*, os *pools* foram feitos considerando tanto o sexo quanto a idade, para isso foram estabelecidos cinco grupos etários: (1) neonatos, (2) animais de idade abaixo de um ano, (3) abaixo de 2 anos, (4) abaixo de 3 anos e (5) senis (serpentes a partir dos 9 anos) porém, devido à ausência de nascimento de fêmeas na ninhada usada para o grupo de neonatos, não foi possível atingir o grupo de fêmeas neonatas, totalizando 9 *pools* de veneno. Os *pools* foram centrifugados para remover escamas e células, depois foram liofilizados e armazenados a -20 °C.

3.1.2 Soro antiofídico

O soro antibotrópico foi fornecido pelo Instituto Butantan, o qual é produzido mediante hiperimunização de cavalos com doses subletais de uma amostra composta por veneno de diferentes espécies, sendo elas *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. alternatus* (12,5%) e *B. moojeni* (12,5%) e complexo neuwiedi (12,5%). Os venenos usados do complexo neuwiedi são das espécies *B. neuwiedi*, *B. pauloensis*, *B. matogrossensis* e *B. marmoratus*. O sangue dos cavalos é então extraído e o soro é purificado. Sendo que cada 1 mL do soro neutraliza 5 mg de veneno de referência de *B. jararaca*. Cada ampola de 10 mL (solução fisiológica 0,85%) contém a Fração F(ab')₂ de imunoglobulinas heterólogas, com a capacidade de neutralizar no mínimo 50

mg do veneno de referência, além de máximo 35 mg de fenol. O soro é transportado e mantido à temperatura entre 2 e 8 °C até o seu uso.

3.2 Caracterização proteica do veneno

3.2.1 Eletroforese em gel unidimensional

Eletroforese em gel unidimensional foi realizada para comparar os perfis de proteínas do veneno em condições redutoras e não redutoras. Resumidamente, 10 μ L de tampão de amostra (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, glicerol 50%, SDS 10%, de azul de bromofenol 0,1%) com ou sem 2-mercaptoetanol (5%), foram adicionados a 20 μ g de veneno. As amostras a serem analisadas em condições redutoras (com 2-mercaptoetanol) foram então incubadas a 100 °C por 7 minutos (LAEMMLI, 1970). As diluições foram aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida 15% seguindo as instruções do fabricante. Os géis foram fixados com solução de ácido acético 7% e etanol 70% por uma hora. Finalmente, eles foram corados com Coomasie Blue G.

3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Setenta e cinco μ g de veneno liofilizado diluído em 75 μ L de NaCl 0,85% (1 mg / 1 mL) foram centrifugados por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante resultante foi então aplicado a uma coluna C18 (Teknokroma Europa - 0,4 cm x 25 cm, partículas de 5 μ m e poros de 300 Å) no sistema JASCO. Foram usadas duas soluções, a primeira delas composta por ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (solução A) e a segunda acetonitrila 95% contendo TFA 0,1% (solução B). As proteínas foram eluídas usando o seguinte gradiente: Nos primeiros 5 minutos foi injetada no sistema a solução B a uma concentração de 5% em solução A; seguido por um aumento de 5 para 25% da solução B por 10 minutos; em seguida, um aumento de 25 para 45% da solução B por 60 minutos; um aumento de 45 a 70% da solução B por 10 minutos; e, finalmente, um aumento de 70 para 100% da solução B nos últimos 10 minutos (CALVETE et al., 2011).

3.2.3 Espectrometria de massas (MS/MS)

A análise proteômica dos venenos de cada grupo foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Alexandre Keiji Tashima, no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Devido à pouca disponibilidade de amostra, não foi possível analisar veneno de neonato mediante esta metodologia.

3.2.3.1 Digestão enzimática, dessalinização e limpeza das amostras

Cem µg de veneno liofilizado foram dissolvidos em NH₄HCO₃ 50 mM e incubados com surfactante RapiGest 0,2% (Waters) a 80 °C por 15 minutos, seguido por centrifugação a 2000 *g* por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram reduzidas com DTT (GE Healthcare) 5 mM por 30 min a 60 °C, alquiladas com IAA (GE Healthcare) 15 mM por 30 min no escuro em temperatura ambiente e reincubadas com DTT em temperatura ambiente por 15 min. As digestões de tripsina (Promega) foram realizadas usando uma proporção de enzima para proteína de 1:100 e incubadas a 37 °C por 30 min, seguindo as instruções do fabricante. Foi adicionado às amostras ácido trifluoroacético (TFA) na concentração final de 0,7% para interromper a digestão e clivar o surfactante RapiGest. As amostras foram submetidas à extração em fase sólida com *stage tips* C18 e eluídas com 40% de acetonitrila (RAPPSILBER; MANN; ISHIHAMA, 2007). As *stage tips* foram montadas com resina InertSep RP-C18 (GL Sciences) e membrana SDB-XC (Empore, 3M) dentro das pontas de pipeta P200. Os eluidos foram secos em um concentrador a vácuo (Concentrator Plus, Eppendorf) e armazenados a -20 ° C até a análise por MS.

3.2.3.2 <u>Proteômica quantitativa – aquisição de espectrometria de massa (LC-MS / MS)</u>

As análises LC-MS/MS foram realizadas no sistema cromatográfico nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massa Synapt G2 HDMS (Waters). As amostras (10 μ g) foram injetadas em uma coluna trap (Coluna Trap Acquity UPLC M-Class Symmetry C18, 100 Å, 5 μ m, 300 μ m x 25 mm, Waters) a 8 mL / min de água deionizada, contendo 5% acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico, por 5 min. Em seguida, a mistura de peptídeos capturados foi eluída em uma coluna analítica (coluna Acquity UPLC M-Class HSS T3, 1,8 μ m, 300 μ m x 150 mm, Waters) com um gradiente de 5-35% da fase B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), fase A (0,1% de ácido fórmico em água deionizada) ao longo de 60 min a uma taxa de fluxo de 3 μ L/min. Os dados de MS foram adquiridos no modo independente de dados (DIA), usando separação por mobilidade iônica UDMSE (DISTLER et al., 2014), na faixa m/z de 50-2000, e configurados no modo de resolução. Os íons de peptídeo foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), em que as energias de colisão foram alternadas entre baixa (4 eV) e alta (com rampa de 17 a 60

eV) para íons precursores e íons fragmento, respectivamente, usando tempo de varredura de 1,0 s. A fonte ESI foi operada no modo positivo com uma voltagem capilar de 3,0 kV, temperatura de bloco de 100 °C e voltagem do cone de 40 V. A temperatura da coluna foi ajustada para 55 °C e as amostras foram mantidas em amostrador automático a 10 °C. Para calibração do sistema, uma solução de [Glu1]-Fibrinopeptídeo B (500 fmol/mL em 50% de metanol, 0,1% de ácido fórmico; Peptídeo 2.0) foi infundida através do pulverizador de referência a 2 mL / min e amostrada a cada 60 s para externo calibração (PEDROSO et al., 2017).

3.2.3.3 Processamento de dados e identificação de proteínas

A quantificação Label-free (LFQ) foi realizada em Progenesis QI para proteômica (NonLinear Dynamics, Newcastle, UK), conforme relatado anteriormente (ABREU et al., 2017; CâMARA et al., 2020). Os arquivos foram carregados no *software* e as amostras foram alinhadas com base nos tempos de retenção dos íons precursores da corrida de referência, que foi escolhido automaticamente. Parâmetros de seleção de pico padrão foram aplicados. Os dados de MS foram processados pelo módulo Apex3D usando um limite de baixa energia de 750 contagens e limite de alta energia de 50 contagens. Os espectros de MS/MS foram exportados como arquivo .mgf para identificação de proteínas no PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solution Inc.) e executados em comparação a sequências de Viperidae do UniprotKB/Swissprot (www.uniprot.org; revisado; 1.329 sequências; baixado em maio 13, 2021). Os parâmetros de pesquisa foram definidos da seguinte forma: tolerância de massa de 10 ppm para íons precursores e 0,025 Da para íons de fragmento, até dois locais de clivagem perdidos permitidos para digestão de tripsina, FDR de 1% no nível de peptídeo e mínimo de 1 peptídeo único por proteína. Os resíduos de carbamidometil cisteína foram selecionados como modificação fixa, acetilação N-terminal, oxidação de metionina e desamidação de asparagina/glutamina como modificações variáveis.

Os resultados da identificação foram então reimportados para o arquivo .pepXml da Progenesis. A quantificação proteica foi realizada utilizando-se os 3 peptídeos mais abundantes, como descrito por silva (SILVA et al., 2006).

3.3 Caracterização bioquímica do veneno

Para atender o segundo objetivo específico (mensurar as atividades enzimáticas do veneno nas diferentes faixas etárias) foram realizadas as seguintes provas:

3.3.1 Atividade L-amino ácido oxidase

A atividade da L-aminoácido oxidase (LAAO) do veneno foi determinada de acordo com o procedimento já descrito (KISHIMOTO; TAKAHASHI, 2001). Foi feita uma solução de reação composta por 10 mL de Tris 50 mM, L-metionina 250 mM, peroxidase de rábano 0,8 U / mL e ofenilenodiamina 2 mM. Dez μ L de cada veneno resuspendido em solução salina (NaCl 0,85%) (1 mg / 1 mL) foram colocados em uma microplaca de 96 poços, então foram adicionados a 90 μ L da solução de reação, a placa foi incubada por 1 h a 37 °C. A absorbância foi medida a 492 nm após incubação em um leitor de microplacas SpectraMax. Uma curva padrão foi feita usando uma diluição em série de H₂O₂. Uma unidade de atividade LAAO foi expressa como nM H₂O₂ / mg / min. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3.3.2 Atividade fosfolipase A₂

A atividade fosfolipásica foi determinada de acordo com Holzer e Mackessy (MACKESSY; HOLZER, 1996). Em placas de microtitulação foram colocados 40 µL de cada veneno ressuspendido em solução salina 0,85% %) (1 mg / 1 mL), depois foram adicionados em cada poço 200 µL de solução de Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0, e finalmente foram adicionados 20 µL do substrato NOBA (ácido 4-nitro-3-[octanoyloxy] benzoico 4,16 mM diluído em acetonitrila). A placa foi incubada por 60 min a 37 °C. A absorbância da reação foi mensurada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices) utilizando-se o comprimento de onda de 425 nm. É definido que o aumento de 0,1 unidade de absorbância corresponde a 25,8 nM de cromóforo liberado (ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzoico). A atividade específica foi expressa como nano moles de cromóforo produzidos por mg de veneno por minuto (nmol/mg/min). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.3 Atividade caseinolítica

Neste estudo, Azocaseína (Sigma-Aldrich) foi usada como substrato para determinar a atividade caseinolítica. Cada 4,24 mg de Azocaseína foram diluídos em 1 mL de tampão Tris-HCl (Tris 100 mM, CaCl₂ 10 mM, pH = 8,8), de acordo com Wang e Huang (WANG; HUANG, 2002). Oitenta e cinco μ L da mistura foram colocados em microtubos individuais de 1,5 mL e, depois, foram adicionados 10 μ L de cada veneno ressuspendido (1 mg/mL em NaCl 0,85%). Em seguida a mistura foi incubada a 37 °C por 90 minutos. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 5%, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 5 minutos. Alíquotas de 100 μ L do sobrenadante de cada microtubo foram colocadas em uma microplaca, em seguida se adicionarão 100 μ L de NaOH e, por fim, a absorbância foi medida a 450 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade caseinolítica é definida como a quantidade de veneno que produz um aumento de 0,005 por minuto na leitura.

3.3.4 Atividade colagenolítica

Para quantificar a atividade proteolítica sobre o colágeno, foi seguido o procedimento de Antunes (ANTUNES et al., 2010) com modificações. Sucintamente, foi preparada uma solução de substrato consistindo em 5 mg de Azocoll para cada 1 mL de solução Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, HEPES 10 mM, dextrose 5,6 mM, MgCl2 1 mM, CaCl₂ 2 mM, pH = 7,4). Foram colocadas 50 μ L dessa solução de substrato em microtubos individuais de 1,5 mL para cada amostra, em seguida foram adicionados 193,8 μ L de Tyrode a cada tubo e, por fim, 6,25 μ g de veneno (1 mg de veneno em 1 mL de NaCl 0,85%). As amostras foram incubadas a 37 °C em equipamento Thermomixer (Kasvi), a 1200 rpm por 1 h. A reação foi interrompida com banho de gelo por 5 min. Então os tubos foram centrifugados a 5000 x g por 3 min. Finalmente, alíquotas de 200 μ L do sobrenadante de cada tubo foram retiradas e colocadas em uma microplaca para medir a absorbância a 540 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3.3.5 Zimografia

Amostras de veneno de 20 µg foram submetidas à SDS-PAGE em géis de SDS-poliacrilamida a 15% contendo 2 mg / mL de substrato (caseína de leite bovina para um teste e gelatina para outro) sob condições não redutoras. Os géis foram lavados após eletroforese duas vezes por 15 min com

Triton X-100 a 2,5% e depois incubados em tampão de incubação zimográfica (Tris-HCl 30 mM, pH = 7,3, NaCl 200 mM, NaN3 0,02%) a 37 °C (HEUSSEN; DOWDLE, 1980). Os géis foram corados com azul Coomassie R-250.

3.3.6 Atividade coagulante

Para quantificar a atividade coagulante dos venenos, 50 μ L de veneno ressuspendido (1 mg de veneno em 1 mL NaCl 0,85%) e 50 μ L de CaCl₂ 25 mM foram incubados em um coagulômetro Drake a 37 °C por 2 min antes da adição do substrato (plasma humano citrado). Em seguida, foram adicionados 100 μ L de substrato pré-aquecido a 37 °C, o tempo de coagulação foi medido pelo equipamento (THEAKSTON; REID, 1983). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

3.4 Atividade biológica do veneno

Para atender o terceiro objetivo específico (mensurar as atividades enzimáticas e biológicas do veneno nas diferentes faixas etárias) foram formados dois grandes *pools* de veneno, o primeiro feito com o veneno de serpentes de 1 ano, tanto machos quanto fêmeas, e o segundo com o veneno de serpentes senis, igualmente, tanto machos como fêmeas. Estes *pools* foram formados para diminuir a quantidade de camundongos utilizados nos experimentos. Optou-se por usar veneno de serpentes de 1 ano e não de neonatos em virtude da pouca quantidade de veneno de neonatos disponível. Foram então realizadas as seguintes metodologias:

3.4.1 Atividade hemorrágica

A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) é definida como a quantidade mínima de veneno que causa uma área hemorrágica de 10 mm de diâmetro (KONDO et al., 1960). Para determinar a DMH, grupos de cinco camundongos *Swiss* machos (pesando entre 18 e 22 g) foram usados. Para este teste, foram usados os *pools* de venenos de serpentes de 1 ano e de serpentes senis descritos na secção 3.4. Cinco camundongos por grupo foram injetados por via intradérmica no abdômen com 100 μ l de veneno em 5 concentrações diferentes (uma concentração diferente para cada grupo, totalizando 5 grupos) (KONDO et al., 1960). As concentrações usadas foram: 1,5, 2,5, 5, 7,5 e 10 μ g de veneno dissolvido em solução de NaCl 0,85% esterilizada. Os animais tiveram livre acesso a comida e água durante os ensaios. Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ após

duas horas, a pele abdominal foi retirada, os halos hemorrágicos foram transferidos em escala 1:1 no papel, posteriormente digitalizados e finalmente, avaliados utilizando-se o programa ImageJ.

3.4.2 Dose letal média

A dose letal média (DL₅₀) é a definida como a dose de veneno capaz de abater 50% dos animais. Para este teste também foram usados os dois *pools* de veneno descritos na secção 3.4, sendo um de veneno de serpentes jovens e um veneno de serpentes senis. Grupos de 5 camundongos *Swiss* machos (pesando entre 18 e 22 g) foram usados para determinar a LD₅₀ dos venenos avaliados. Foram utilizados 5 grupos, um para cada dose testada, consistindo em diluições crescentes do veneno dissolvido em solução de NaCl 0,85% esterilizada. As doses avaliadas foram de 23, 34,5, 52, 78 e 116 μ g. Os animais tiveram livre acesso a comida e água durante os ensaios. A DL₅₀ foi calculada a partir do número de mortes ocorridas em 48 horas (VILLARROEL et al., 1978), pela análise de probitos (FINNEY, 1971).

Adicionalmente, foram feitas as necropsias dos camundongos que morreram nas primeiras 6 horas do teste, isso com fim de fazer uma abordagem qualitativa dos sintomas ocasionados pelos venenos avaliados.

3.5 Análise de reconhecimento imunológico do veneno

Para atender o quarto objetivo específico (analisar o imunorreconhecimento do veneno nas diferentes faixas etárias pelo antiveneno) foram feitos os seguintes testes:

3.5.1 Western blotting

O Western blotting foi realizado para verificar a interação entre o veneno e o antiveneno botrópico, o procedimento foi realizado de acordo com Harlow (HARLOW, 1988). As proteínas foram separadas mediante géis de eletroforese em gel unidimensional (poliacrilamida 15%) segundo a secção 3.2.1, depois foram transferidas em uma membrana de PVDF no sistema Biorad por 35 min com voltagem constante de 25 V. A membrana foi previamente umidificada em metanol por 5 min, seguido por água deionizada (MilliQ) por 5 min e tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20%) por 5 min. Uma vez que a transferência esteja completa, a membrana foi incubada com solução bloqueadora (leite em pó 5% e Tween 20 0,01%) *overnight*
a 4 °C C, para bloquear sítios reativos não-específicos. No dia seguinte, a membrana foi submetida a 3 lavagens subsequentes de 5 min cada com tampão de lavagem (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,01%, pH = 7,5). A membrana foi incubada com 1:1000 de soro antibotrópico (anticorpo primário) por 2 h em temperatura ambiente, outro ciclo de 3 lavagens subsequentes foi realizado como descrito acima. Em seguida, a membrana foi incubada uma última vez com IgG anti-cavalo (Sigma) conjugado com peroxidase 1:10000 por 2 horas em temperatura ambiente e lavada novamente, conforme descrito. Para revelar a membrana, foi feita uma lavagem rápida com substrato cromogênico (5 mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto em 10 mL de tampão imidazol 0,1 M, 125 μ L de CoCl₂ 0,2 mM e 3,4 μ L de H₂O₂ 30%). A reação foi interrompida com água MilliQ.

3.5.2 ELISA

O teste de ELISA foi realizado seguindo as instruções de Engvall e Perlmann (ENGVALL; PERLMANN, 1971). Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com uma solução de cada *pool*, sendo 10 μ g / mL dissolvido em tampão de carbonato (Na₂CO₃ 34 mM, NaHCO₃ 15 mM, pH 9,6). As microplacas foram incubadas a 4 °C por 18 horas em câmara úmida. Em seguida, foram lavadas duas vezes com 200 μ L de tampão de lavagem (PBS, pH = 7,4, 0,05% Tween 20) e subsequentemente bloqueados com 5% de BSA em PBS. Foram adicionadas diluições seriadas de soro antibotrópico (inicializando com uma concentração de 1:2000) em solução tampão (1% de leite desnatado em pó, PBS contendo 0,01% de Tween 20) e incubadas por 1 hora. As microplacas foram lavadas três vezes com solução tampão, seguida pela adição de 100 μ L de conjugado de fosfatase alcalina (Sigma) de imunoglobulinas anti-cavalo diluídas 1:20000 na mesma solução tampão, e depois foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Após três lavagens com solução tampão, a reação foi realizada com 100 μ L de solução de substrato de OPD (1 mg / mL de PBS) e 3% de H₂O₂ (1 μ g / mL de PBS) por 5 minutos em temperatura ambiente. A reação foi parada com 50 mL de H₂SO₄ a 30%. As absorbâncias foram registradas a 492 nm em um leitor de microplacas (SoftmaxPro, Molecular Devices). Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

3.5.3 Dose efetiva média

A dose efetiva média (DM₅₀) é a dose de antiveneno que neutraliza com sucesso a ação do veneno para 50% da população. Da mesma forma que as outras atividades *in vivo*, foram usados

apenas os 2 *pools* de veneno descritos na secção 3.4, um *pool* de veneno de serpentes jovens e um *pool* de veneno de serpentes senis. Cinco vezes a DL₅₀ obtida para cada *pool* foi considerada a quantidade de veneno a ser neutralizada pelo antiveneno (dose desafio), sendo 341,01 µg de veneno no caso do *pool* jovem, e 285,65 µg de veneno no caso do *pool* senil. Cada amostra foi incubada a 37 °C por 30 minutos com soro antibotrópico em diferentes concentrações, sendo elas 68,2, 48,7, 34,8, 24,9 e 17,8 µL para o grupo de veneno jovem, e 57,1, 40,8, 29,1, 20,8 e 14,9 µL para o grupo de veneno senil (a concentração maior foi calculada usando a bula do soro comercial em ambos os casos, depois foram feitas diluições seriadas com fator de diluição de 1,4). Em seguida, 5 grupos de 5 camundongos *Swiss* cada (machos, pesando entre 18 e 22 g) foram injetados via intraperitoneal com 500 µl das doses. Os animais tiveram livre acesso a comida e água durante os ensaios. As mortes foram contadas até 48 horas após as injeções (BARD et al., 1994). A ED₅₀ foi calculada pela análise de probitos (FINNEY, 1971).

3.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi feita uma prova de variância ANOVA por experimento, machos e fêmeas foram analisados em separado, isso com o fim de identificar se os grupos apresentam diferenças estatisticamente significativas. Uma vez concluído o teste de ANOVA, procedeu-se com uma prova Tukey de comparações múltiplas para identificar quais os grupos apresentam um valor significativamente maior ou menor do que os demais grupos.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização proteica do veneno

4.1.1 Eletroforese em gel unidimensional (SDS-PAGE)

A análise do perfil proteico dos *pools* de venenos das serpentes *B. neuwiedi*, observada através do SDS-PAGE 15% (Figura 2), apresentou diferenças na composição entre os grupos tanto de idade como entre os sexos. O gel com amostras no estado não reduzido apresentou um maior número de bandas em todos os grupos em relação ao gel com amostras reduzidas.

Figura 2. SDS-PAGE (15%) dos venenos de serpentes *Bothrops neuwiedi* em diferentes faixas de idades. A) Machos em condições redutoras. B) Machos em condições não redutoras. C) Fêmeas em condições redutoras. D) Fêmeas em condições não redutoras. N = Neonatos, 1 = um ano, 2 = dois anos, 3 = três anos, S = Senis. Os pontos vermelhos indicam a região com maior densidade de bandas dos neonatos, normalmente atribuída a SVMP. As flechas indicam a região onde aparecem bandas nas idades avançadas, normalmente atribuídas a PLA₂.



No caso dos machos, a diferença mais notável ocorre nas bandas com massa molecular superior a 50 kDa, em que os neonatos apresentam um número maior de bandas quando comparado com os outros grupos. Esse padrão não pode ser observado nas fêmeas devido à ausência de amostra de neonatos fêmeas.

É notável uma semelhança entre os grupos de 1 e 3 anos, e entre 2 anos e senis, tanto em machos quanto em fêmeas. As proteínas intermediárias, entre 20 e 37 kDa apresentam um perfil semelhante entre todas as idades, entretanto os machos apresentam um maior número de bandas nessa região nos grupos mais velhos (3 anos e senis) em condições não redutoras. A região com proteínas entre 15 e 10 kDa não apresentou grandes variações entre os grupos, com diferenças pontuais, como por exemplo o grupo de 3 anos macho que apresenta uma banda bem intensa em 15 kDa não presente nos demais grupos.

4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A caracterização dos perfis cromatográficos para o veneno de cada *pool* também foi feita mediante RP-HPLC. Similarmente ao que foi observado nos SDS-PAGEs, os cromatogramas apresentaram uma variação na composição bioquímica do veneno das serpentes nas diferentes idades (Figura 3). A análise de RP-HPLC mostrou 30 picos diferentes com variação intraespecífica entre as idades e sexo estudados, sendo que 27 deles apresentaram uma maior representatividade nos grupos. Por outro lado, o pico 28 foi exclusivo dos machos neonatos, o 29 foi exclusivo dos machos de 1 ano, e o 30 das fêmeas senis. Para melhor comparação das diferenças entre os cromatogramas, o *pool* de machos senil foi eleito como cromatograma padrão, tendo seus picos coletados manualmente e submetidos à SDS-PAGE, sendo assim utilizado para a visualização e comparação das proteínas de cada cromatograma (Figura 4).

Os picos de RP-HPLC foram atribuídos às principais famílias de proteínas comumente encontradas em venenos botrópicos. Uma grande quantidade de picos eluídos (aproximadamente 10) estão na região final (tempo 80 min) do perfil cromatográfico. Os picos dessa região mostramse mais intensos nos machos neonatos e de 3 anos, e nas fêmeas de 2 anos, 3 anos e senis. Nessa região, geralmente é eluída a família de toxinas SVMP, principalmente as tipo P-III (NÚÑEZ et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012; TASHIMA et al., 2008). As proteínas dessa família possuem uma massa molecular entre 50 e 75 kDa. Sendo assim, presumivelmente essas SVMP P-III podem ser encontradas nos picos 19, 22, 23 e 24, que apresentaram bandas nos tamanhos correspondentes

no SDS-PAGE do cromatograma padrão. É possível observar bandas entre 20 e 25 kDa nos picos dessa região, bem intensificadas nos picos 20 ao 24. Essas bandas provavelmente correspondem

Figura 3. Perfis cromatográficos de proteínas em coluna C18 do veneno de *Bothrops neuwiedi* (machos em azul e fêmeas em rosa). Esquema de eluição: primeiros 5 minutos foi injetado no sistema uma solução de acetonitrila 95% contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (solução B), a uma concentração do 5% em solução de TFA 0,1% (solução A); seguido por um aumento de 5 para 25% da solução B por 10 minutos; em seguida, um aumento de 25 para 45% da solução B por 60 minutos; um aumento de 45 a 70% da solução B por 10 minutos; e, finalmente, um aumento de 70 para 100% da solução B nos últimos 10 minutos. Os picos indicados com vermelho são picos exclusivos de cada grupo.



Figura 4. Perfil cromatográfico de proteínas do veneno de *Bothrops neuwiedi* macho senil em coluna C18. Esquema de eluição: primeiros 5 minutos foi injetado no sistema uma solução de acetonitrila 95% contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (solução B), a uma concentração do 5% em solução de TFA 0,1% (solução A); seguido por um aumento de 5 para 25% da solução B por 10 minutos; em seguida, um aumento de 25 para 45% da solução B por 60 minutos; um aumento de 45 a 70% da solução B por 10 minutos; e, finalmente, um aumento de 70 para 100% da solução B nos últimos 10 minutos. Cada pico foi manualmente coletado e submetido a SDS-PAGE, em condições redutoras. Os picos 1 a 17 foram submetidos em SDS (15%) e os picos 18 a 27 em SDS 12%. São indicadas as principais regiões dos perfis cromatográficos botrópicos, mencionando as famílias de proteínas que normalmente são encontradas nelas (CALVETE et al., 2011; SOUSA et al., 2013). DIS: Desintegrinas, PLA₂: Fosfolipases A₂, SVSP: Serinoproteases, SVMP: Metaloproteases, LAAO: L-amino ácido oxidases.



às SVMP tipo P-I, como já foi descrito para outras espécies, como por exemplo para *B. atrox* (CALVETE et al., 2011). O pico marcado com número 28 é exclusivo no *pool* dos neonatos macho.

O pico 7 e sua correspondente banda (observada no SDS-PAGE) provavelmente está relacionado à PLA₂ K-49, uma fosfolipase descrita sem atividade enzimática, que é conhecida pela sua ação miotóxica (NÚÑEZ et al., 2009). Esse pico está ausente em neonatos machos, e em ambos dos sexos há uma queda de intensidade nos grupos de 2 anos e senis, de forma mais acentuada nas

fêmeas. Consequentemente, os machos mais velhos (2 anos, 3 anos e senis) apresentam uma maior intensidade desse pico em relação as fêmeas. Este pico já foi descrito em trabalhos anteriores em *B. jararaca* e *B. jararacussu* (GONÇALVES-MACHADO et al., 2016). O pico 8, que aparece logo em seguida, está ausente no grupo de 3 anos tanto nos machos como nas fêmeas.

A região em que normalmente são eluídas as PLA_2 D49 (que possuem atividade enzimática) encontra-se entre os picos 9 e 14. Os picos 12, 13 e 14 do cromatograma padrão feito com o veneno de machos senis possuem proteínas de aproximadamente 15 kDa (Figura 3 B) (NÚÑEZ et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012), o que corrobora a possível presença de PLA_2 D49 nessa região. O veneno de neonatos machos apresentou uma maior intensidade do pico 14 do que os demais grupos. Nessa região foram encontrados picos exclusivos nos machos de 1 ano (pico 29) e nas fêmeas senis (pico 30).

Apesar de ser observada uma variação no perfil cromatográfico dos diferentes grupos, não há uma clara tendência de alteração em relação a ontogenia, apenas o surgimento do pico 7 e 8, que estão ausentes no *pool* de machos neonatos. Ocorre um aumento no número de picos conforme o animal fica mais velho no caso dos machos, mas esse padrão não se repete nas fêmeas. Em relação ao sexo, as principais diferenças são observadas no grupo dos senis, em que as fêmeas apresentam uma menor quantidade de picos no total, mas apresentam uma intensidade maior dos picos finais do cromatograma quando comparado aos machos.

4.1.3 Espectrometria de massas (MS/MS)

O resultado obtido da análise por espectrometria de massas dos venenos identificou 188 proteínas no total, distribuídas em 15 grandes famílias. Os grupos de proteínas mais abundantes encontradas nos venenos de *B. neuwiedi* foram as SVMP P-I, SVMP P-II, SVMP P-III, PLA₂, SVSP, lectinas tipo C (LTC) e proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP) (Figura 5). Apesar de ser notável a variação de abundância das famílias de proteínas entre todos os grupos, assim como no HPLC algumas não apresentam uma clara tendência de variação devido ao estado ontogenético em que o animal se encontra.

No caso das SVMP P-III, há um aumento de abundância no caso dos machos (de aproximadamente o 23%) e no caso das fêmeas há uma diminuição (aproximadamente do 24% até os 3 anos) conforme os animais ficam mais velhos. Já no caso das SVMP P-II, há um aumento de

abundância nas fêmeas mais velhas, sendo que o grupo de 3 anos apresentou uma abundância 19% maior do que o grupo de 2 anos, e o grupo senil teve uma abundância 16% menor do que o grupo de 3 anos, mas não há uma alteração evidente nos machos.

As PLA₂ D49 apresentam um aumento de abundância conforme os animais ficam mais velhos nos machos (aproximadamente 36%), mas no caso das fêmeas essa abundância se eleva na idade de 3 anos, porém volta a valores próximos de 1 ano no senil. Em ambos os sexos é notável a queda da abundância relativa de lectinas tipo C comparando os senis com o grupo de 1 ano (37% no caso dos machos 27% no caso das fêmeas). As proteínas menos abundantes, como fosfodiesterases, fatores de crescimento neural, hialuronidases, entre outras, demonstraram variações entre os grupos, mas sem demonstrar aparente relação com a ontogenia. Pode se destacar algumas variações ontogenéticas nas abundâncias das famílias de proteínas que ocorrem de forma diferente entre machos e fêmeas.

Figura 5. Abundância relativa das principais famílias de proteínas encontradas por espectrometria de massas nos pools de venenos *de B. neuwiedi* de diferentes idades, machos (A) e fêmeas (B). SVMP P-I; metaloprotease tipo 1, SVMP P-II; metaloprotease tipo 2, SVMP P-III; metaloprotease tipo 3, LTC; lectinas tipo C, PLA₂; fosfolipase A₂, SVSP; serinoprotease, LAAO - L-amino ácido oxidase, CRISP; proteína secretora rica em cisteína, DIS; disintegrina. Foram identificadas um total de 15 famílias de proteínas.



algumas variações ontogenéticas nas abundâncias das famílias de proteínas que ocorrem de forma diferente entre machos e fêmeas. **Figura 5**. Abundância relativa das principais famílias de proteínas encontradas por espectrometria de massas nos pools de venenos *de B. neuwiedi* de diferentes idades, machos (A) e fêmeas (B). SVMP P-I; metaloprotease tipo 1, SVMP As CRISPs apresentaram um padrão dependente da idade, havendo uma diminuição da sua abundância nos machos, ao comparar o grupo de 1 ano com o grupo senil (diminuição do 33% da abundância). Por outro lado, as fêmeas mostraram o padrão contrário, possuindo uma abundância menor no grupo de 1 ano e uma maior no grupo senil (aumento do 53% da abundância). É provável que as CRISPs sejam dependentes da idade em *B. neuwiedi*, só que com tendências diferentes entre ambos os sexos.

No caso das abundâncias observadas das lectinas tipo C, apenas as proteínas dos machos mostraram uma tendência, diminuindo desde as idades jovens até as mais velhas, sendo que a diferença entre o grupo de 1 ano e senil foi do 45%. Isso indica que provavelmente a abundância de lectinas tipo C no veneno de *B. neuwiedi* dependa da ontogenia.

4.2 <u>Caracterização bioquímica do veneno</u>

4.2.1 Atividade de LAAO

A atividade LAAO, compreendida como a produção de H_2O_2 por minuto, mostrou variação ao longo dos grupos (Figura 6). Nos machos, a atividade demonstra um aumento significativo do veneno dos neonatos para o grupo de 1 ano, elevando-se novamente no grupo de 2 anos, e permanecendo estável nos grupos mais velhos (3 anos e senil). Já no caso das fêmeas, ocorre uma diminuição da atividade do grupo de 1 ano para o de 2 anos (diminuição do 13,2% da atividade), valor que permanece no grupo de 3 anos e se eleva nos senis (13,6% de aumento).

Figura 6. Atividade de LAAO, utilizando L-metionina como substrato, dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo. A atividade de LAAO é expressa pela quantidade de nmols de H_2O_2 liberados por micrograma de proteína por minutos de incubação. Os asteriscos mostram as diferenças significativas (p < 0,05).



4.2.1 Atividade de PLA₂

Os resultados obtidos para o teste de atividade de PLA₂ demonstram uma perda de atividade conforme os animais ficam mais velhos (Figura 7). No caso dos machos, os neonatos apresentaram uma atividade mais baixa do que os animais de 1 ano, porém, essa atividade apresentou uma diminuição gradual do grupo de 1 ano até os senis (37,4% menor nos senis em

relação ao grupo de 1 ano). Já no caso das fêmeas, o grupo de 2 anos demonstrou uma diminuição de 48,7% da atividade se comparada ao grupo de 1 ano. A atividade sobe levemente no grupo de 3 anos e se mantém nos senis. Só no caso dos machos houve uma tendência claramente dependente da idade, no caso das fêmeas não foi tão marcante.

Figura 7. Atividade de PLA₂, utilizando NOBA como substrato, dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo. A atividade de PLA₂ é expressa em unidades (U - nmol de cromóforos liberados) por minutos de incubação por microgramas de proteína, sendo que o aumento de 0,1 unidade da leitura equivale à liberação de 25,8 nmol de cromóforo (ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzoico). Os asteriscos mostram as diferenças (p < 0,05) entre os grupos.



4.2.2 Atividade caseinolítica

A atividade caseinolítica apresentou uma oscilação em relação à idade dos animais (Figura 8). As idades de 1 ano e 3 anos apresentaram atividades mais baixas em ambos dos sexos, sendo a diferença (comparando com os grupos de 2 anos) de 17,7% nos machos de 1 ano, 15,8% nos machos de 3 anos, 38,3% nas fêmeas de 1 ano e 41,6% nas fêmeas de 3 anos. Enquanto os neonatos, 2 anos e senis mostraram valores mais elevados, de forma mais acentuada no grupo das fêmeas. A atividade das fêmeas se mostrou mais elevada do que a dos machos na idade de 2 anos (19,5%) e nos senis (6,7%).

Figura 8. Atividade caseinolítica dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo. A atividade específica é expressa em unidades (U - quantidade de veneno que causa um aumento de 0,005 unidade de absorbância a 450 nm) por minuto de incubação por miligramas de proteína. Os asteriscos mostram diferença estatística (p<0,05).



4.2.3 Atividade colagenolítica

A atividade colagenolítica, assim como a atividade caseinolítica apresentou uma oscilação na atividade em relação a idade dos animais (Figura 9), estando presente a partir do grupo de 2 anos, com a exceção do grupo de 3 anos. O grupo de 2 anos e os senis foram os grupos que apresentaram maior atividade, enquanto os grupos de 1 ano e 3 anos novamente apresentaram valores menores (73% em média menor). O resultado do grupo dos neonatos foi o único que não apresentou o mesmo padrão, resultando em uma baixa atividade semelhante ao grupo de 1 ano. Novamente as fêmeas apresentaram valores maiores tanto no grupo de 2 anos (74% maior respeito ao grupo de 1 anos) como nos senis (93,7% maior respeito ao grupo de 3 anos). Similarmente à atividade caseinolítica, a atividade colagenolítica total também apresentou aumento. Somente o grupo de 3 anos não apresentou tal tendência.

Figura 9. Atividade de colagenolítica dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo. A atividade específica é expressa em unidades (U - quantidade de veneno que causa um aumento de 0,003 unidade de absorbância a 540 nm) por minuto de incubação por miligramas de proteína. Os asteriscos mostram diferença estatística (p<0,05).



4.2.4 Zimografia

A atividade proteolítica também foi analisada usando zimogramas, utilizando azocaseína (Figura 10A e C) e gelatina (Figura 10B e D) como substrato. Basicamente, ao adicionar um substrato específico no preparo do gel, as enzimas com afinidade por esse substrato degradam a área do gel na região onde elas se encontram. Os géis de zimografia com ambos dos substratos apresentaram digestão de duas bandas entre 25 e 37 kDa em todos os venenos analisados, região que normalmente encontram-se SVSP e SVMP (P-I e P-II) (BJARNASON; FOX, 1988, 1994). Não há diferenças notáveis entre as amostras tanto de machos quanto de fêmeas no gel com caseína. O gel contendo gelatina apresentou digestão em uma região correspondente a uma banda de aproximadamente 75 kDa que aparenta se intensificar com a idade, de forma mais marcada no grupo dos machos. Essa banda está ausente no grupo de 2 anos de ambos dos sexos, e também nos neonatos machos. Além disso, a zimografia em gel de gelatina apresentou duas bandas entre 37 e 50 kDa que diminuem de intensidade no grupo dos senis.

Figura 10. Zimografia em SDS-PAGE 15% dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo, contendo caseína (A e C) e gelatina (B e D) como substrato. N – Neonatos; 1 - 1 ano; 2 - 2 anos; 3 - 3 anos; S - Senis.



Machos / Substrato Caseína

Machos / Substrato Gelatina

Fêmeas / Substrato Caseína

Fêmeas / Substrato Gelatina

4.2.5 Atividade coagulante

A atividade coagulante do veneno, mensurada como tempo de coagulação de soro humano (Figura 11), não apresentou uma tendência de variação da atividade correlacionada com a idade dos animais. No grupo dos machos há um aumento no tempo necessário para a coagulação no grupo de 3 anos (19,9 segundos), que retorna a um tempo mais baixo no grupo dos senis (13,1 segundos). Em relação às fêmeas, o tempo de coagulação se apresentou maior no grupo de 2 anos (16 segundos), mas assim como observado nos machos, o tempo retorna a valores mais baixos no grupo de 3 anos e senis. A atividade coagulante se mostrou maior nos machos neonatos e de 1 ano, já no caso das fêmeas, foi maior no grupo de 2 anos e senis.

Figura 11. Atividade coagulante dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo. Foi definida como o tempo necessário para 50 μ L de veneno coagular 100 μ L de plasma humano. Os asteriscos mostram diferença estatística (p<0,05).



4.3 <u>Caracterização biológica do veneno</u>

4.3.1 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi medida pela dose mínima hemorrágica (DMH) (Figura 12). O resultado obtido mostrou que o *pool* de veneno do grupo de 1 ano teve uma DMH 57,9% menor do que o *pool* de serpentes senis, indicando uma maior atividade hemorrágica no veneno das serpentes mais jovens.

Figura 12. Dose mínima hemorrágica (DMH) de veneno de *B. neuwiedi* de dois grupos etários. A dose mínima hemorrágica (DMH) foi definida como a quantidade mínima de veneno que causa uma área hemorrágica de 10 mm de diâmetro. Grupos de 5 camundongos foram injetados via intraperitoneal, com diferentes doses de veneno de *B. neuwiedi*, dois *pools* de veneno foram testados, o *pool* de veneno jovem (usando o veneno de machos e fêmeas de 1 ano) e o *pool* de veneno senil (usando o veneno de fêmeas e machos senis).



4.3.2 Dose letal média

A letalidade do veneno foi medida com a DL_{50} , que é o cálculo da dose de veneno necessária para abater 50% da população de camundongos. Não foi encontrada diferença entre as DL_{50} dos jovens e dos senis (Figura 13). Por outro lado, o tempo de morte (Figura 14) apresentou diferenças entre os dois grupos, sendo que o veneno do grupo dos jovens demandou um maior período para abater os camundongos do que o veneno dos senis.

Figura 13. Dose letal. A dose letal média (DL_{50}) é a quantidade de veneno necessária para abater 50% da população de camundongos injetados. Grupos de 5 camundongos foram injetados via intraperitoneal, com diferentes doses de veneno de *B. neuwiedi*, dois *pools* de veneno foram testados, o *pool* de veneno jovem (usando o veneno de machos e fêmeas de 1 ano) e o *pool* de veneno senil (usando o veneno de fêmeas e machos senis). A DL_{50} é calculada usando análise de probitos.



Figura 14. Tempo de ação letal nos camundongos injetados com veneno de *B. neuwiedi*. Um grupo de 5 camundongos foi injetado via intraperitoneal, com 78 μ g de veneno de *B. neuwiedi*. Dois *pools* de veneno foram testados, o *pool* de veneno jovem (usando o veneno de machos e fêmeas de 1 ano) e o *pool* de veneno senil (usando o veneno de fêmeas e machos senis).



4.1 Análise de reconhecimento imunológico do veneno

4.1.1 Western blotting

Em relação ao reconhecimento imunológico feito mediante *western blotting* (Figura 15), todos os venenos apresentaram resultados semelhantes, sem aparente diferença entre os grupos de idade e sexo. É notável um baixo imunorreconhecimento das proteínas entre 15 e 37 kDa, região em que é possível observar um elevado número de bandas no SDS-PAGE que são menos intensas ou não estão presentes na membrana de *western blotting*. Nesta faixa de entre 16 e 37 kDa encontram-se as SVSP, CRISPs e SVMP P-I e P-II (ZELANIS et al., 2016). Isto demonstra que há um menor reconhecimento por parte do soro antibotrópico ante proteínas neste rango de massa molecular.

Figura 15. *Western blotting* dos venenos de *B. neuwiedi*, os venenos foram submetidos a SDS-PAGE em condições redutoras, as proteínas dos géis foram transferidas a uma membrana e incubadas com soro antibotrópico em ordem crescente de idade. A) Machos. B) Fêmeas. N = Neonatos, 1 = um ano, 2 = dois anos, 3 = três anos, S = Senis.



4.1.2 ELISA

O teste ELISA (Figura 16) mostrou que a maioria dos venenos dos grupos avaliados possui um reconhecimento imunológico semelhante pelo soro antibotrópico, com exceção um grupo das fêmeas. Nenhum dos grupos de machos apresentou diferenças estatisticamente significantes. No caso das fêmeas, apenas a titulação do grupo de 2 anos foi significativamente maior que o grupo de 3 anos e o grupo senil, sendo aproximadamente 11% maior do que o grupo de 3 anos, e 15% maior do que o grupo senil.

Figura 16. Titulação de anticorpos do soro antibotrópico por ELISA dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo. O cálculo da titulação de anticorpos é realizado a partir do valor da diluição do soro antibotrópico multiplicado pelo valor da leitura a 492 nm. Os asteriscos mostram diferença estatística significativa. (p < 0.05).



4.1.3 Dose efetiva média

O teste da eficácia do soro antibotrópico *in vivo* foi realizado pelo teste de dose efetiva média (DE₅₀) (Figura 17). A dose efetiva média é a dose de soro antibotrópico necessária para que neutralizar com sucesso a ação do veneno no 50% da população de camundongos. As doses de soro antibrotrópico e quantidade de veneno utilizado para cada grupo estão detalhados na Tabela 1. A DE₅₀ mostrou que o veneno das serpentes jovens necessitou de uma quantidade maior de soro antiofídico para neutralizar a dose desafio (52,4% a mais). Os limites superior e inferior da neutralização do veneno dos jovens se mostrou amplo, provavelmente esse resultado tenha ocorrido porque o veneno das serpentes de 1 ano abateu todos os camundongos em 2 dos 5 grupos (as duas doses mais baixas de soro antibotrópico).

Tabela 1. Doses dos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo utilizadas nos grupos de camundongos para o teste de ED_{50} . A dose desafio foi de 5 vezes a DL_{50} , 341,01 µg para o *pool* de veneno jovem, e 285,65 µg para o *pool* de veneno senil. A primeira dose de soro antibotrópico foi calculada segundo a bula do produto, e as seguintes doses foram calculadas com um fator de diluição de 1,4.

	Pool Jovem				Pool senil			
	Veneno (μg/μL)	Soro antib. (μL)	Salina (µL)	Volume final (µL)	Veneno (μg/μL)	Soro antib. (µL)	Salina (µL)	Volume final (µL)
Solução de injeção 1	341,01	68,2	90,8	500,0	285,65	57,1	157,2	500,0
Solução de injeção 2	341,01	48,7	110,3	500,0	285,65	40,8	173,5	500,0
Solução de injeção 3	341,01	34,8	124,2	500,0	285,65	29,1	185,2	500,0
Solução de injeção 4	341,01	24,9	134,1	500,0	285,65	20,8	193,5	500,0
Solução de injeção 5	341,01	17,8	141,2	500,0	285,65	14,9	199,5	500,0

Figura 17. Dose efetiva média (DE₅₀) dos venenos de *B. neuwiedi* jovens e senis. Se considera DE₅₀ a dose do soro antibotrópico que neutraliza com sucesso o 50% da letalidade da dose desafio. Foram injetados grupos de 5 camundongos com uma mistura de uma quantidade fixa de veneno de *B. neuwiedi* e soro antibotrópico, em. Para o *pool* de veneno jovem, 5 grupos de camundongos foram injetados com 341,01 µg de veneno, a primeira dose de soro foi de 68,2 µL, para as seguintes 4 doses se fez uma diluição seriada com fator de 1,4. Por outro lado, para o *pool* de veneno senil, 5 grupos de camundongos foram injetados com 285,65 µg de veneno, a primeira dose de soro foi de 57,1 µL, para as seguintes 4 doses se fez uma diluição seriada com fator de 1,4. As mortes foram contadas em 48 h e a ED₅₀ foi calculada usando análise de probitos.



5 Discussão

Dentre os fatores que interferem na diversidade dos venenos de serpentes, podemos citar a variabilidade intraespecífica, que já foi reportada em diversas espécies de serpentes e estimula as pesquisas acerca do veneno de serpentes (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; GIRÓN et al., 2018; YU; YU; LI, 2020). Tais estudos podem contribuir para a elucidação do mecanismo de funcionamento dos venenos ofídicos, nas características clínicas em caso de envenenamento e para o aprimoramento de soros antiofídicos (CASEWELL et al., 2020). Com isso, as metodologias abordadas neste trabalho tiveram como objetivo analisar e comparar a composição proteica e as atividades do veneno da serpente *B. neuwiedi* de diferentes grupos de idades.

A análise do perfil proteico do *pool* de venenos da serpente *B. neuwiedi*, analisada por SDS-PAGE, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, apresentou diferenças entre os grupos de diferentes idades, apesar de não haver uma tendência clara de variação devido ao estágio ontogenético do animal. No SDS-PAGE 15%, com amostras em estado reduzido, é possível notar que a maioria das bandas entre 20 e 37 kDa são mantidas em todas as faixas etárias e em ambos os sexos. Essas bandas são associadas às SVSP, lectinas tipo C, CRISPs e SVMP P-II (ZELANIS et al., 2016). A região entre 20 e 10 kDa, em que predominam as PLA₂ (AMORIM et al., 2018), apresenta um perfil semelhante em todos os *pools* dos venenos das fêmeas. No entanto, os *pools* de veneno dos machos apresentam algumas variações, como no grupo de 3 anos que apresenta uma banda de aproximadamente 15 kDa que se mostra mais intensa do que nos demais grupos. Diferenças nessa região do perfil eletroforético já foram observadas em outros estudos de ontogenia de venenos do gênero *Bothrops*. Por exemplo, o aumento na densidade das bandas entre 10 e 25 kDa já foi descrito na ontogenia de *B. atrox* (SALDARRIAGA et al., 2003), *B. moojeni* (HATAKEYAMA et al., 2021) e *B. jararacussu* (DA SILVA AGUIAR et al., 2020).

A diferença mais notável ocorre nas bandas com massa molecular superior a 50 kDa, em que os machos neonatos apresentam um maior número de bandas nessa faixa, que corresponde às proteínas de alta massa molecular como SVMP P-II ou P-III e LAAO (AMORIM et al., 2018; MARKLAND; SWENSON, 2013; ZELANIS et al., 2016). No entanto, a partir de um ano, a quantidade de bandas nesse intervalo de massa molecular é reduzida. Esse grande número de bandas de alta massa molecular também foi observada em indivíduos recém-nascidos de *B*. *jararaca* (ANTUNES et al., 2010), que apresentaram bandas em uma posição similar. Infelizmente, em virtude da ausência de animais recém-nascidos do sexo feminino, não foi possível estudar o perfil de bandas nesses animais. Este padrão mostrando diminuição na abundância relativa de SVMP ao longo da idade é visto em algumas espécies de *Bothrops*, como *B. leucurus* (MACHADO BRAGA et al., 2020), *B. jararaca* (ANTUNES et al., 2010) e *B. moojeni* (HATAKEYAMA et al., 2021).

Quanto à atividade hemorrágica, observou-se que o *pool* de veneno de serpentes jovens apresentou uma atividade hemorrágica maior do que as serpentes senis. Isso é corroborado por estudos de várias espécies de *Bothrops*, como *B. atrox*, *B. asper* (SALDARRIAGA et al., 2003) e *B. jararacussu* (DA SILVA AGUIAR et al., 2020), em que a atividade hemorrágica decai com a idade dos indivíduos. No veneno dos viperídeos, as SVMP são a principal família de proteínas responsáveis pela hemorragia, tanto local como sistêmica (ESCALANTE et al., 2011; SEO et al., 2017). Apesar de haver diferença na atividade hemorrágica entre o grupo de jovens e senis, não há uma maior abundância de SVMP no grupo dos jovens (grupo de 1 ano) do que nos senis. Curiosamente, o contrário é observado no grupo dos machos, em que os senis apresentam uma abundância bem mais elevada de SVMP P-III (aproximadamente 23% de diferença entre os grupos). Já no grupo das fêmeas, foi o grupo de 1 ano que teve uma abundância de SVMP P-III aproximadamente 13% maior. É provável então que a sinergia de SVMP P-III com outras proteínas sejam responsáveis pela atividade hemorrágica do veneno *de B. neuwiedi*.

Todos os perfis cromatográficos apresentaram-se semelhantes quanto à distribuição dos picos eluídos aos já descritos para várias espécies de *Bothrops*, como *B. atrox*, *B. jararacussu*, *B. cotiara*, *B alternatus* (SOUSA et al., 2013) e *B. asper* (MORA-OBANDO et al., 2020). As principais similaridades ocorrem nas mesmas regiões de picos, sendo a primeira uma região na que aparecem disintegrinas (antes dos 20 min de eluição), na seguinte região aparecem PLA₂s e SVSPs (entre os 50 e 75 min de eluição), e finalmente na terceira região aparecem SVMP e LAAO (a partir dos 75 min de eluição).

A análise por espectrometria de massas mostrou que a abundância de PLA₂ K49 apresenta um aumento nas fêmeas senis (53%), mas não é observado o mesmo para os machos. Tal aumento também foi observado estudos em algumas outras espécies de *Bothrops*, como a *B. asper* e a *B. jararacussu* (DA SILVA AGUIAR et al., 2020; MORA-OBANDO et al., 2020). Quanto à PLA₂ D49, observou-se uma maior quantidade desta proteína em comparação com a sua isoforma K49 em todas as idades, diferente do resultado encontrado para a espécie *B. asper* (MORA-OBANDO et al., 2020). No entanto, os dados sugerem um padrão dependente de idade apenas nos machos, nos quais a quantidade da proteína aumenta ao longo das faixas etárias, sendo que as fêmeas apresentaram uma concentração estável, com a exceção do grupo de 3 anos, que apresentou maior quantidade desta proteína.

A atividade enzimática da PLA₂ é uma das características do veneno que apresenta maior variabilidade, ela pode estar relacionada a várias funcionalidades biológicas, como miotoxicidade, hemólise e ativação da cascata de coagulação (PLA et al., 2019). A atividade de PLA₂ apresentou uma queda de atividade nos grupos mais velhos. Porém, a alteração na abundância relativa de PLA₂ D49 não apresentou a mesma variação que a atividade enzimática. No caso dos machos a maior abundância de PLA₂ D49 é observada no grupo dos senis, entretanto esse grupo obteve a menor atividade entre os machos. Já no caso das fêmeas, a maior abundância de PLA₂ D49 é observada no grupo de 3 anos, mas o grupo de 1 ano apresenta maior atividade enzimática. O único grupo que pareceu ter uma tendencia dependente da idade, foi o grupo das fêmeas, onde houve uma diminuição da atividade entre 1 ano e 2 anos.

Os dados sugerem que grupos de idade avançada provavelmente apresentam uma maior atividade LAAO em seu veneno. Trabalhos anteriores que comparam a variação ontogenética da atividade LAAO de outras espécies de *Bothrops*, como *B. jararacussu* (DA SILVA AGUIAR et al., 2020) e *B. moojeni* (HATAKEYAMA et al., 2021) também tem descrito uma maior atividade desta proteína nos grupos etários mais velhos. A atividade LAAO foi maior em todos os grupos dos machos, o que já foi descrito para a espécie *B. atrox* (HATAKEYAMA et al., 2020) .

Cabe notar que no veneno dos machos essa atividade mostrou dependência com a idade. Porém, não é possível fazer uma correlação direta com o resultado obtido na espectrometria de massas, em que a quantidade de LAAO é constante ao longo das faixas etárias dos machos, mas nas fêmeas não aparenta ter um padrão, apresentando uma maior a abundância de LAAO nos grupos de 2 e 3 anos. Provavelmente esse fenômeno seja devido à atividade diferencial das várias isoformas da proteína no veneno.

A mensuração da atividade proteolítica do veneno foi avaliada sob dois aspectos, a atividade caseinolítica e a colagenolítica. A primeira é comumente associada às proteases em geral

e a segunda especificamente às SVMP. A atividade enzimática, utilizando-se caseína e colágeno como substrato, apresentaram uma oscilação de atividade conforme a idade. A atividade proteolítica, em ambos dos substratos, se mostrou maior nos grupos de 2 anos e senis, em ambos dos sexos. Curiosamente, ao observar a zimografia em ambos dos substratos não podemos notar essa oscilação de atividade. De maneira oposta, na zimografia com gelatina como substrato o grupo de 2 anos de ambos dos sexos apresentam uma baixa atividade na banda entre 50 e 75 kDa. O grupo dos neonatos macho apresentaram uma elevada atividade caseinolítica, porém com azocoll como substrato a atividade desse grupo fica bem reduzida.

A baixa atividade colagenolítica em veneno se serpentes filhotes já foi observado em híbridos de *B. neuwiedi* e *B. erythromelas* (SANTORO et al., 2015), espécies filogeneticamente correlatas (ALENCAR et al., 2016). Em tal estudo, o veneno apresentou uma atividade colagenolítica diretamente proporcional à idade. Esse fenômeno também foi documentado em um estudo *Crotalus polystictus* (MACKESSY et al., 2018), no qual se sugeriu que a maior atividade SVMP dessa espécie pode estar relacionada com a preferência por presas maiores pelas serpentes adultas. No entanto, devido à falta de um padrão específico, é provável que a atividade proteolítica de *B. neuwiedi* não dependa exclusivamente da idade.

Comparando a análise por espectrometria de massas com as atividades proteolíticas, tanto no caso da atividade caseinolítica quanto da colagenolítica, não é possível observar alguma correlação evidente entre essas duas análises, uma vez que as SVMP não acompanham o mesmo padrão e as SVSP não apresentam variação dependente da idade.

Provavelmente o dimorfismo sexual de *B. neuwiedi*, no qual o tamanho das fêmeas é geralmente maior do que o tamanho dos machos, é a razão pela qual as fêmeas precisam de presas maiores, o que explicaria que a capacidade digestiva do seu veneno, ou seja, sua atividade proteolítica seja maior do que o veneno dos machos. Isso levando em consideração que as diferenças das atividades proteolíticas do veneno podem depender do tamanho da presa (MACKESSY et al., 2018).

Estudos sugerem que o veneno mais tóxico das serpentes mais jovens seja eficaz para matar, enquanto o veneno mais proteolítico de serpentes maiores seria mais adequado para digestão. O compromisso alcançado entre essas duas funções primárias do veneno é provavelmente bem equilibrado no que diz respeito às mudanças ontogenéticas na presa preferida, tamanho e liberação da quantidade de veneno (KARDONG, 1986; MACKESSY, 1988).

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, tanto de composição proteica como enzimática, foi possível observar uma relação entre a ontogenia e a presença de proteases para os venenos da *B. neuwiedi*. No entanto, a atividade protease esteve presente na maioria dos grupos avaliados. É possível que tal resultado tenha sido influenciado pelo hábito da espécie, uma vez que a *B. neuwiedi* é considerada especialista de mamíferos em todos seus estágios etários (MARTINS, M., MARQUES, O. A. V., SAZIMA, 2002), portanto, a presença de uma atividade como a proteolítica em todos os grupos de idade poderia ser devida a uma necessidade compartilhada da dieta por todas as faixas etárias. A baixa proteolítica (tanto em caseína como em colágeno) por parte do grupo de 3 anos poderia ser explicada pela baixa representatividade de indivíduos no grupo.

Porém, embora a dieta seja um fator que influencia na composição e atividades do veneno, não é possível descartar outros fatores potencialmente responsáveis pela variação do veneno nesta espécie. A *B. neuwiedi* é uma espécie com uma ampla distribuição geográfica, e até pouco era considerada parte de um complexo de espécies graças à sua grande variabilidade fenotípica (MACHADO; SILVA; SILVA, 2014). Como tem sido demonstrado, o veneno também é influenciado pela distribuição das espécies (BOURKE et al., 2021; MORA-OBANDO et al., 2020), pelo que é possível que esse fator esteja influenciando na composição do veneno de *B. neuwiedi*.

A atividade procoagulante é uma das principais causas de letalidade em casos de envenenamento (Furtado et al. 1991). É bem conhecido que os principais fatores que influenciam na capacidade coagulante do veneno são as atividades da PLA₂, as SVSP, as SVMP e as lectinas tipo C (BOURKE et al., 2021; MORITA, 2005; PLA et al., 2019). É provável que a atividade coagulante dependa da sinergia destas famílias de proteínas. Levando em consideração que a coagulotoxicidade é diretamente proporcional à imobilização da presa, uma maior atividade coagulante observada no veneno nos filhotes pode se dever à necessidade de retenção da presa (DEBONO et al., 2019; RODRIGUES et al., 2021a).

Uma maior atividade procoagulante em serpentes mais jovens já foi descrita para outras espécies de *Bothrops*, como por exemplo para as serpentes *B. jararacussu* (RODRIGUES et al.,

2021b) e *B. atrox* (BERNAL et al., 2020). Sugere-se que os indivíduos jovens de *Bothrops* podem necessitar de uma maior coagulotoxicidade para subjugar a pressa, uma vez essa característica está relacionada à letalidade do veneno (RODRIGUES et al., 2021b). Entretanto, neste trabalho não foram encontradas diferenças entre as atividades coagulantes dos venenos dos diferentes grupos de idade de *B. neuwiedi*.

Embora não tenha sido encontrada grandes diferenças entre as DL_{50} dos jovens e senis, houve diferença no tempo de morte desses grupos. Uma ação letal mais rápida em camundongos pelo veneno de serpentes mais velhas também foi observado em estudos de ontogenia de *B. moojeni* (HATAKEYAMA et al., 2021) e *B. jararacussu* (FREITAS-DE-SOUSA et al., 2020).

Adicionalmente, foi realizada a necropsia dos camundongos injetados com a dose 116 μ g de veneno de ambos dos grupos (jovens e senis). Observou-se que no caso do veneno senil, o intestino apresentou petéquias hemorrágicas, além de peritônio, mesentério e diafragma com hemorragia. Por outro lado, os camundongos injetados com o veneno de serpentes jovens apresentaram petéquias no estômago, no intestino observou-se hemorragia, e o peritônio, o mesentério e o diafragma apresentaram hemorragia com complicação (hemorragia difusa), além disso, o vaso de um dos indivíduos tinha características friáveis. Isso corrobora com os dados obtidos para a atividade hemorrágica, sendo que o veneno dos indivíduos jovens age ocasionando hemorragias sistêmicas. Inclusive, um estudo de epidemiologia de acidente ofídico feito com *B. atrox* no Brasil, concluiu que quanto menor é o tamanho da serpente, maior é o sangramento ocasionado, sugerindo que o veneno das serpentes jovens tende a ser mais hemorrágico (NASCIMENTO DA COSTA et al., 2020). Por tanto, este trabalho demonstra que o veneno de filhotes de *B. neuwiedi* também possuem efeitos hemorrágicos semelhantes aos já descritos em outras espécies.

Em relação ao reconhecimento imunológico todos os venenos apresentaram resultados semelhantes. No ensaio de *western blotting* foi observado um baixo reconhecimento das proteínas entre 15 e 37 kDa, provavelmente em virtude do baixo imunorreconhecimento das proteínas nessa faixa de peso molecular. Tal fato já havia sido observado em outros estudos, como no estudo de Colombini (COLOMBINI et al., 2001), em que as bandas entre 14,3 e 46 kDa foram pouco reconhecidas pelo *western blotting*, tanto do veneno de *Bothrops atrox* quanto de *Lachesis muta*, provavelmente devido ao fato de a imunogenicidade das moléculas estar relacionada ao seu tamanho. Moléculas de maior peso molecular têm maior probabilidade de serem reconhecidas pelo

sistema imunológico, portanto, a imunogenicidade de moléculas mais leves é menor (ABBAS, 2007).

Nesta mesma faixa de entre 16 e 37 kDa encontram-se as SVSP (AMORIM et al., 2018; MORA-OBANDO et al., 2020; ZELANIS et al., 2016). Apesar que de ser bem reconhecido o papel dessa família de proteínas no envenenamento ocasionando a desestabilização da homeostasia do sangue, está documentado que os soros antiofídicos comerciais não neutralizam completamente esta família de proteínas (KUNIYOSHI et al., 2019). Este estudo confere que a imunogenicidade dessa família pode ser baixa.

A para-especificidade dos soros antiofídicos latino-americanos geralmente ocasionam o reconhecimento cruzado de proteínas do veneno de outras espécies de serpente (MORA-OBANDO et al., 2021), pelo qual é provável que o soro antibotrópico tenha reconhecido os venenos de todas as idades no ensaio ELISA. Assim como observado nesse trabalho, o veneno de *B. jararacussu*, também não apresentou diferenças significativas dependentes da idade no reconhecimento do soro antibotrópico (DA SILVA AGUIAR et al., 2020). No entanto, é interessante notar que o ensaio de reconhecimento deve ser analisado junto com um teste de neutralização *in vivo* para comprovar a eficácia do soro.

O teste da eficácia do soro antibotrópico *in vivo* mostrou que o veneno das serpentes jovens necessitou de uma quantidade maior de soro antiofídico para neutralizar a dose desafio. Um estudo que correlaciona a ontogenia e coagulotoxicidade, propriedade altamente relacionada com a letalidade, usando a *B. jararacussu* como modelo, demonstrou que o veneno das serpentes mais jovens apresentou uma neutralização menos eficaz pelo soro antiofídico do que o veneno das serpentes mais velhas (RODRIGUES et al., 2021b). Isso demonstra que as diferenças ontogenéticas na composição do veneno, influenciam no reconhecimento e neutralização por parte do soro antibotrópico. Esse fato ressalta a importância de incluir veneno de diferentes faixas etárias na elaboração do soro.

É possível que a dieta diferencial das serpentes seja importantes para as diferenças das variações ontogenéticas encontradas, uma vez os animais de diferentes faixas etárias ocupam nichos ecológicos diferentes (SURM; MORAN, 2021). No caso de *B. neuwiedi*, ela é considerada uma espécie especialista (MARTINS, M., MARQUES, O. A. V., SAZIMA, 2002), ou seja, apresenta consumo majoritariamente de mamíferos. A ingestão de ectotermos também está

descrita, embora em menor frequência. Outra hipótese que explicaria a mudança nas propriedades do veneno é a mudança no tamanho da presa, sendo que tamanhos diferenças requerem diferentes tipos de veneno (MACKESSY et al., 2018). Por outro lado, ao se tratar de uma espécie especialista, é provável que outros fatores, como a distribuição geográfica, tenham influenciado na evolução e composição do veneno de *B. neuwiedi* de forma mais efetiva do que a dieta.

Embora tenha sido observado que algumas características não dependem da idade, foi possível notar que o veneno da serpente *B. neuwiedi* apresenta, no geral, mudanças intraespecíficas em seu veneno, o que pode ser observado no resumo geral das atividades na Tabela 2. Foi possível observar uma variação na atividade hemorrágica de acordo com a idade, também descrita para outras espécies (DA SILVA AGUIAR et al., 2020; NASCIMENTO DA COSTA et al., 2020). Levando em consideração os resultados obtidos do teste de DE₅₀ e o trabalho de Rodrigues e colaboradores (2021), é possível concluir que o soro antibotrópico não seja tão eficaz em neutralizar o veneno das serpentes de faixas etárias mais jovens, o que sugere a inclusão de venenos de serpentes de diferentes idades para melhorar o tratamento do soro antiofídico.

Tabela 2. Resumo das atividades bioquímicas e biológicas do veneno de *B. neuwiedi* e sua neutralização. Os signos mais (+) indicam o grau de atividade. Três signos (+++) indicam alta atividade, dois signos (++) indicam atividade média e um signo (+) indica atividade baixa. Os signos menos (-) indicam que não foi realizada medição da atividade ou o ensaio de neutralização no grupo.

	Sexo	Neonatos	1 ano	2 anos	3 anos	Senis
	Machos	+	++	+++	+++	+++
Atividade de LAAU	Fêmeas	-	++	+	+	+++
	Machos	+	+++	++	++	+
Auvidade de PLA ₂	Fêmeas	-	+++	+	+	+
A tividada apacinalítica	Machos	+++	+	++	+	+++
Auvidade casemontica	Fêmeas	-	+	+++	+	+++
A tividada cologonalítica	Machos	+	+	++	+	++
Auviuaue colagenolitica	Fêmeas	-	+	+++	+	+++
A tividada accoulanta	Machos	+++	+++	+++	++	++
Auvidade coaguiante	Fêmeas	-	+++	++	+++	+++
Atividade hemorrágica	Machos e fêmeas	-	+++	-	-	+
Dose letal média	Machos e fêmeas	-	+	-	-	++
Dose efetiva média	Machos e fêmeas	-	++	-	-	+
ET ISA	Machos	+	+	+	+	+
ELISA	Fêmeas	-	+	+	++	+

6 Conclusões

O veneno de *B. neuwiedi* demonstrou ter uma dependência de idade em certas características avaliadas. Ao comparar os géis de eletroforese e os perfis cromatográficos, observa-se que as principais flutuações são encontradas nas proteínas de alto peso molecular, presumivelmente SVMP e CRISPs, além de apresentar picos de eluição provavelmente relacionados às PLA₂ K49. Segundo a análise de massas, a abundância de LTC, CRISPs e SVMP P-III apresentam uma dependência da idade, assim como as PLA₂ D49 no caso dos machos.

As atividades proteolíticas (colagenolíticas e caseinolíticas) apresentem variações relacionadas com a faixa etária. Assim mesmo, o veneno dos neonatos apresentou proteínas de entre 50 e 75 kDa que, embora normalmente dita faixa de massa molecular se associa a SVMP, não mostraram proteólise, e isso se correlacionou com os testes *in vitro* das atividades. É necessária a identificação dessas bandas para afirmar com certeza o tipo de proteína que contém. Por outro lado, a atividade LAAO demostrou depender da idade no caso do veneno dos machos, mostrando um aumento nos grupos mais velhos. Já a atividade PLA₂ apresentou uma diminuição dependente da idade, mais notável no caso dos machos.

O veneno dos indivíduos jovens apresentou-se mais hemorrágico, enquanto o veneno dos adultos possui um veneno com capacidade de abater mais rapidamente os camundongos. Portanto, é possível que os indivíduos de diferentes faixas etárias estejam ocupando diferentes nichos ecológicos, para o qual eles precisam atividades diferente no veneno.

O reconhecimento imunológico do veneno pelo soro antibotrópico não foi significativamente diferente entre as faixas etárias. De acordo com o teste de *western blotting*, as proteínas nas bandas entre 20 e 37 kDa não foram reconhecidas pelo soro. Tais resultados são corroborados com os testes *in vivo*, pois o soro não conseguiu neutralizar com a mesma eficácia os venenos de diferentes idades, sugerindo o uso de venenos de diferentes faixas etárias para o melhoramento do soro.

7 Referências bibliográficas

ABBAS, A. K. **Cellular and molecular immunology**. 6th. ed. Philadelphia: Pensilvania: Elsevier /Saunders, 2007.

ABREU, Thiago F. et al. Peptidomics of Acanthoscurria gomesiana spider venom reveals new toxins with potential antimicrobial activity. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 151, p. 232–242, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.07.012.

ALENCAR, Laura R. V.; QUENTAL, Tiago B.; GRAZZIOTIN, Felipe G.; ALFARO, Michael L.; MARTINS, Marcio; VENZON, Mericien; ZAHER, Hussam. Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, *[S. l.]*, v. 105, p. 50–62, 2016. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.07.029. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.07.029.

AMORIM, Fernanda Gobbi; COSTA, Tassia Rafaela; BAIWIR, Dominique; DE PAUW, Edwin; QUINTON, Loic; SAMPAIO, Suely Vilela. Proteopeptidomic, functional and immunoreactivity characterization of Bothrops moojeni snake venom: Influence of snake gender on venom composition. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 10, n. 5, p. 1–18, 2018. DOI: 10.3390/toxins10050177.

ANDE, Sudharsana Rao; KOMMOJU, Phaneeswara Rao; DRAXL, Sigrid; MURKOVIC, Michael; MACHEROUX, Peter; GHISLA, Sandro; FERRANDO-MAY, Elisa. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, *[S. l.]*, v. 11, n. 8, p. 1439–1451, 2006. DOI: 10.1007/s10495-006-7959-9.

ANDRADE, Denis V; ABE, Augusto S. Relationship of venom ontogeny and diet in Bothrops. **Herpetologica**, *[S. l.]*, v. 55, n. 2, p. 200–204, 1999. DOI: 10.2307/3893080.

ANTUNES, Thatiane C.; YAMASHITA, Karine M.; BARBARO, Katia C.; SAIKI, Mitiko; SANTORO, Marcelo L. Comparative analysis of newborn and adult Bothrops jararaca snake venoms. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 56, n. 8, p. 1443–1458, 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.08.011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.011.

BARD, R.; DE LIMA, J. C. R.; PEREIRA DE SA NETO, R.; GUEDES DE OLIVEIRA, S.; DOS SANTOS, M. C. Inefficacy of bothropic antivenom on the neutralization of the coagulant activity of Lachesis muta muta venom. Case report and experimental evidence. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, *[S. l.]*, v. 36, n. 1, p. 77–81, 1994. DOI: 10.1590/s0036-46651994000100012.

BARLOW, Axel; POOK, Catharine E.; HARRISON, Robert A.; WÜSTER, Wolfgang. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, *[S. l.]*, v. 276, n. 1666, p. 2443–2449, 2009. DOI: 10.1098/rspb.2009.0048.

BERMÚDEZ-MÉNDEZ, Erick; FUGLSANG-MADSEN, Albert; FØNS, Sofie; LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José María; LAUSTSEN, Andreas Hougaard. Innovative immunization strategies for antivenom development. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 10, n. 11, p. 1–37, 2018. DOI: 10.3390/toxins10110452.

BERNAL, Jorge Carlos Contreras et al. "Bad things come in small packages": predicting venom-

induced coagulopathy in Bothrops atrox bites using snake ontogenetic parameters. **Clinical Toxicology**, *[S. l.]*, v. 58, n. 5, p. 388–396, 2020. DOI: 10.1080/15563650.2019.1648817. Disponível em: https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1648817.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Répteis brasileiros: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, *[S. l.]*, v. 4, n. 3, p. 75–93, 2015.

BJARNASON, Jon Bragi; FOX, Jay William. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Toxin Reviews**, *[S. l.]*, v. 7, n. 2, p. 121–209, 1988. DOI: 10.3109/15569548809059729.

BJARNASON, Jon Bragi; FOX, Jay William. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**, *[S. l.]*, v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994. DOI: 10.1016/0163-7258(94)90049-3.

BON, C. Serum therapy was discovered 100 years ago. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 2.34, n. 34, p. 42–143, 1996.

BOURKE, Lachlan A.; ZDENEK, Christina N.; NERI-CASTRO, Edgar; BÉNARD-VALLE, Melisa; ALAGÓN, Alejandro; GUTIÉRREZ, José María; SANCHEZ, Eladio F.; ALDRIDGE, Matt; FRY, Bryan G. Pan-American Lancehead Pit-Vipers: Coagulotoxic Venom Effects and Antivenom Neutralisation of Bothrops asper and B. atrox Geographical Variants. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 13, n. 2, 2021. DOI: 10.3390/toxins13020078.

CALVETE, Juan J. et al. Snake population venomics and antivenomics of Bothrops atrox: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 74, n. 4, p. 510–527, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.01.003. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003.

CALVETE, Juan J. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. **Biochemical Journal**, *[S. l.]*, v. 474, n. 5, p. 611–634, 2017. DOI: 10.1042/BCJ20160577. Disponível em: http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BCJ20160577.

CALVETE, Juan J.; JUÁREZ, Paula; SANZ, Libia. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, *[S. l.]*, v. 42, n. 11, p. 1405–1414, 2007. DOI: 10.1002/jms.

CâMARA, Guilherme A.; NISHIYAMA-JR, Milton Y.; KITANO, Eduardo S.; OLIVEIRA, Ursula C.; SILVA, Pedro I. d.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, Inácio L.; TASHIMA, Alexandre K. A Multiomics Approach Unravels New Toxins With Possible In Silico Antimicrobial, Antiviral, and Antitumoral Activities in the Venom of Acanthoscurria rondoniae. **Frontiers in Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 11, n. July, p. 1–14, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.01075.

CAMEY, Kyoko U.; VELARDE, David T.; SANCHEZ, Eladio F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 40, n. 5, p. 501–509, 2002. DOI: 10.1016/S0041-0101(01)00245-8.

CASEWELL, Nicholas R.; JACKSON, Timothy N. W.; LAUSTSEN, Andreas H.; SUNAGAR, Kartik. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. **Trends in Pharmacological Sciences**, *[S. l.]*, v. 41, n. 8, p. 570–581, 2020. DOI: 10.1016/j.tips.2020.05.006.

CASEWELL, Nicholas R.; WÜSTER, Wolfgang; VONK, Freek J.; HARRISON, Robert a.; FRY, Bryan G. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. **Trends in Ecology and Evolution**, *[S. l.]*, v. 28, n. 4, p. 219–229, 2013. DOI: 10.1016/j.tree.2012.10.020.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake Venom Variability : Methods of Study, Results and Interpretation. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 29, n. 11, p. 1279–1303, 1991.

CHIPPAUX, Jean Philippe. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 23, n. 1, p. 1–2, 2017. DOI: 10.1186/s40409-017-0127-6.

COLOMBINI, M.; FERNANDES, I.; CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Lachesis muta muta venom: Immunological differences compared with Bothrops atrox venom and importance of specific antivenom therapy. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 39, n. 5, p. 711–719, 2001. DOI: 10.1016/S0041-0101(00)00201-4.

CUNHA, Luis Eduardo Ribeiro. Soros Antiofídicos: História, Evolução E Futuro. **Journal Health Npeps**, *[S. l.]*, v. 2, n. 1, p. 1–4, 2017.

DA SILVA AGUIAR, Weslei; DA COSTA GALIZIO, Nathália; SANT'ANNA, Sávio Stefanini; SILVEIRA, Giovanni Perez M.; DE SOUZA RODRIGUES, Fabíola; GREGO, Kathleen Fernandes; DE MORAIS-ZANI, Karen; TANAKA-AZEVEDO, Anita Mitico. Ontogenetic study of Bothrops jararacussu venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, *[S. l.]*, 2020.

DA SILVA, Vinfcius Xavier; RODRIGUES, Miguel Trefaut. Taxonomic revision of the Bothrops neuwiedi complex (serpentes, viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, *[S. l.]*, v. 7, n. 1, p. 45–90, 2008. DOI: 10.11606/issn.2316-9079.v7i1p45-90.

DALTRY, Jennifer C.; WÜSTER, Wolfgang; THORPE, Roger S. Diet and snake venom variationNature, 1996.

DE PAULA, R. C.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, P. A.; FULY, André L. Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. **Protein and Peptide Letters**, *[S. l.]*, v. 16, n. 8, p. 899–907, 2009. DOI: 10.2174/092986609788923365.

DEBONO, Jordan; BOS, Mettine H. A.; NOUWENS, Amanda; GE, Lilin; FRANK, Nathaniel; KWOK, Hang Fai; FRY, Bryan G. Habu coagulotoxicity: Clinical implications of the functional diversification of Protobothrops snake venoms upon blood clotting factors. **Toxicology in Vitro**, *[S. l.]*, v. 55, n. August 2018, p. 62–74, 2019. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.11.008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.11.008.

DISTLER, Ute; KUHAREV, Jörg; NAVARRO, Pedro; LEVIN, Yishai; SCHILD, Hansjörg; TENZER, Stefan. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. **Nature Methods**, *[S. l.]*, v. 11, n. 2, p. 167–170, 2014. DOI: 10.1038/nmeth.2767.

DO AMARAL, Afranio. A general consideration of snake poisoning and observations on neotropical pitvipers. **Harvard university press**, [S. l.], v. 2, 1925.

DU, Xiao Yan; CLEMETSON, Kenneth J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002. DOI: 10.1016/S0041-0101(02)00102-2.

ENGVALL, Eva; PERLMANN, Peter. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, *[S. l.]*, v. 8, n. 9, p. 871–874, 1971. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-X.

ESCALANTE, Teresa; RUCAVADO, Alexandra; FOX, Jay W.; GUTIÉRREZ, José María. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 74, n. 9, p. 1781–1794, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.03.026. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.026.

FINNEY, David. Probit Analysis. 3rd. ed. [s.l.] : Cambridge University Press, 1971.

FOX, Jay W.; SERRANO, Solange M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 45, n. 8, p. 969–985, 2005.

FOX, Jay W.; SERRANO, Solange 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**, *[S. l.]*, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x.

FRANÇA, F. O. ..; MALAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. *In*: SARVIER (org.). Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo. p. 72–86.

FREITAS-DE-SOUSA, Luciana A. et al. Size Matters: An Evaluation of the Molecular Basis of Ontogenetic Modifications in the Composition of Bothrops jararacussu Snake Venom. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 12, n. 12, 2020. DOI: 10.3390/toxins12120791.

FRY, B. G.; WÜSTER, W. Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, *[S. l.]*, v. 21, p. 870–883, 2004. DOI: 10.1093/molbev/msh091.

FRY, Bryan 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**, *[S. l.]*, v. 15, n. 3, p. 403–20, 2005. DOI: 10.1101/gr.3228405.

FRY, Bryan G.; WÜSTER, Wolfgang; RYAN RAMJAN, Sheik Fadil; JACKSON, Timothy; MARTELLI, Paolo; KINI, R. Manjunatha. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, *[S. l.]*, v. 17, n. 18, p. 2047–2062, 2003. DOI: 10.1002/rcm.1148.

FURTADO, F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 29, n. 2, p. 219–226, 1991. DOI: 10.1016/0041-0101(91)90106-2.

FURTADO, M. F. D.; COLLETTO, G. M. D. ..; SILVA, W. D. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. **Mem. Inst. Butantan**, *[S. l.]*, v. 53, n. 2, p. 149–159, 1991.

GIBBS, H. Lisle; SANZ, Libia; CHIUCCHI, James E.; FARRELL, Terence M.; CALVETE, Juan J. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (Sistrurus miliarius barbouri). **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.06.013.

GIRÓN, María E.; PADRÓN, Vanessa; RAMOS, María I.; SÁNCHEZ, Elda E.; GUERRERO, Belsy; GARCÍA, Alberto; UZCÁTEGUI, Néstor L.; NAVARRETE, Luis F.; RODRÍGUEZ-

ACOSTA, Alexis. Intraspecies geographical variability in the South American tigra mariposa (Bothrops venezuelensis Sandner 1952) snake venom activities. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 144, p. 23–33, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.01.020.

GONÇALVES-MACHADO, Larissa et al. Combined venomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two Bothrops jararaca populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 135, p. 73–89, 2016. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.04.029. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.04.029.

GREGO, Kathleen Fernandes et al. Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present : a scoping history. [S. l.], n. December 2020, p. 1–11, 2021.

GUEDES, Thaís B.; NOGUEIRA, Cristiano; MARQUES, O. a. V. **Diversity, natural history, and geographic distribution of snakes in the Caatinga, Northeastern Brazil**. [s.l: s.n.]. v. 3863

GUÉRCIO, Rafael A. P.; SHEVCHENKO, Anna; SHEVCHENKO, Andrej; LÓPEZ-LOZANO, Jorge L.; PABA, Jaime; SOUSA, Marcelo V.; RICART, Carlos A. O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake Bothrops atrox. **Proteome Science**, *[S. l.]*, 2006. DOI: 10.1186/1477-5956-4-11.

GUTIÉRREZ, J. M.; DOS SANTOS, M. C.; DE FATIMA FURTADO, M.; ROJAS, G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn Crotalus durissus durissus and adult Crotalus durissus terrificus rattlesnakes. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 29, n. 10, p. 1273–1277, 1991. DOI: 10.1016/0041-0101(91)90201-2.

GUTIÉRREZ, José María et al. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 9, n. 5, p. 1–22, 2017. DOI: 10.3390/toxins9050163.

GUTIÉRREZ, José María; LEÓN, Guillermo; BURNOUF, Thierry. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. **Biologicals**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 129–142, 2011. DOI: 10.1016/j.biologicals.2011.02.005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.02.005.

HARLOW, Edward. Immunoblotting. *In*: **Antibodies, a Laboratory Mannual**. [s.l: s.n.]. p. 471–510.

HATAKEYAMA, Daniela Miki et al. Venom complexity of Bothrops atrox (common lancehead) siblings. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 26, n. September 2020, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0018.

HATAKEYAMA, Daniela Miki et al. From birth to adulthood: An analysis of the Brazilian lancehead (Bothrops moojeni) venom at different life stages. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 16, n. 6 June, p. 1–25, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0253050.

HEUSSEN, Christa; DOWDLE, Eugene B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, *[S. l.]*, 1980. DOI: 10.1016/0003-2697(80)90338-3.

JUÁREZ, Paula; SANZ, Libia; CALVETE, Juan J. Snake venomics: characterization of protein

families in Sistrurus barbouri venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, *[S. l.]*, v. 4, n. 2, p. 327–38, 2004. DOI: 10.1002/pmic.200300628.

KAMIGUTI, A. S. Atividade coagulante, inflamatória e proteolítica dos venenos de Bothrops jararaca recém-nascida e adulta. 1988. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, [S. l.], 1988.

KANASHIRO, Milton M.; CA, Rita De; ALVES, Elias W.; MACHADO, Olga L. T.; DIAS, Wilmar; KIPNIS, Thereza L. Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom. *[S. l.]*, v. 64, 2002.

KARDONG, K. The Predatory Strike of the Rattlesnake: When Things Go Amiss. **American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, *[S. l.]*, v. 1986, n. 3, p. 816–820, 1986. DOI: http://www.jstor.org/stable/1444969.

KAZANDJIAN, T. D. et al. Convergent evolution of pain-inducing defensive venom components in spitting cobras. **Science**, *[S. l.]*, v. 371, n. 6527, p. 386–390, 2021. DOI: 10.1126/science.abb9303.

KINI, R. Manjunatha. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2enzymes. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 42, n. 8, p. 827–840, 2003. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.11.002.

KINI, R. Manjunatha; EVANS, Herbert J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 27, n. 6, p. 613–635, 1989. DOI: 10.1016/0041-0101(89)90013-5.

KISHIMOTO, Masaaki; TAKAHASHI, Tomoko. A spectrophotometric microplate assay for Lamino acid oxidase. **Analytical Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 298, n. 1, p. 136–139, 2001. DOI: 10.1006/abio.2001.5381.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, *[S. l.]*, v. 63, n. 24, p. 3030–3041, 2006. DOI: 10.1007/s00018-006-6315-0.

KONDO, Hisashi; KONDO, Satoru; IREZAWA, Hiroo; MURATA, Ryosuke. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, *[S. l.]*, v. 13, p. 43–51, 1960.

KUNIYOSHI, Alexandre Kazuo; KODAMA, Roberto Tadashi; CAJADO-CARVALHO, Daniela; IWAI, Leo Kei; KITANO, Eduardo; DA SILVA, Cristiane Castilho Fernandes; DUZZI, Bruno; DIAS DA SILVA, Wilmar; PORTARO, Fernanda Calheta. Experimental antivenom against serine proteases from the Bothrops jararaca venom obtained in mice, and its comparison with the antibothropic serum from the Butantan Institute. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 169, n. May, p. 59–67, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.09.001. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, *[S. l.]*, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LALLOO, David G.; THEAKSTON, R. David G. Snake antivenoms. Journal of Toxicology -

Clinical Toxicology, *[S. l.]*, v. 41, n. 3, p. 277–290, 2003. DOI: 10.1081/CLT-120021113.

LEE, Mui Li; TAN, Nget Hong; FUNG, Shin Yee; SEKARAN, Shamala Devi. Antibacterial action of a heat-stable form of 1-amino acid oxidase isolated from king cobra (Ophiophagus hannah) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 153, n. 2, p. 237–242, 2011. DOI: 10.1016/j.cbpc.2010.11.001.

LOPES-DE-SOUZA, Letícia; COSTAL-OLIVEIRA, Fernanda; STRANSKY, Stephanie; FONSECA DE FREITAS, Cláudio; GUERRA-DUARTE, Clara; BRAGA, Vania M. M.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, Carlos. Development of a cell-based in vitro assay as a possible alternative for determining bothropic antivenom potency. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 170, n. May, p. 68–76, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.09.010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.010.

MACHADO BRAGA, Jacqueline Ramos; DE MORAIS-ZANI, Karen; PEREIRA, Diego dos Santos; SANT'ANNA, Sávio Stefanini; DA COSTA GALIZIO, Nathália; TANAKA-AZEVEDO, Anita Mitico; GOMES VILARINHO, Ariel Rodrigues; RODRIGUES, José Lucca; TEIXEIRA DA ROCHA, Marisa Maria. Sexual and ontogenetic variation of Bothrops leucurus venom. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 184, n. April, p. 127–135, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.05.028.

MACHADO, Taís; SILVA, Vinícius X.; SILVA, Maria José de J. Phylogenetic relationships within Bothrops neuwiedi group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, *[S. l.]*, v. 71, n. 1, p. 1–14, 2014. DOI: 10.1016/j.ympev.2013.10.003.

MACKESSY, P.; HOLZER, M. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 34, n. 96, p. 1149–1155, 1996.

MACKESSY, Stephen P. Venom Ontogeny in the Pacific Rattlesnakes Crotalus viridis helleri and C. v. oreganus. **Copeia**, *[S. l.]*, 1988. DOI: 10.2307/1445927.

MACKESSY, Stephen P.; LEROY, Jamie; MOCIÑO-DELOYA, Estrella; SETSER, Kirk; BRYSON, Robert W.; SAVIOLA, Anthony J. Venom ontogeny in the mexican lance-headed rattlesnake (Crotalus polystictus). **Toxins**, *[S. l.]*, v. 10, n. 7, 2018. DOI: 10.3390/toxins10070271.

MALAQUE, Ceila; GUTIÉRREZ, José María. Critical Care Toxicology. *In*: Critical Care Toxicology. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 1–22. DOI: 10.1007/978-3-319-20790-2.

MARKLAND, Francis S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 36, n. 12, p. 1749–1800, 1998.

MARKLAND, Francis S.; SWENSON, Stephen. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 62, p. 3–18, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.09.004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004.

MARTINS, M., MARQUES, O. A. V., SAZIMA, I. Ecological and Phylogenetic Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers of the Genus Bothrops. [s.l.] : Eagle Mountain Publishing, 2002.

MELGAREJO, A. .. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: SAVIER (org.). Animais peçonhentos
no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo. p. 42-70.

MENALDO, Danilo L. et al. Effects of two serine proteases from Bothrops pirajai snake venom on the complement system and the inflammatory response. **International Immunopharmacology**, *[S. l.]*, v. 15, n. 4, p. 764–771, 2013. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.02.023. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.02.023.

MORA-OBANDO, Diana; PLAID, Davinia; LOMONTE, Bruno; GUERRERO-VARGAS, Jimmy Alexander; AYERBE, Santiago; CALVETEID, Juan J. Antivenomics and in vivo preclinical efficacy of six latin american antivenoms towards Southwestern Colombian bothrops asper lineage venoms. [s.l: s.n.]. v. 15 DOI: 10.1371/journal.pntd.0009073.

MORA-OBANDO, Diana; SALAZAR-VALENZUELA, David; PLA, Davinia; LOMONTE, Bruno; GUERRERO-VARGAS, Jimmy Alexander; AYERBE, Santiago; GIBBS, H. Lisle; CALVETE, Juan J. Venom variation in Bothrops asper lineages from North-Western South America. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 229, n. August, p. 103945, 2020. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103945. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103945.

MORITA, Takashi. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 45, n. 8, p. 1099–1114, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.021.

NASCIMENTO DA COSTA, Tamires; MOTA-DA-SILVA, Ageane; COLOMBINI, Mônica; MOURA-DA-SILVA, Ana Maria; MEDEIROS DE SOUZA, Rodrigo; MONTEIRO, Wuelton Marcelo; BERNARDE, Paulo Sérgio. Relationship between snake size and clinical, epidemiological and laboratory aspects of Bothrops atrox snakebites in the Western Brazilian Amazon. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 186, n. June, p. 160–167, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.08.010.

NÚÑEZ, Vitelbina; CID, Pedro; SANZ, Libia; DE LA TORRE, Pilar; ANGULO, Yamileth; LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José María; CALVETE, Juan J. Snake venomics and antivenomics of Bothrops atrox venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 73, n. 1, p. 57–78, 2009. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.07.013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.013.

PEDROSO, Amanda P. et al. Intrauterine Growth Restriction Programs the Hypothalamus of Adult Male Rats: Integrated Analysis of Proteomic and Metabolomic Data. **Journal of Proteome Research**, *[S. l.]*, v. 16, n. 4, p. 1515–1525, 2017. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00923.

PEREIRA, André Zelanis Palitot. Análise da variabilidade ontogenética do veneno de **Bothrops insularis (Amaral, 1921): implicações adaptativas aos itens alimentares**. 2006. Instituto de Biocênciasi, *[S. l.]*, 2006.

PÉREZ, Aida Verónica; SARAVIA, Patricia; RUCAVADO, Alexandra; SANT'ANA, Carolina D.; SOARES, Andreimar M.; GUTIÉRREZ, José María. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 49, p. 1063–1069, 2007. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.12.011.

PLA, Davinia et al. Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus Bothriechis). **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 152, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.10.006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.006.

PLA, Davinia et al. Phylovenomics of Daboia russelii across the Indian subcontinent. Bioactivities and comparative in vivo neutralization and in vitro third-generation antivenomics of antivenoms against venoms from India, Bangladesh and Sri Lanka. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 207, n. May, p. 103443, 2019. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.103443. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103443.

QUEIROZ, Giselle Pidde; PESSOA, Lucas Alves; PORTARO, Fernanda C. V.; FURTADO, Maria de Fátima D.; TAMBOURGI, Denise V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 52, n. 8, p. 842–851, 2008. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.10.002.

RAPPSILBER, Juri; MANN, Matthias; ISHIHAMA, Yasushi. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, *[S. l.]*, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.261.

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**, *[S. l.]*, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.10.015.

RODRIGUES, Caroline Fabri Bittencourt et al. BoaγPLI from Boa constrictor Blood is a Broad-Spectrum Inhibitor of Venom PLA2 Pathophysiological Actions. **Journal of Chemical Ecology**, *[S. l.]*, n. 0123456789, 2021. a. DOI: 10.1007/s10886-021-01289-4. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10886-021-01289-4.

RODRIGUES, Caroline Fabri Bittencourt et al. Clinical implications of ontogenetic differences in the coagulotoxic activity of Bothrops jararacussu venoms. **Toxicology Letters**, *[S. l.]*, v. 348, p. 59–72, 2021. b. DOI: 10.1016/j.toxlet.2021.05.005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.05.005.

RODRIGUES, Renata S. et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from Bothrops pauloensis snake venom. **Biochimie**, *[S. l.]*, v. 91, n. 4, p. 490–501, 2009. DOI: 10.1016/j.biochi.2008.12.004.

RODRIGUES, Renata S.; BOLDRINI-FRANÇA, Johara; FONSECA, Fernando P. P.; DE LA TORRE, Pilar; HENRIQUE-SILVA, Flávio; SANZ, Libia; CALVETE, Juan J.; RODRIGUES, Veridiana M. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of Bothropoides pauloensis. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 75, n. 9, p. 2707–2720, 2012. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.03.028. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.028.

ROKYTA, Darin R.; MARGRES, Mark J.; WARD, Micaiah J.; SANCHEZ, Elda E. The genetics of venom ontogeny in the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **PeerJ**, *[S. l.]*, 2017. DOI: 10.7717/peerj.3249.

SALDARRIAGA, Mónica María; OTERO, Rafael; NÚÑEZ, Vitelbina; TORO, Maria Fabiola; DÍAZ, Abel; GUTIÉRREZ, José María. Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 42, n. 4, p. 405–411, 2003. DOI: 10.1016/S0041-0101(03)00171-5.

SANTORO, Marcelo Larami et al. Ontogenetic variation in biological activities of venoms from hybrids between bothrops erythromelas and Bothrops neuwiedi snakes. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 10, n. 12, p. 1–22, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0145516.

SEO, Tadahiko et al. Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupts cell–cell adhesions in vitro and induces haemorrhage in vivo. **FEBS Journal**, *[S. l.]*, v. 284, n. 11, p. 1657–1671, 2017. DOI: 10.1111/febs.14066.

SERRANO, Solange M. T.; SHANNON, John D.; WANG, Deyu; CAMARGO, Antonio C. M.; FOX, Jay W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, *[S. l.]*, v. 5, n. 2, p. 501–510, 2005. DOI: 10.1002/pmic.200400931.

SILVA, Vinícius Xavier Da; RODRIGUES, Miguel Trefaut. Taxonomic revision of the Bothrops neuwiedi comples (Serpents, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa:** Journal of Herpetology, [S. l.], v. 7.1, p. 45–90, 2008.

SILVA, Jeffrey C.; GORENSTEIN, Marc V.; LI, Guo Zhong; VISSERS, Johannes P. C.; GEROMANOS, Scott J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: A virtue of parallel MS acquisition. **Molecular and Cellular Proteomics**, *[S. l.]*, v. 5, n. 1, p. 144–156, 2006. DOI: 10.1074/mcp.M500230-MCP200.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2021.

SOUSA, Leijiane F. et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 7, n. 9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002442.

SUN, Ming Zhong; GUO, Chunmei; TIAN, Yuxiang; CHEN, Duo; GREENAWAY, Frederick T.; LIU, Shuqing. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: A novel snake venom l-amino acid oxidase from Agkistrodon blomhoffii ussurensis. **Biochimie**, *[S. l.]*, v. 92, n. 4, p. 343–349, 2010. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.01.013.

SURM, Joachim M.; MORAN, Yehu. Insights into how development and life-history dynamics shape the evolution of venom. **EvoDevo**, *[S. l.]*, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2021. DOI: 10.1186/s13227-020-00171-w. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13227-020-00171-w.

TAN, Choo Hock; TAN, Kae Yi; YAP, Michelle Khai Khun; TAN, Nget Hong. Venomics of Tropidolaemus wagleri, the sexually dimorphic temple pit viper: Unveiling a deeply conserved atypical toxin arsenal. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 7, n. August 2016, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1038/srep43237.

TAN, Nget-hong; FUNG, Shin-yee. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases and Their Potential Biomedical Applications. Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–10, 2008.

TASHIMA, Alexandre K.; SANZ, Libia; CAMARGO, Antonio C. M.; SERRANO, Solange M. T.; CALVETE, Juan J. Snake venomics of the Brazilian pitvipers Bothrops cotiara and Bothrops fonsecai. Identification of taxonomy markers. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 71, n. 4, p. 473–485, 2008. DOI: 10.1016/j.jprot.2008.07.007.

TASOULIS, Theo; ISBISTER, Geoffrey K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 9, n. 9, 2017. DOI: 10.3390/toxins9090290.

TEIXEIRA, Catarina De Fátima Pereira; FERNANDES, Cristina Maria; ZULIANI, Juliana Pavan; ZAMUNER, Silvia Fernanda. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, *[S. l.]*, v. 100, p. 181–184, 2005. DOI: 10.1590/S0074-02762005000900031.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization**, *[S. l.]*, v. 61, n. 6, p. 949–56, 1983.

VILLARROEL, M. Siles; ZELANTE, F.; ROSA, R. Rolim; FURLANETTO, R. S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. **Mem. Inst. Butantan**, *[S. l.]*, v. 42, n. 43, p. 223–311, 1978.

WANG, Wen-Jeng; HUANG, Tur-Fu. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Thrombosis and haemostasis**, *[S. l.]*, v. 88, n. 04, p. 641–650, 2002.

WILLIAMS, V.; WHITE, J. Variation in the composition of the venom from a single specimen of Pseudonaja textilis (common brown snake) over one year. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 30, n. 2, p. 202–206, 1992. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90473-I.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. **WHO**, *[S. l.]*, p. 1–134, 2010.

WÜSTER, Wolfgang; PEPPIN, Lindsay; POOK, Catharine E.; WALKER, Daniel E. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, *[S. l.]*, v. 49, n. 2, p. 445–459, 2008. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.08.019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2008.08.019.

YU, Chunlin; YU, Huahua; LI, Pengcheng. Highlights of animal venom research on the geographical variations of toxin components, toxicities and envenomation therapy. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. l.]*, v. 165, p. 2994–3006, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.190. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.190.

ZELANIS, André et al. Proteomic identification of gender molecular markers in Bothrops jararaca venom. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 139, p. 26–37, 2016. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.02.030. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.030.

ZELANIS, André; TASHIMA, Alexandre K.; ROCHA, Marisa M. T.; FURTADO, Maria F.; CAMARGO, Antonio C. M.; HO, Paulo L.; SERRANO, Solange M. T. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of Bothrops jararaca reveals different strategies to deal with prey. **Journal of Proteome Research**, *[S. l.]*, v. 9, n. 5, p. 2278–2291, 2009. DOI: 10.1021/pr901027r.

Apêndices

Serpente	Ano nascimento	Grupo	Sexo	Peso (g)	Comprimento (cm)
1001-03	2010	Senil	Μ	105 g	69 - 77,5 cm
0803	NA	Senil	М	265 g	80 - 92 cm
0808	NA	Senil	М	205 g	75 - 84 cm
0901-02	2009	Senil	F	735 g	105 - 118 cm
0901-04	2009	Senil	F	425 g	76 - 79,3 cm
0906	NA	Senil	F	695 g	104 - 114 cm
1501-05	2015	3 anos	F	226,2 g	70 - 77 cm
1501-01	2015	3 anos	F	185,8 g	68 - 75,5 cm
1501-06	2015	3 anos	М	95,7 g	60,5 - 69 cm
1501-08	2015	3 anos	Μ	69,5 g	51,5 - 59,5 cm
1601-01	2016	2 anos	М	79,4 g	55,5 - 65 cm
1601-02	2016	2 anos	F	112,6 g	62 - 70 cm
1601-03	2016	2 anos	F	126,1 g	60,5 - 66,5 cm
1602-01	2016	2 anos	F	120,5 g	56 - 63 cm
1602-02	2016	2 anos	F	105,1 g	55 - 61,5 cm
1602-03	2016	2 anos	Μ	85,8 g	55 - 63,5 cm
1603-02	2016	2 anos	F	101 g	59,5 - 66,5 cm
1603-03	2016	2 anos	Μ	77,8 g	49 - 56,5 cm
1701-01	2017	1 ano	М	78,4 g	54 - 63 cm
1701-02	2017	1 ano	Μ	88,9 g	55 - 63,5 cm
1701-03	2017	1 ano	М	55,1 g	49 - 56,5 cm
1702-01	2017	1 ano	F	127 g	67 - 75,5 cm
1702-02	2017	1 ano	F	98,1 g	60 - 67 cm
1702-03	2017	1 ano	F	82,1 g	59 - 65,5 cm
1702-04	2017	1 ano	F	111,1 g	63,5 - 71 cm
1702-05	2017	1 ano	F	91,9 g	60 - 68 cm
1702-06	2017	1 ano	F	123 g	65 - 74 cm
1702-07	2017	1 ano	Μ	84,4 g	59 - 68,5 cm
1702-08	2017	1 ano	F	80,1 g	58 - 65 cm
1702-09	2017	1 ano	Μ	85,5 g	58,5 - 69 cm
1801-07	2018	RN	Μ	19,6 g	32,5 - 38 cm
1801-08	2018	RN	М	21,5 g	32,5 - 37,5 cm
1901-01	2019	RN	М	9,7 g	24,5 - 29 cm
1901-02	2019	RN	М	10,5 g	25,5 - 29 cm

Apêndice 1. Dados das serpentes de *Bothrops neuwiedi* utilizadas no estudo. NA – Não aplica (serpente coletada na natureza), RN – Recém-nascido, M – Macho, F – Fêmea.

Apêndice 2. Abundância relativa das famílias de proteínas nos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo, identificadas por espectrometria de massas. DIS: Disintegrinas. CRISP: Proteína secretada rica em cisteína. PLA₂ K49: Fosfolipase A₂ com lisina na posição 49. PLA₂ D49: Fosfolipase A₂ com ácido aspártico na posição 49. LAAO: L-amino ácido oxidase. TLP: *Thrombin-like protein*. SVMP: Metaloproteases (P-I, P-II E P-III). SVSP: Serino proteases. CTL: Lectina tipo C. PLA B: Fosfolipase B. FAntiH: Fator anti-hemorrágico. PAP: Proteinase de agregação plaquetária. NUC: Nucleotidases. PPB: Peptídio potenciador de bradiquinina. HYA: hialuronidase; PDE: Fosfodiesterase; CGP: Glutaminil-peptídeo ciclotransferase; VNGF: Fator de crescimento neural. BF: Beta-fibrinogenase. FVEN: Fator de veneno. AP: Ativador de plasminogênio. AFA: *Alpha-fibrinogenase albofibrase*. SER: Serotriflina. M1: Machos de 1 ano. M2: Machos de 2 anos. M3: Machos de 3 anos. MS: Machos senis. F1: Fêmeas de 1 ano. F2: Fêmeas de 2 anos. F3: Fêmeas de 3 anos. FS: Fêmeas senis.

	Abundância relativa (%)													
	M1	M2	M3	MS	F1	F2	F3	FS						
DIS	1,68	0,63	0,19	0,72	2,20	2,77	0,23	2,18						
CRISP	3,45	2,37	2,08	2,33	2,38	2,72	2,96	4,98						
PLA2 K49	4,37	3,06	4,97	3,38	2,81	4,40	3,08	4,66						
LAAO	6,82	7,14	6,98	6,58	5,78	8,42	7,24	5,93						
TLP	7,99	10,35	8,00	6,16	8,27	7,12	7,98	7,10						
SVMP P-II	9,33	8,15	10,05	8,48	6,80	6,77	11,39	9,62						
SVMP P-I	6,30	9,02	7,88	8,32	8,13	8,35	8,50	7,38						
SVSP	10,21	8,70	12,15	10,02	8,88	8,64	8,55	8,23						
PLA ₂ D49	8,76	10,40	9,38	13,62	9,68	9,03	10,91	8,59						
LTC	18,74	12,77	10,19	11,97	13,37	12,56	15,11	9,77						
SVMP P-III	13,58	12,86	15,48	17,63	18,08	15,67	13,72	15,92						
PLA B	0,06	0,62	0,23	0,74	0,54	0,34	0,48	0,33						
FAntiH	0,37	0,77	0,71	1,17	0,79	0,41	0,40	0,31						
CGP	0,19	1,15	0,97	0,20	0,41	1,58	0,03	0,17						
VNGF	0,50	1,64	0,58	1,88	1,72	0,60	0,56	2,08						
PAP	0,49	1,79	0,45	1,03	1,15	0,98	0,60	0,45						
Fator V	1,67	0,89	0,66	0,29	0,33	0,53	0,98	0,06						
PPB	0,41	0,61	0,52	0,23	0,02	0,37	1,52	0,35						
PDE	0,45	0,46	1,84	0,61	1,87	1,69	0,83	1,56						
FVEN	0,21	1,55	0,30	0,57	0,31	0,03	1,12	1,40						
BF	0,24	0,07	1,62	0,30	0,26	0,27	0,27	1,51						
SER	0,23	0,27	0,20	0,62	0,75	0,21	0,47	1,16						
AP	1,50	1,55	1,39	1,80	1,79	2,29	1,38	2,48						
AFA	0,33	1,11	1,27	0,21	0,99	0,45	0,90	0,79						
HYA	1,42	0,39	0,67	0,73	1,94	2,06	0,28	1,57						
NUC	0,71	1,70	1,25	0,40	0,74	1,77	0,48	1,41						

Apêndice 3. Proteínas identificadas por espectometria de massas nos venenos de *B. neuwiedi* de diferentes idades e sexo, utilzando o banco Uniprot Viperidae. CS: *Conffidence score*. PU: Peptídeos únicos. M1: Machos de 1 ano. M2: Machos de 2 anos. M3: Machos de 3 anos. MS: Machos senis. F1: Fêmeas de 1 ano. F2: Fêmeas de 2 anos. F3: Fêmeas de 3 anos. FS: Fêmeas senis.

	Abundância normalizada										
Descrição	Acesso	Confidence score	Peptídeos únicos	Machos 1 ano	Machos 2 anos	Machos 3 anos	Machos Senis	Fêmeas 1 ano	Fêmeas 2 anos	Fêmeas 3 anos	Fêmeas Senis
L-amino acid oxidase Bs29 (Fragment)	sp A0A024BTN9 OXLA_BOT SC	7670.34	124	1.171.946.53 8	1.212.018.72 1	1.854.909.21 8	4.066.695.86 9	1.090.390.61 9	755.295.807	2.784.843.64 1	1.351.060.92 9
Hyaluronidase-1	sp A3QVN9 HYAL1_BITAR	26.56	1	3.799.244.14 5	1.503.029.67 9	1.794.618.14 4	1.019.009.69 1	8.934.170.87 7	2.378.695.46 7	1.170.292.98 1	9.085.822.36 9
Thrombin-like enzyme 1	sp A7LAC6 VSP1_TRIAB	865.73	16	7.096.170.20 3	5.446.107.36 9	5.191.815.99 8	3.326.172.69 5	3.841.639.48 8	1.936.844.95 2	1.706.701.60 8	1.591.530.14 9
Basic phospholipase A2 Drk-b2	sp A8CG90 PA2B2_DABRR	34.8	1	0	1.057.164.73 7	0	4.605.251.18 4	0	1.044.416.39 7	0	6.428.116.23 2
Cysteine-rich venom protein 2	sp B0VXV6 CRVP_SISCA	1055.72	18	8.375.098.32 8	2.391.541.70 4	81.912.749	1.518.131.77 2	2.699.871.85 9	2.593.871.15 7	1.286.504.15 1	6.924.006.45 8
L-amino-acid oxidase	sp B0VXW0 OXLA_SISCA	5648.91	99	8.493.602.17 7	9.933.257.14 7	1.844.799.70 2	2.520.876.37 1	1.696.668.79 1	7.460.187.64 2	8.845.376.88 5	3.155.659.85 2
L-amino-acid oxidase (Fragment)	sp B5AR80 OXLA_BOTPA	24165.36	344	201.786.227	9.497.004.78 2	4.120.691.61 8	4.011.060.77 9	1.078.666.68 1	5.188.346.04 3	4.410.178.37 9	2.580.836.95 2
Acidic phospholipase A2 2	sp B6CQR5 PA2A2_MACLB	28.01	1	0	0	0	197.334.838	0	0	0	0
Snake venom 5'-nucleotidase	sp B6EWW8 V5NTD_GLOBR	1944.5	25	2.580.549.30 2	2.165.866.53 8	5.066.714.14 3	281.117.138	2.271.754.88 4	6.810.640.33 8	399.028.943	1.905.232.41 7
Phospholipase A2 3 (Fragments)	sp C0HJP9 PLA23_BOTDP	679.37	9	2.396.925.91 6	1.644.534.15 5	1.048.691.11 6	8.788.097.91 1	1.195.013.18 5	9.492.656.64 7	7.271.554.64 9	5.021.855.95 2
Snake venom metalloproteinase BpMP-1 (Fragments)	sp C0HJU2 VM11_BOTPA	9424.37	119	364.909.755	7.472.361.96 9	9.390.793.18 2	1.399.044.99 9	1.828.347.03 9	1.274.566.63 3	1.188.758.50 1	6.752.305.20 2
Basic phospholipase A2 APL-D49	sp C0HKC3 PA2B1_AGKPL	1739.98	16	4.836.081.52 4	3.289.545.59 1	9.091.073.61 8	2.147.391.44 8	8.427.419.79 4	2.004.930.72 4	9.046.864.90 4	17.976.152
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like batroxstatin-1	sp C5H5D2 VM31_BOTAT	2184.53	35	475.997.192	5.114.632.26 7	7.650.966.51 8	2.085.229.26 6	2.229.835.96 5	8.295.556.25 4	1.049.004.55 3	6.221.581.64 3
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like batroxstatin-3 (Fragment)	sp C5H5D4 VM33_BOTAT	4396.05	55	4.807.874.00 2	220.758.057	6.083.770.33 1	794.396.874	1.021.581.01 1	1.542.476.11 7	7.581.581.00 9	4.274.230.42 8
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like lachestatin-1	sp C5H5D5 VM31_LACMR	559.36	12	5.485.089.59 8	1.819.662.73 4	105.292.818	1.068.983.66 3	2.253.089.33 6	1.802.203.71 4	1.058.457.66 2	756.831.164
Zinc metalloproteinase-disintegrin VMP-II	sp C9E1R7 VM2V2_CROAT	425.23	9	2.482.890.75 1	5.887.597.48 6	3.579.395.91 7	1.899.446.25 3	1.160.752.72 8	6.696.845.50 3	4.977.311.26 2	1.209.012.32 1
Zinc metalloproteinase/disintegrin VMP-II	sp C9E1R9 VM2V2_CROVV	1376.62	22	1.847.673.32 3	2.451.561.74 3	150.402.944	3.176.655.69 3	6.501.211.93 8	5.501.195.77 7	2.211.904.50 1	1.742.827.71 5
Acidic phospholipase A2 BpPLA2- TXI	sp D0UGJ0 PA2A_BOTPA	2852.81	38	8.497.167.26 4	1.960.133.20 5	297.833.635	6.591.731.95 4	2.716.497.12 1	2.354.892.33 7	130.225.623	830.633.549
Beta-fibrinogenase-like	sp E5L0E4 VSPB_DABSI	235.49	7	1.296.243.38 4	386.226.775	9.828.822.90 3	1.635.918.72 6	1.323.387.67 2	1.486.652.42 3	1.400.769.58 2	8.977.807.04 3
Zinc metalloproteinase/disintegrin PMMP-1	sp E9NW26 VM2P1_PROMU	1178.99	18	1.097.743.11 5	1.579.545.96 5	1.119.986.35 5	1.068.593.00 9	2.458.510.06 8	365.655.913	2.110.153.67 2	1.675.359.51 9

Zinc metalloproteinase/disintegrin PMMP-2	sp E9NW27 VM2P2_PROMU	1037.74	16	5.103.839.43 8	2.629.324.71 2	2.970.180.56 7	3.360.102.10 4	4.862.074.31 2	3.024.619.38 3	3.641.743.96 7	3.666.019.06 6
Snake venom 5'-nucleotidase	sp F8S0Z7 V5NTD_CROAD	1541.18	20	1.190.545.24 7	7.033.467.47 9	2.525.843.43 7	1.881.056.46 7	1.529.877.95 3	3.061.364.95 5	2.036.008.59 1	6.493.849.69 6
Phospholipase B	sp F8S101 PLB_CROAD	1444.3	21	296.335.979	3.362.211.71 4	1.417.426.62 7	3.964.287.30 7	2.760.344.84 2	1.911.929.98 7	2.480.732.04 8	1.994.832.35 6
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like 4a	sp F8S108 VM34_CROAD	1074.13	20	1.323.819.57 5	1.035.463.13 7	2.580.415.61 8	1.183.584.18 7	1.143.387.77 4	4.054.316.07 8	2.731.655.00 6	4.975.035.43 3
Acidic phospholipase A2 BmooPLA2	sp G3DT18 PA2A_BOTMO	2625.11	26	9.266.798.00 8	1.576.691.47 2	1.830.591.76 9	5.231.341.90 8	1.150.531.48 7	1.149.270.32 7	3.482.795.86 5	6.045.072.10 5
Basic phospholipase A2 homolog 2	sp I6L8L6 MTX2_BOTBZ	3147.7	41	9.459.271.99 8	1.964.118.26 8	2.734.391.38 8	1.769.668.72 3	2.450.430.35 4	1.176.537.05 8	1.435.780.98 7	3.115.683.32 8
Hyaluronidase	sp J3S820 HYAL_CROAD	55.2	1	3.790.665.68 6	618.526.366	2.269.432.66 7	2.931.432.76 3	988.714.268	9.097.039.70 8	257.595.665	260.577.048
Snake venom serine proteinase 11	sp J3S832 VSPB_CROAD	919.23	19	1.508.185.18 8	1.048.146.85 8	2.570.134.05 7	5.354.960.89 1	1.449.856.46 8	7.561.530.02 4	1.490.558.75 5	1.467.128.32 7
Snake venom serine proteinase 2	sp J3S833 VSP2_CROAD	107.2	3	1.626.974.13 2	3.980.945.01 8	9.873.196.93 9	1.582.806.08 6	1.553.432.56 8	133.112.957	1.358.607.27 3	321.794.272
Venom factor	sp J3S836 VCO3_CROAD	151.54	4	1.140.392.46 1	8.384.492.63 3	1.849.248.88 8	3.093.104.14 6	1.561.023.73 8	154.517.237	5.749.894.97 3	8.346.843.54 5
C-type lectin 9a	sp J3SBP0 SL9A_CROAD	82.25	2	1.782.908.96 3	2.224.467.33 8	0	2.930.798.24 3	3.847.374.80 9	8.018.709.19 8	0.248777346 7	3.866.241.40 9
Venom phosphodiesterase 2	sp J3SBP3 PDE2_CROAD	1851.75	30	1.692.491.22 5	1.262.461.41 4	2.611.398.72 7	1.258.029.22 4	4.022.554.48 7	5.771.391.70 7	3.192.701.70 4	190.584.626
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like 2d	sp J3SDW6 VM32D_CROAD	857.36	19	5.407.038.27 6	1.141.999.21 3	3.031.441.80 6	207.752.859	8.308.551.37 7	2.077.480.32 2	3.929.760.32 6	5.145.950.80 7
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like 8	sp J3SDW8 VM38_CROAD	932.7	20	1.302.277.09 4	7.215.889.68 7	7.575.294.81 3	5.877.633.88 4	5.791.668.30 9	1.459.753.89 1	5.449.472.42 6	1.354.492.60 7
Snake venom serine proteinase 14	sp J3SDW9 VSPE_CROAD	730.1	15	4.814.190.27 9	1.416.828.97 6	5.231.285.67 9	1.334.642.23 5	9.134.462.64 7	1.046.749.83 2	3.187.435.75 8	3.372.640.32 8
Snake venom serine proteinase 4a	sp J3SDX0 VSP4_CROAD	1099.87	18	1.834.625.72 9	7.358.754.78 5	1.682.525.32 5	1.975.556.88 2	4.636.183.42 7	5.127.551.20 9	1.625.599.34 9	1.042.652.27 8
L-amino acid oxidase Lm29	sp J7H670 OXLA_LACMT	8818.41	135	1.436.058.59 6	2.830.601.72 2	9.182.652.58 3	1.455.041.41 8	5.521.683.16 4	1.003.703.35 2	2.105.673.02 5	1.058.461.84 4
Thrombin-like enzyme barnettobin (Fragment)	sp K4LLQ2 VSP_BOTBA	334.05	9	8.855.059.66 4	1.033.461.60 4	6.300.881.44 7	1.197.341.54 8	2.948.057.15 1	1.120.300.79 2	5.220.844.78 3	1.325.343.67 1
Snake venom serine protease 2B	sp O13061 VSPB_TRIGA	241.5	7	9.186.975.36 8	1.190.651.74 6	8.190.035.42 4	9.097.813.09 4	4.919.398.24 7	13.892.524	1.147.545.59 3	6.725.954.94 7
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like ACLD	sp O42138 VM3AD_AGKCL	629.34	12	1.334.637.14 5	699.850.458	6.133.976.48 1	7.055.471.93 5	8.656.326.15 3	6.585.834.01 8	1.306.255.44 4	2.254.603.63 5
Acidic phospholipase A2 A'	sp O42192 PA2A8_GLOHA	2027.04	22	2.240.193.23 1	5.004.309.93 6	5.123.043.47 6	5.008.860.91 2	615.976.133	1.026.122.81 7	3.210.916.95 6	2.102.223.95 1
Thrombin-like enzyme CPI-enzyme 2	sp O42207 VSPE2_GLOUS	451.73	10	1.004.304.90 9	5.656.603.57 9	7.111.692.59 2	117.144.847	4.532.867.89 3	6.396.729.40 5	1.359.941.48 4	7.314.785.36 8
Zinc metalloproteinase/disintegrin	sp O73795 VM2MB_GLOBR	1542.41	29	2.670.873.04 9	1.852.329.13 1	2.655.454.51 7	1.942.472.16 4	1.597.604.80 9	2.956.303.40 7	5.006.928.78 5	2.949.883.76 1
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like bothropasin	sp O93523 VM3BP_BOTJA	9545.9	127	2.112.825.88 8	315.747.953	10.021.414	4.850.573.35 8	2.554.508.15 2	1.173.266.69 2	1.470.275.24 6	4.342.326.00 4
L-amino-acid oxidase (Fragment)	sp P0C2D6 OXLA_PROMU	213.94	3	1.823.643.71	1.067.093.16	272.169.772	7.880.440.66 8	6.887.662.22 9	4.175.240.83 5	1.505.043.96	6.987.375.80 8
Snake venom metalloproteinase BnP1 (Fragments)	sp P0C6S0 VM1B1_BOTPA	3048.48	39	5.634.827.41 2	1.543.537.68 7	3.581.572.69 8	4.741.749.08 7	1.725.300.99 2	7.000.645.20 1	8.011.361.77 4	3.108.051.88 4

Snake venom metalloproteinase bothrojaractivase (Fragments)	sp P0C7A9 VM1BJ_BOTJA	2514.65	32	5.406.524.77 2	7.562.504.64 8	1.417.690.68 3	1.131.166.32 4	6.097.369.15 2	1.283.651.24 2	1.662.979.02 1	9.359.252.24 1
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like brevilysin H6	sp P0C7B0 VM3H6_GLOBR	2324.69	35	138.222.227	3.211.852.44 8	6.063.413.81 4	4.414.905.39 6	4.162.581.05 4	1.025.700.75 2	100.485.299	3.921.066.95 2
Bradykinin-potentiating peptide 11	sp P0C7S5 BPP11_BOTNU	28.79	1	2.183.204.92 5	3.293.780.39 3	3.170.469.12 9	1.252.638.87 7	121.044.226	2.069.588.28 9	7.800.969.26 2	2.075.230.14 6
Disintegrin mojastin-2	sp P0C7X7 VM212_CROSS	223.76	5	1.570.995.09 7	1.117.994.20 8	0	1.481.675.06 6	0	2.881.741.86 7	1.179.620.08 7	1.285.053.72 6
Snaclec bothroinsularin subunit alpha	sp P0C929 SLA_BOTIN	451.89	6	1.670.888.78 6	6.870.240.73 4	1.180.556.07 6	1.165.829.79 1	4.111.457.44 7	1.238.279.95 6	3.410.053.47 6	7.646.016.78 1
Snaclec bothroinsularin subunit beta	sp P0C930 SLB_BOTIN	397.91	6	7.762.209.81 3	2.587.926.04 8	1.093.556.92 2	6.517.542.29 6	4.206.669.49 8	754.440.834	4.191.886.56 8	1.151.760.67 3
Serotriflin OS=Protobothrops flavoviridis	sp P0CB15 CRIS_PROFL	73.77	1	1.252.811.41 9	1.455.814.65 7	1.194.524.03 5	3.325.285.03 3	3.834.227.49 9	1.161.248.72 6	2.415.125.00 1	6.944.122.95 3
Thrombin-like enzyme bhalternin	sp P0CG03 VSPBH_BOTAL	1338.08	20	2.058.413.28 1	2.265.371.85 7	2.638.848.44 4	3.186.724.66 9	3.769.038.68 3	2.730.547.04 5	1.625.489.19 8	336.028.593
Alpha-fibrinogenase albofibrase	sp P0CJ41 VSPAF_TRIAB	635.07	13	1.765.173.76 2	6.038.766.55 8	7.721.675.63 9	1.142.227.20 8	5.029.971.53 1	2.496.355.41 9	4.636.776.86 5	4.732.896.37 4
L-amino-acid oxidase	sp P0DI84 OXLA_VIPAA	5580.62	95	2.400.678.04 4	2.309.872.88 5	1.581.979.58 8	1.219.225.42 1	2.452.574.17 2	5.807.582.70 4	3.161.411.61 3	2.228.965.51 6
Thrombin-like enzyme TLBan (Fragments)	sp P0DJG3 VSP1_BOTAN	741.26	14	2.974.860.20 7	9.510.552.35 4	3.644.050.90 5	1.729.821.62 9	796.303.324	8.110.534.39 5	2.560.679.47 9	2.911.517.44 5
C-type lectin BPL	sp P0DL30 LECG_BOTPI	1416.58	21	2.234.090.76 5	2.053.214.13 4	796.736.259	4.195.427.52 3	1.666.530.72 7	2.490.735.38 8	2.286.912.23 8	1.629.251.89 6
L-amino acid oxidase (Fragments)	sp P0DQH9 OXLAB_CERCE	1596.84	31	5.640.289.48 2	8.744.393.96 6	9.521.946.53 6	1.954.679.17 5	1.954.388.17 5	9.116.597.65 9	3.614.309.87 5	7.871.508.17 4
Acidic phospholipase A2 DE-I	sp P00625 PA2A1_OVOOK	929.87	14	2.369.556.03 5	4.768.936.66 3	6.930.474.33 4	1.139.750.82 1	2.224.215.71 7	1.611.350.44 4	34.935.202	1.330.471.35 6
Thrombin-like enzyme batroxobin	sp P04971 VSPF_BOTAT	969.14	16	1.586.432.54 2	1.013.252.32 9	9.745.390.56 6	3.368.457.63 7	1.456.574.31 8	1.087.723.05 8	9.408.116.22 6	7.157.537.99 1
Factor V activator RVV-V alpha	sp P18964 VSPA_DABSI	406.88	10	8.915.875.43 9	4.826.344.47 1	4.044.902.20 7	1.569.929.74 5	1.696.432.84 2	2.956.661.75 4	5.034.329.56 9	372.190.495
C-type lectin Cal	sp P21963 LECG_CROAT	1283.15	21	6.784.552.12 4	1.279.169.81 7	105.957.617	820.267.441	6.708.176.29 2	7.455.632.89 8	6.743.242.04 7	2.673.363.43 7
Snaclec botrocetin subunit alpha	sp P22029 SLEA_BOTJA	1154.99	16	4.710.279.66 5	3.441.924.90 9	5.437.428.07 3	1.784.476.95 2	1.492.821.95 9	471.905.141	1.685.299.20 3	1.432.086.57 6
Snaclec botrocetin subunit beta	sp P22030 SLEB_BOTJA	1978.87	25	1.399.349.06 7	138.956.187	5.397.914.05 4	3.710.601.34 8	2.873.966.39 2	7.391.408.61 4	1.362.823.96 1	1.003.447.22 1
Snake venom metalloproteinase hemorrhagic factor 2	sp P22796 VM1H2_LACMU	1399.28	21	476.536.447	1.141.980.70 6	745.151.188	6.456.699.40 2	1.521.465.40 7	150.376.296	8.011.989.41 2	2.129.587.47 9
Snaclec coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit A	sp P23806 SL9A_PROFL	55.99	1	3.725.591.91 9	1.247.020.18 2	3.187.385.56 9	4.156.111.36 1	101.269.777	3.159.508.90 3	3.846.131.49 7	2.217.773.65 8
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like jararhagin (Fragment)	sp P30431 VM3JA_BOTJA	7429.69	91	6.808.798.20 2	1.756.136.54 9	2.633.904.19 6	5.532.844.00 6	2.072.577.71 2	4.828.671.97 6	4.545.639.29 7	1.194.221.84 3
Disintegrin cerastin	sp P31982 VM2I_CROCC	122.51	3	0	2.271.910.05 6	1.138.318.79 3	1.053.660.51 3	9.668.310.14 6	3.811.969.96 4	0	0
Disintegrin molossin	sp P31984 VM2I_CROMM	134.17	3	7.413.460.81 5	0	0	0	1.544.402.78 9	0	0	4.355.406.11 2
Zinc metalloproteinase/disintegrin (Fragment)	sp P31989 VM2JC_BOTJA	1858.82	25	7.726.123.65 1	135.095.305	5.967.937.98 1	6.928.081.59 1	960.368.407	1.673.341.99 6	9.098.760.62 2	8.175.849.91 6
Zinc metalloproteinase/disintegrin	sp P34182 VM2AE_CROAT	692.43	13	7.091.222.26 5	4.469.881.03 9	9.397.943.40 5	1.031.909.48 3	2.663.814.80 4	1.689.755.50 9	2.621.515.87 1	2.282.350.53 7

Cysteine-rich venom protein (Fragment)	sp P60623 CRVP_TRIST	873.76	16	469.926.225	3.346.743.96 8	1.508.931.64 1	4.041.924.79 6	7.188.210.89 7	2.898.023.76 6	1.078.633.92 9	5.834.685.83 6
Basic phospholipase A2 homolog Bsc-K49	sp P80963 PA2H_BOTSC	95.38	1	3.255.408.99 2	0	1.804.391.74 4	1.586.133.43 2	0	0	2.404.804.48 9	2.121.242.04 9
Snaclec alboaggregin-A subunit beta'	sp P81114 SLA4_TRIAB	143.33	3	8.732.456.10 8	4.192.732.68 7	3.871.751.28 6	5.843.535.06 2	2.893.015.85 2	2.245.772.64 4	1.073.844.29 2	1.233.852.96 6
L-amino-acid oxidase	sp P81382 OXLA_CALRH	5460.65	91	4.889.390.22 1	2.966.389.20 5	5.561.502.78 9	4.726.580.28 2	7.226.798.59 7	1.804.555.40 7	4.211.402.33 5	1.968.393.54 2
Acidic phospholipase A2 2	sp P81478 PA2A2_TRIGA	493.66	7	1.071.895.54 6	4.242.468.74 1	1.529.742.22 1	2.297.887.71 7	1.699.707.90 3	2.177.829.25 6	1.776.459.27 4	1.773.696.23 5
Acidic phospholipase A2 4	sp P81479 PA2A4_TRIGA	1739.37	22	954.696.432	1.602.169.52 9	3.441.427.78 7	3.936.799.23 1	2.116.191.82 3	2.056.240.06 6	1.877.172.78 5	9.832.350.91 9
Platelet-aggregating proteinase PA- BJ (Fragment)	sp P81824 VSP1_BOTJA	1865.69	35	2.622.141.81 7	9.708.433.83 9	2.748.891.82 2	5.565.074.90 8	5.884.442.21 8	5.445.125.95 1	3.083.367.68 5	2.671.103.14 6
Basic phospholipase A2 homolog 1	sp P82114 PA2H1_BOTMO	2292.76	31	3.987.540.74 9	1.277.534.57 9	8.664.719.71 8	3.259.115.51 7	4.664.325.78 8	7.363.674.91 8	4.336.957.57 1	9.204.571.10 7
Basic phospholipase A2 homolog	sp P82950 PA2HB_ATRNM	615.38	11	436.325.755	6.815.263.43 9	2.377.279.07 2	2.614.554.98 7	1.188.735.70 9	4.886.334.68 7	1.115.365.51 1	2.333.607.18 7
Thrombin-like enzyme contortrixobin	sp P82981 VSP2_AGKCO	268.29	7	1.704.352.56 7	8.427.853.89 5	1.065.764.12 4	1.246.411.81 5	3.902.558.15 3	4.806.702.56 3	1.357.443.76 2	9.632.613.45 8
Snake venom metalloproteinase BaP1	sp P83512 VM1B1_BOTAS	2185.42	34	2.108.491.23 6	3.474.875.87 4	8.984.199.37 9	2.422.762.28 9	4.447.416.18 8	9.740.521.06 6	3.724.807.28 8	2.454.951.94 4
C-type lectin BJcuL	sp P83519 LECG_BOTJR	3848.26	50	2.581.974.24 2	4.787.255.24 8	6.757.452.59 9	1.037.210.76 2	408.545.296	2.366.958.10 1	4.674.894.48 2	1.361.447.70 3
Vascular endothelial growth factor A	sp P83906 VEGFA_BITGA	41.63	1	1.441.247.87 2	3.233.915.92 6	8.488.766.46 2	15.929.527	9.773.831.96 9	6.574.351.58 5	6.851.172.51 1	3.763.427.03 4
Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdonitin	sp P83912 VM2JT_PROJR	1001.84	18	3.343.090.62 1	119.221.669	2.591.934.61 1	4.333.699.11 3	1.793.474.16 2	129.414.791	5.141.342.96 8	1.420.808.32 6
Snake venom metalloproteinase basparin-A (Fragments)	sp P84035 VM3BA_BOTAS	181.3	4	178.970.703	2.497.576.97 7	1.240.448.92 2	1.732.678.70 8	1.097.007.52 1	1.027.255.81 9	974.635.919	1.350.457.32 6
Acidic phospholipase A2 2 (Fragments)	sp P84397 PA2A2_BOTIN	412.2	7	2.646.659.41 4	2.748.793.25 6	9.765.644.80 7	5.830.650.37 6	2.239.715.85 2	1.616.505.99 8	5.025.809.36 1	3.129.651.47 1
Basic phospholipase A2 VRV-PL-V	sp P84674 PA2B5_DABRR	33.97	1	1.297.831.04 4	0	0	7.402.766.89 3	1.603.020.75 9	1.342.080.25 6	0	0
Snake venom metalloproteinase leucurolysin-A	sp P84907 VM1LA_BOTLC	4825.73	67	1.230.414.77 3	5.810.876.71 3	2.826.096.05 1	7.595.856.97 2	2.299.371.91 5	8.632.830.19 1	4.007.668.67 2	2.067.533.07 5
Snake venom metalloproteinase BmooMPalpha-I	sp P85314 VM1BI_BOTMO	884.31	16	243.337.184	4.710.609.00 3	6.144.793.47 2	4.952.184.12 9	1.200.807.96 8	2.987.304.22 7	177.882.823	2.888.386.60 4
Snake venom metalloproteinase atroxlysin-1	sp P85420 VM11_BOTAT	3565.53	50	2.457.438.10 7	2.174.745.90 5	359.435.173	5.059.251.53 7	4.310.764.17 6	6.855.263.32 3	1.179.811.43 8	1.218.302.26 2
Zinc metalloproteinase leucurolysin- B (Fragment)	sp P86092 VM3LB_BOTLC	1546.45	21	3.589.224.87 8	3.081.585.29 3	3.222.974.09 8	7.414.679.99 2	2.005.653.38 7	2.174.976.73 3	4.449.408.05 1	5.535.742.98 2
Acidic phospholipase A2 2	sp P86389 PA2A2_BOTAS	1457.85	18	1.465.618.90 8	142.176.612	1.587.013.43 1	1.827.246.19 2	4.299.228.70 1	6.309.990.98 1	1.355.681.71 7	169.854.129
Acidic phospholipase A2 SpII RP4	sp P86456 PA2A4_BOTAL	738.83	9	4.278.608.01 7	6.565.519.22 2	1.382.963.55 4	1.140.649.59 9	7.008.549.43 9	2.250.108.86 7	8.999.340.08 7	4.666.640.27 4
C-type lectin BpLec	sp P86970 LECG_BOTPA	5034.59	67	4.241.759.18 7	2.581.383.77 3	1.170.858.92 9	2.162.485.87 4	1.235.404.23 6	3.136.789.45 2	7.116.596.77 9	1.009.233.70 8
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like bothrojarin-4 (Fragment)	sp Q0NZX7 VM3B4_BOTJA	444.94	5	5.701.745.88 2	9.308.856.67	1.430.810.49 6	1.371.077.21 7	2.821.186.56 7	277.702.985	1.366.331.56 7	6.620.929.34 2
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like bothrojarin-3 (Fragment)	sp Q0NZX8 VM3B3_BOTJA	426.63	5	1.506.863.06 7	1.472.974.87 8	1.427.607.05 9	1.143.777.01 7	1.099.491.12	2.075.197.71 2	1.116.881.87 1	4.244.209.94 4

Zinc metalloproteinase-disintegrin- like bothrojarin-2 (Fragment)	sp Q0NZX9 VM3B2_BOTJA	2328.38	31	2.596.587.43 9	298.317.481	3.162.135.67 7	7.770.190.18 6	5.788.295.46 1	3.496.825.48 9	5.775.507.14 5	2.772.058.94 4
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like bothrojarin-1 (Fragment)	sp Q0NZY0 VM3B1_BOTJA	686.17	10	819.086.179	5.339.064.83 7	7.320.859.52 3	2.760.621.92 7	1.587.703.46 8	5.272.066.43 3	2.269.095.17 8	1.398.791.33 4
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like BjussuMP-1 (Fragment)	sp Q1PHZ4 VM3B1_BOTJR	3500.4	35	6.726.524.17 5	1.462.062.31 6	5.246.914.13 9	1.366.688.79 5	4.955.010.37 5	2.452.660.14 2	8.038.355.65 9	1.294.589.73 5
Acidic phospholipase A2 BE-I-PLA2	sp Q2HZ28 PA2A_BOTER	513.71	42	1.095.082.65 8	4.310.211.37 4	3.616.993.07 2	4.586.159.33 6	1.061.162.73 6	2.649.446.21 3	2.095.579.53 6	102.733.849
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like stejnihagin-B	sp Q3HTN2 VM3SB_TRIST	47.88	10	2.017.136.09 1	7.473.576.71 4	8.104.176.29 8	7.428.636.59 4	6.487.767.03 6	182.119.671	1.097.959.82 3	1.338.296.91 5
Disintegrin isoform D-2	sp Q4JCS1 VM2D2_BITAR	58.61	1	0	0	0	1.358.618.47 9	0	8.769.858.22 7	0	7.353.953.81 3
Snaclec 7	sp Q4PRC6 SL7_DABSI	33.09	1	4.014.031.43 6	0	1.115.561.87 2	1.148.338.90 2	0	0	1.974.760.05 6	4.375.506.08 4
Snaclec 5	sp Q4PRC8 SL5_DABSI	251.87	1	2.298.356.00 5	0.022861002 94	1.207.144.70 6	1.851.182.36 1	0	0	1.879.241.09 2	1.391.173.40 1
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like VLAIP-A	sp Q4VM08 VM3VA_MACLB	2247.14	5	124.217.851	5.181.017.93 8	5.189.519.57 1	3.775.661.15 2	1.358.110.19 7	0	135.344.106	7.811.778.88 5
Snake venom serine protease HS114	sp Q5W959 VSP14_BOTJA	1205.23	34	2.021.791.81 7	1.501.452.40 4	209.716.057	2.622.712.04 4	1.461.945.29 4	1.048.381.29 2	2.593.449.56 9	1.936.261.03 6
Snake venom serine protease HS112	sp Q5W960 VSP12_BOTJA	9466.64	20	2.274.679.51 8	1.011.093.41 6	7.141.982.42 8	2.146.675.72 4	2.365.935.95 4	7.124.892.90 5	4.503.738.58 1	6.667.472.71 4
Zinc metalloproteinase/disintegrin	sp Q5XUW8 VM2IA_BOTIN	676.78	121	5.568.180.63 5	1.125.426.69 8	4.631.729.41 9	9.609.850.66 1	1.572.015.95 1	2.335.715.48 8	6.832.755.14 7	8.417.598.11 6
Snake venom serine protease BthaTL	sp Q6IWF1 VSPTL_BOTAL	2223.41	12	2.009.027.79 7	3.083.177.48 2	8.832.795.14 8	197.088.629	6.939.017.60 1	5.233.575.04 7	5.770.669.55 4	780.146.173
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin	sp Q6J936 TXVE_BOTER	29.48	27	8.459.170.11 1	3.846.322.65 4	2.383.923.60 3	7.286.831.08 5	2.766.938.62 2	2.028.478.09 2	1.108.791.04 4	1.001.467.26 1
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi	sp Q6J936 TXVE_BOTER sp Q6X5S2 SL4_ECHPL	29.48 140.44	27 1	8.459.170.11 1 0	3.846.322.65 4 6.275.126.72 1	2.383.923.60 3 0	7.286.831.08 5 0	2.766.938.62 2 1.957.239.96 7	2.028.478.09 2 1.072.508.68 1	1.108.791.04 4 0	1.001.467.26 1 6.374.935.41 8
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A	sp Q6J936 TXVE_BOTER sp Q6X5S2 SL4_ECHPL sp Q7LZ71 SLA_PROFL	29.48 140.44 189.83	27 1 3	8.459.170.11 1 0 2.211.970.47 4	3.846.322.65 4 6.275.126.72 1 112.512.896	2.383.923.60 3 0 5.098.408.10 4	7.286.831.08 5 0 5.517.633.19 4	2.766.938.62 2 1.957.239.96 7 0	2.028.478.09 2 1.072.508.68 1 2.634.442.91 6	1.108.791.04 4 0 4.774.828.35 4	1.001.467.26 1 6.374.935.41 8 2.159.837.23 1
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment)	sp Q6J936 TXVE_BOTER sp Q6X5S2 SL4_ECHPL sp Q7LZ71 SLA_PROFL sp Q7LZI6 SLB_PROTO	29.48 140.44 189.83 33.91	27 1 3 3	8.459.170.11 1 0 2.211.970.47 4 5.330.406.61 8	3.846.322.65 4 6.275.126.72 1 112.512.896 1.505.586.63 1	2.383.923.60 3 0 5.098.408.10 4 2.644.928.66 3	7.286.831.08 5 0 5.517.633.19 4 5.148.588.12 2	2.766.938.62 2 1.957.239.96 7 0 2.000.383.33 1	2.028.478.09 2 1.072.508.68 1 2.634.442.91 6 1.282.416.69 1	$ \begin{array}{r} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ \end{array} $	$ \begin{array}{r} 1.001.467.26\\1\\6.374.935.41\\8\\2.159.837.23\\1\\4.310.442.06\\7\end{array} $
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment) Snaclec bitiscetin subunit alpha	sp Q6J936 TXVE_BOTER sp Q6X5S2 SL4_ECHPL sp Q7LZ71 SLA_PROFL sp Q7LZI6 SLB_PROTO sp Q7LZK5 SLA_BITAR	29.48 140.44 189.83 33.91 202.43	27 1 3 3 1	$\begin{array}{c} 8.459.170.11\\ 1\\ 0\\ 2.211.970.47\\ 4\\ 5.330.406.61\\ 8\\ 7.515.574.79\\ 5\end{array}$	3.846.322.65 4 6.275.126.72 1 112.512.896 1.505.586.63 1 9.483.065.14 7	$2.383.923.60 \\ 3 \\ 0 \\ 5.098.408.10 \\ 4 \\ 2.644.928.66 \\ 3 \\ 7.978.467.85 \\ 7 \\ 7 \\$	7.286.831.08 5 0 5.517.633.19 4 5.148.588.12 2 178.109.884	2.766.938.62 2 1.957.239.96 7 0 2.000.383.33 1 8.979.195.64 3	2.028.478.09 2 1.072.508.68 1 2.634.442.91 6 1.282.416.69 1 2.501.463.13 3 3	$ \begin{array}{r} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ 2.015.345.75\\ 3\end{array} $	$\begin{array}{c} 1.001.467.26\\ 1\\ 6.374.935.41\\ 8\\ 2.159.837.23\\ 1\\ 4.310.442.06\\ 7\\ 1.179.535.81\\ 9\end{array}$
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment) Snaclec bitiscetin subunit alpha Snake venom metalloproteinase Ac1	sp Q6J936 TXVE_BOTERsp Q6X5S2 SL4_ECHPLsp Q7LZ71 SLA_PROFLsp Q7LZI6 SLB_PROTOsp Q7LZK5 SLA_BITARsp Q7LZS9 VM1A_DEIAC	29.48 140.44 189.83 33.91 202.43 679.3	27 1 3 3 1 3	$\begin{array}{c} 8.459.170.11\\ 1\\ 0\\ 2.211.970.47\\ 4\\ 5.330.406.61\\ 8\\ 7.515.574.79\\ 5\\ 2.337.522.20\\ 8\end{array}$	$\begin{array}{c} 3.846.322.65\\ 4\\ 6.275.126.72\\ 1\\ 112.512.896\\ 1.505.586.63\\ 1\\ 9.483.065.14\\ 7\\ 5.685.211.33\\ 6\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.383.923.60\\ 3\\ 0\\ 5.098.408.10\\ 4\\ 2.644.928.66\\ 3\\ 7.978.467.85\\ 7\\ 1.858.839.43\\ 3\\ \end{array}$	7.286.831.08 5 0 5.517.633.19 4 5.148.588.12 2 178.109.884 1.721.011.64 9	2.766.938.62 2 $1.957.239.96$ 7 0 $2.000.383.33$ 1 $8.979.195.64$ 3 $7.177.826.47$ 3	$\begin{array}{c} 2.028.478.09\\ 2\\ 1.072.508.68\\ 1\\ 2.634.442.91\\ 6\\ 1.282.416.69\\ 1\\ 2.501.463.13\\ 3\\ 1.112.829.56\\ 6\end{array}$	$ \begin{array}{r} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ 2.015.345.75\\ 3\\ 193.683.524\\ \end{array} $	$\begin{array}{c} 1.001.467.26\\ 1\\ 6.374.935.41\\ 8\\ 2.159.837.23\\ 1\\ 4.310.442.06\\ 7\\ 1.179.535.81\\ 9\\ 1.915.517.09\\ 2\end{array}$
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment) Snaclec bitiscetin subunit alpha Snake venom metalloproteinase Ac1 Zinc metalloproteinase/disintegrin	sp Q6J936 TXVE_BOTERsp Q6X5S2 SL4_ECHPLsp Q7LZ71 SLA_PROFLsp Q7LZI6 SLB_PROTOsp Q7LZK5 SLA_BITARsp Q7LZS9 VM1A_DEIACsp Q7SZE0 VM2SA_GLOSA	29.48 140.44 189.83 33.91 202.43 679.3 2463.32	27 1 3 3 1 3 1 3 14	$\begin{array}{c} 8.459.170.11\\ 1\\ 0\\ 2.211.970.47\\ 4\\ 5.330.406.61\\ 8\\ 7.515.574.79\\ 5\\ 2.337.522.20\\ 8\\ 544.357.463\end{array}$	$\begin{array}{c} 3.846.322.65\\ 4\\ 6.275.126.72\\ 1\\ 112.512.896\\ 1.505.586.63\\ 1\\ 9.483.065.14\\ 7\\ 5.685.211.33\\ 6\\ 2.175.162.61\\ 9\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.383.923.60\\ 3\\ 0\\ 5.098.408.10\\ 4\\ 2.644.928.66\\ 3\\ 7.978.467.85\\ 7\\ 1.858.839.43\\ 3\\ 8.317.023.27\\ 4\end{array}$	7.286.831.08 5 0 5.517.633.19 4 5.148.588.12 2 178.109.884 1.721.011.64 9 1.093.192.77 5	2.766.938.62 2 $1.957.239.96$ 7 0 $2.000.383.33$ 1 $8.979.195.64$ 3 $7.177.826.47$ 3 $1.660.226.60$ 9	$\begin{array}{c} 2.028.478.09\\ 2\\ 1.072.508.68\\ 1\\ 2.634.442.91\\ 6\\ 1.282.416.69\\ 1\\ 2.501.463.13\\ 3\\ 1.112.829.56\\ 6\\ 4.978.817.53\\ 2\end{array}$	$\begin{array}{c} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ 2.015.345.75\\ 3\\ 193.683.524\\ 6.159.213.53\\ 7\end{array}$	$\begin{array}{c} 1.001.467.26\\ 1\\ 6.374.935.41\\ 8\\ 2.159.837.23\\ 1\\ 4.310.442.06\\ 7\\ 1.179.535.81\\ 9\\ 1.915.517.09\\ 2\\ 3.875.248.13\\ 5\end{array}$
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment) Snaclec bitiscetin subunit alpha Snake venom metalloproteinase Ac1 Zinc metalloproteinase/disintegrin Snake venom serine protease homolog	sp Q6J936 TXVE_BOTERsp Q6X5S2 SL4_ECHPLsp Q7LZ71 SLA_PROFLsp Q7LZ16 SLB_PROTOsp Q7LZK5 SLA_BITARsp Q7LZS9 VM1A_DEIACsp Q7SZE0 VM2SA_GLOSAsp Q7T229 VSPH_BOTJR	29.48 140.44 189.83 33.91 202.43 679.3 2463.32 28.91	27 1 3 3 1 3 14 40	$\begin{array}{c} 8.459.170.11\\ 1\\ 0\\ 2.211.970.47\\ 4\\ 5.330.406.61\\ 8\\ 7.515.574.79\\ 5\\ 2.337.522.20\\ 8\\ 544.357.463\\ 6.594.640.21\\ 3\end{array}$	$\begin{array}{c} 3.846.322.65\\ 4\\ 6.275.126.72\\ 1\\ 112.512.896\\ 1.505.586.63\\ 1\\ 9.483.065.14\\ 7\\ 5.685.211.33\\ 6\\ 2.175.162.61\\ 9\\ 8.827.268.69\\ 7\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.383.923.60\\ 3\\ 0\\ 5.098.408.10\\ 4\\ 2.644.928.66\\ 3\\ 7.978.467.85\\ 7\\ 1.858.839.43\\ 3\\ 8.317.023.27\\ 4\\ 8.946.497.75\\ 9\end{array}$	7.286.831.08 5 0 5.517.633.19 4 5.148.588.12 2 178.109.884 1.721.011.64 9 1.093.192.77 5 733.783.952	$\begin{array}{c} 2.766.938.62\\ 2\\ 1.957.239.96\\ 7\\ 0\\ 2.000.383.33\\ 1\\ 8.979.195.64\\ 3\\ 7.177.826.47\\ 3\\ 1.660.226.60\\ 9\\ 4.086.139.19\\ 6\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.028.478.09\\ 2\\ 1.072.508.68\\ 1\\ 2.634.442.91\\ 6\\ 1.282.416.69\\ 1\\ 2.501.463.13\\ 3\\ 1.112.829.56\\ 6\\ 4.978.817.53\\ 2\\ 495.460.483 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ 2.015.345.75\\ 3\\ 193.683.524\\ 6.159.213.53\\ 7\\ 7.360.996.61\\ 4\end{array}$	$\begin{array}{c} 1.001.467.26\\ 1\\ 6.374.935.41\\ 8\\ 2.159.837.23\\ 1\\ 4.310.442.06\\ 7\\ 1.179.535.81\\ 9\\ 1.915.517.09\\ 2\\ 3.875.248.13\\ 5\\ 3.016.384.01\\ 8\end{array}$
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment) Snaclec bitiscetin subunit alpha Snake venom metalloproteinase Ac1 Zinc metalloproteinase/disintegrin Snake venom serine protease homolog Snaclec echicetin subunit beta	sp Q6J936 TXVE_BOTERsp Q6X5S2 SL4_ECHPLsp Q7LZ71 SLA_PROFLsp Q7LZI6 SLB_PROTOsp Q7LZK5 SLA_BITARsp Q7LZS9 VM1A_DEIACsp Q7SZE0 VM2SA_GLOSAsp Q7T229 VSPH_BOTJRsp Q7T247 SLB_ECHCA	29.48 140.44 189.83 33.91 202.43 679.3 2463.32 28.91 1708.15	27 1 3 3 1 3 14 40 1	$\begin{array}{c} 8.459.170.11\\ 1\\ 0\\ 2.211.970.47\\ 4\\ 5.330.406.61\\ 8\\ 7.515.574.79\\ 5\\ 2.337.522.20\\ 8\\ 544.357.463\\ 6.594.640.21\\ 3\\ 2.442.739.50\\ 1\end{array}$	$\begin{array}{c} 3.846.322.65\\ 4\\ 6.275.126.72\\ 1\\ 112.512.896\\ 1.505.586.63\\ 1\\ 9.483.065.14\\ 7\\ 5.685.211.33\\ 6\\ 2.175.162.61\\ 9\\ 8.827.268.69\\ 7\\ 0\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.383.923.60\\ 3\\ 0\\ 5.098.408.10\\ 4\\ 2.644.928.66\\ 3\\ 7.978.467.85\\ 7\\ 1.858.839.43\\ 3\\ 8.317.023.27\\ 4\\ 8.946.497.75\\ 9\\ 5.729.655.23\\ 6\end{array}$	7.286.831.08 5 0 5.517.633.19 4 5.148.588.12 2 178.109.884 1.721.011.64 9 1.093.192.77 5 733.783.952 3.382.738.65 4	$\begin{array}{c} 2.766.938.62\\ 2\\ 1.957.239.96\\ 7\\ 0\\ 2.000.383.33\\ 1\\ 8.979.195.64\\ 3\\ 7.177.826.47\\ 3\\ 1.660.226.60\\ 9\\ 4.086.139.19\\ 6\\ 0\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.028.478.09\\ 2\\ 1.072.508.68\\ 1\\ 2.634.442.91\\ 6\\ 1.282.416.69\\ 1\\ 2.501.463.13\\ 3\\ 1.112.829.56\\ 6\\ 4.978.817.53\\ 2\\ 495.460.483\\ 0\end{array}$	$\begin{array}{c} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ 2.015.345.75\\ 3\\ 193.683.524\\ 6.159.213.53\\ 7\\ 7.360.996.61\\ 4\\ 1.146.669.35\\ 5\end{array}$	$\begin{array}{c} 1.001.467.26\\ 1\\ 6.374.935.41\\ 8\\ 2.159.837.23\\ 1\\ 4.310.442.06\\ 7\\ 1.179.535.81\\ 9\\ 1.915.517.09\\ 2\\ 3.875.248.13\\ 5\\ 3.016.384.01\\ 8\\ 2.032.557.78\\ 4\end{array}$
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment) Snaclec bitiscetin subunit alpha Snake venom metalloproteinase Ac1 Zinc metalloproteinase/disintegrin Snake venom serine protease homolog Snaclec echicetin subunit beta Cysteine-rich venom protein piscivorin	sp Q6J936 TXVE_BOTER sp Q6X5S2 SL4_ECHPL sp Q7LZ71 SLA_PROFL sp Q7LZI6 SLB_PROTO sp Q7LZK5 SLA_BITAR sp Q7LZS9 VM1A_DEIAC sp Q7SZE0 VM2SA_GLOSA sp Q7T247 SLB_ECHCA sp Q7ZTA0 CRVP_AGKPI	29.48 140.44 189.83 33.91 202.43 679.3 2463.32 28.91 1708.15 1213.22	27 1 3 1 3 1 4 40 1 26	$\begin{array}{c} 8.459.170.11\\ 1\\ 0\\ 2.211.970.47\\ 4\\ 5.330.406.61\\ 8\\ 7.515.574.79\\ 5\\ 2.337.522.20\\ 8\\ 544.357.463\\ 6.594.640.21\\ 3\\ 2.442.739.50\\ 1\\ 445.530.661\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.846.322.65\\ 4\\ 6.275.126.72\\ 1\\ 112.512.896\\ 1.505.586.63\\ 1\\ 9.483.065.14\\ 7\\ 5.685.211.33\\ 6\\ 2.175.162.61\\ 9\\ 8.827.268.69\\ 7\\ 0\\ 4.638.873.32\\ 5\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.383.923.60\\ 3\\ 0\\ 5.098.408.10\\ 4\\ 2.644.928.66\\ 3\\ 7.978.467.85\\ 7\\ 1.858.839.43\\ 3\\ 8.317.023.27\\ 4\\ 8.946.497.75\\ 9\\ 5.729.655.23\\ 6\\ 5.210.193.92\\ 8\end{array}$	$\begin{array}{c} 7.286.831.08\\ 5\\ 0\\ 5.517.633.19\\ 4\\ 5.148.588.12\\ 2\\ 178.109.884\\ 1.721.011.64\\ 9\\ 1.093.192.77\\ 5\\ 733.783.952\\ 3.382.738.65\\ 4\\ 4.134.740.44\\ 1\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.766.938.62\\ 2\\ 1.957.239.96\\ 7\\ 0\\ 2.000.383.33\\ 1\\ 8.979.195.64\\ 3\\ 7.177.826.47\\ 3\\ 1.660.226.60\\ 9\\ 4.086.139.19\\ 6\\ 0\\ 21.774.044 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.028.478.09\\ 2\\ 1.072.508.68\\ 1\\ 2.634.442.91\\ 6\\ 1.282.416.69\\ 1\\ 2.501.463.13\\ 3\\ 1.112.829.56\\ 6\\ 4.978.817.53\\ 2\\ 495.460.483\\ 0\\ 381.632.256\end{array}$	$\begin{array}{c} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ \\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ 2.015.345.75\\ 3\\ 193.683.524\\ 6.159.213.53\\ 7\\ 7.360.996.61\\ 4\\ 1.146.669.35\\ 5\\ 9.778.583.34\\ 6\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.001.467.26\\ 1\\ 6.374.935.41\\ 8\\ 2.159.837.23\\ 1\\ 4.310.442.06\\ 7\\ 1.179.535.81\\ 9\\ 1.915.517.09\\ 2\\ 3.875.248.13\\ 5\\ 3.016.384.01\\ 8\\ 2.032.557.78\\ 4\\ 6.865.352.28\\ 3\\ \end{array}$
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment) Snaclec bitiscetin subunit alpha Snake venom metalloproteinase Ac1 Zinc metalloproteinase/disintegrin Snake venom serine protease homolog Snaclec echicetin subunit beta Cysteine-rich venom protein piscivorin Cysteine-rich venom protein	sp Q6J936 TXVE_BOTER sp Q6X5S2 SL4_ECHPL sp Q7LZ71 SLA_PROFL sp Q7LZ16 SLB_PROTO sp Q7LZK5 SLA_BITAR sp Q7LZS9 VM1A_DEIAC sp Q7SZE0 VM2SA_GLOSA sp Q7T229 VSPH_BOTJR sp Q7T247 SLB_ECHCA sp Q7ZTA0 CRVP_AGKPI	29.48 140.44 189.83 33.91 202.43 679.3 2463.32 28.91 1708.15 1213.22 786.35	27 1 3 3 1 3 14 40 1 26 21	$\begin{array}{c} 8.459.170.11\\ 1\\ 0\\ 2.211.970.47\\ 4\\ 5.330.406.61\\ 8\\ 7.515.574.79\\ 5\\ 2.337.522.20\\ 8\\ 544.357.463\\ 6.594.640.21\\ 3\\ 2.442.739.50\\ 1\\ 445.530.661\\ 3.820.539.59\\ 1\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.846.322.65\\ 4\\ 6.275.126.72\\ 1\\ 112.512.896\\ 1.505.586.63\\ 1\\ 9.483.065.14\\ 7\\ 5.685.211.33\\ 6\\ 2.175.162.61\\ 9\\ 8.827.268.69\\ 7\\ 0\\ 4.638.873.32\\ 5\\ 368.430.641\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.383.923.60\\ 3\\ 0\\ 5.098.408.10\\ 4\\ 2.644.928.66\\ 3\\ 7.978.467.85\\ 7\\ 1.858.839.43\\ 3\\ 8.317.023.27\\ 4\\ 8.946.497.75\\ 9\\ 5.729.655.23\\ 6\\ 5.210.193.92\\ 8\\ 3.956.785.96\\ 3\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 7.286.831.08\\ 5\\ 0\\ 5.517.633.19\\ 4\\ 5.148.588.12\\ 2\\ 178.109.884\\ 1.721.011.64\\ 9\\ 1.093.192.77\\ 5\\ 733.783.952\\ 3.382.738.65\\ 4\\ 4.134.740.44\\ 1\\ 2.660.783.36\\ 7\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.766.938.62\\ 2\\ 1.957.239.96\\ 7\\ 0\\ 2.000.383.33\\ 1\\ 8.979.195.64\\ 3\\ 7.177.826.47\\ 3\\ 1.660.226.60\\ 9\\ 4.086.139.19\\ 6\\ 0\\ 21.774.044\\ 1.033.314.53\\ 5\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.028.478.09\\ 2\\ 1.072.508.68\\ 1\\ 2.634.442.91\\ 6\\ 1.282.416.69\\ 1\\ 2.501.463.13\\ 3\\ 1.112.829.56\\ 6\\ 4.978.817.53\\ 2\\ 495.460.483\\ 0\\ 381.632.256\\ 286.749.643\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ 2.015.345.75\\ 3\\ 193.683.524\\ 6.159.213.53\\ 7\\ 7.360.996.61\\ 4\\ 1.146.669.35\\ 5\\ 5\\ 9.778.583.34\\ 6\\ 552.686.093 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.001.467.26\\ 1\\ 6.374.935.41\\ 8\\ 2.159.837.23\\ 1\\ 4.310.442.06\\ 7\\ 1.179.535.81\\ 9\\ 1.915.517.09\\ 2\\ 3.875.248.13\\ 5\\ 3.016.384.01\\ 8\\ 2.032.557.78\\ 4\\ 6.865.352.28\\ 3\\ 2.111.993.59\\ 5\end{array}$
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin Snaclec 4 OS=Echis pyramidum leakeyi Snaclec coagulation factor IX- binding protein subunit A Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment) Snaclec bitiscetin subunit alpha Snake venom metalloproteinase Ac1 Zinc metalloproteinase/disintegrin Snake venom serine protease homolog Snaclec echicetin subunit beta Cysteine-rich venom protein piscivorin Zinc metalloproteinase-disintegrin- like halysase	sp Q6J936 TXVE_BOTER sp Q6X5S2 SL4_ECHPL sp Q7LZ71 SLA_PROFL sp Q7LZK5 SLA_BITAR sp Q7LZK5 SLA_BITAR sp Q7LZS9 VM1A_DEIAC sp Q7SZE0 VM2SA_GLOSA sp Q7T229 VSPH_BOTJR sp Q7T247 SLB_ECHCA sp Q7ZZN9 CRVP_AGKPI sp Q7ZZN9 CRVP_PROJR sp Q8AWI5 VM3HA_GLOHA	29.48 140.44 189.83 33.91 202.43 679.3 2463.32 28.91 1708.15 1213.22 786.35 387.02	27 1 3 3 1 3 14 40 1 26 21 18	$\begin{array}{c} 8.459.170.11\\ 1\\ 0\\ 2.211.970.47\\ 4\\ 5.330.406.61\\ 8\\ 7.515.574.79\\ 5\\ 2.337.522.20\\ 8\\ 544.357.463\\ 6.594.640.21\\ 3\\ 2.442.739.50\\ 1\\ 445.530.661\\ 3.820.539.59\\ 1\\ 2.250.875.86\\ 9\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.846.322.65\\ 4\\ 6.275.126.72\\ 1\\ 112.512.896\\ 1.505.586.63\\ 1\\ 9.483.065.14\\ 7\\ 5.685.211.33\\ 6\\ 2.175.162.61\\ 9\\ 8.827.268.69\\ 7\\ 0\\ 4.638.873.32\\ 5\\ 368.430.641\\ 633.362.117\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.383.923.60\\ 3\\ 0\\ 5.098.408.10\\ 4\\ 2.644.928.66\\ 3\\ 7.978.467.85\\ 7\\ 1.858.839.43\\ 3\\ 8.317.023.27\\ 4\\ 8.946.497.75\\ 9\\ 5.729.655.23\\ 6\\ 5.210.193.92\\ 8\\ 3.956.785.96\\ 3\\ 5.055.478.63\\ 3\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 7.286.831.08\\ 5\\ 0\\ 5.517.633.19\\ 4\\ 5.148.588.12\\ 2\\ 178.109.884\\ 1.721.011.64\\ 9\\ 1.093.192.77\\ 5\\ 733.783.952\\ 3.382.738.65\\ 4\\ 4.134.740.44\\ 1\\ 2.660.783.36\\ 7\\ 5.156.892.41\\ 6\end{array}$	$\begin{array}{c} 2.766.938.62\\ 2\\ 1.957.239.96\\ 7\\ 0\\ 2.000.383.33\\ 1\\ 8.979.195.64\\ 3\\ 7.177.826.47\\ 3\\ 1.660.226.60\\ 9\\ 4.086.139.19\\ 6\\ 0\\ 21.774.044\\ 1.033.314.53\\ 5\\ 8.051.028.73\\ 7\\ \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.028.478.09\\ 2\\ 1.072.508.68\\ 1\\ 2.634.442.91\\ 6\\ 1.282.416.69\\ 1\\ 2.501.463.13\\ 3\\ 1.112.829.56\\ 6\\ 4.978.817.53\\ 2\\ 495.460.483\\ 0\\ 381.632.256\\ 286.749.643\\ 6.225.335.84\\ 4\\ 4\end{array}$	$\begin{array}{c} 1.108.791.04\\ 4\\ 0\\ 4.774.828.35\\ 4\\ 6.864.046.82\\ 7\\ 2.015.345.75\\ 3\\ 193.683.524\\ 6.159.213.53\\ 7\\ 7.360.996.61\\ 4\\ 1.146.669.35\\ 5\\ 5\\ 9.778.583.34\\ 6\\ 552.686.093\\ 3.699.331.73\\ 1\end{array}$	$\begin{array}{c} 1.001.467.26\\ 1\\ 6.374.935.41\\ 8\\ 2.159.837.23\\ 1\\ 4.310.442.06\\ 7\\ 1.179.535.81\\ 9\\ 1.915.517.09\\ 2\\ 3.875.248.13\\ 5\\ 3.016.384.01\\ 8\\ 2.032.557.78\\ 4\\ 6.865.352.28\\ 3\\ 2.111.993.59\\ 5\\ 2.154.995.65\\ 7\\ \end{array}$

Cysteine-rich venom protein ablomin	sp Q8JI40 CRVP_GLOBL	722.15	28	5.290.131.34 7	2.081.670.93 3	1.883.494.76 9	201.061.037	1.218.599.01 1	9.037.947.01 5	2.486.567.34 2	7.987.217.29 4
Zinc metalloproteinase/disintegrin- like HR1a	sp Q8JIR2 VM3HA_PROFL	1230.52	14	1.088.472.46 3	2.872.536.34 6	3.912.519.92 8	3.247.502.89 4	1.743.415.39 2	1.197.844.81 3	5.913.854.47 6	3.775.212.82 4
Snake venom serine protease BITS01A	sp Q8QG86 VSP_BOTIN	3092.96	23	5.963.563.20 6	1.907.295.78 3	4.987.238.10 8	9.718.431.64 3	6.215.909.71 7	3.510.414.59 9	1.055.081.96 7	8.508.674.20 6
Acidic phospholipase A2 BITP01A	sp Q8QG87 PA2A_BOTIN	730.61	37	2.723.749.43 5	7.574.972.16 3	2.965.353.64 3	2.706.620.93 3	5.735.091.24 7	3.403.337.30 3	2.293.869.88 8	5.882.356.58 5
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like berythractivase	sp Q8UVG0 VM3BE_BOTER	220.84	13	2.591.593.75 1	1.242.588.06 5	2.387.366.91 2	183.088.076	1.013.668.55 1	7.576.745.87 8	1.056.297.83 1	8.095.626.84 4
Snaclec anticoagulant protein subunit B	sp Q9DEF8 SLAB_DEIAC	889	4	6.092.980.41 3	3.093.459.69 4	282.959.598	1.851.668.15 3	4.765.986.09 3	1.155.918.78 9	1.454.288.10 2	859.100.118
Venom nerve growth factor	sp Q9DEZ9 NGFV_CRODU	859.7	11	1.594.045.00 7	7.791.052.41 1	1.997.420.89 5	3.707.970.32 8	4.308.769.48 8	1.220.919.54 3	1.574.879.41 9	8.262.120.48 8
Snake venom serine protease 3	sp Q9DF66 VSP3_PROJR	31.95	16	3.098.738.31 3	1.137.742.56 4	6.143.371.14 7	1.891.631.31 2	153.150.095	5.738.342.63 3	2.181.200.75 8	4.417.812.71 5
Snaclec coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit A	sp Q9DG39 SLXA_GLOHA	1121.55	1	1.639.137.85 3	3.215.695.23 3	1.285.767.44 3	1.739.581.29 3	224.936.924	1.642.052.46 9	2.399.614.52 4	7.816.293.74 8
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like VAP1	sp Q9DGB9 VM3V1_CROAT	104.82	20	4.996.764.59 1	1.046.482.28 7	625.568.685	9.518.272.44 6	1.909.828.05 3	1.742.048.24 7	1.090.516.01 9	8.692.090.54 7
Antihemorrhagic factor BJ46a	sp Q9DGI0 FTE46_BOTJA	1023.53	2	1.961.250.10 2	4.184.214.84 4	4.337.239.55 5	6.283.789.04 7	4.014.947.39 7	2.279.546.37 2	2.074.486.30 5	1.869.051.39 4
Acidic phospholipase A2	sp Q9I8F8 PA2A_BOTPC	545.79	15	75.674.442	1.341.050.70 5	5.668.774.64 7	9.229.784.59 3	1.831.815.48 4	0.137370422 7	2.942.918.43 1	3.899.686.50 2
Thrombin-like enzyme acutobin	sp Q9I8X2 VSP1_DEIAC	3134.57	10	7.453.939.81 7	3.638.236.07 9	766.807.944	5.941.781.42 9	9.610.366.34 8	2.497.542.30 1	8.918.883.02 5	312.533.904
Snake venom metalloproteinase neuwiedase (Fragment)	sp Q9I9R4 VM1N_BOTPA	3636.06	37	6.154.825.70 6	1.154.890.67 9	4.625.981.66 4	2.150.191.10 1	6.713.280.04 8	2.160.694.09 1	5.924.382.29 8	1.173.662.22 9
Basic phospholipase A2 homolog 2	sp Q9I834 PA2H2_BOTMO	4917.73	45	1.453.272.40 2	2.849.569.82 8	3.053.747.43 5	1.027.663.79 9	417.797.424	1.661.245.39 5	174.154.032	1.247.521.56 7
Basic phospholipase A2 homolog BnSP-7	sp Q9IAT9 PA2H_BOTPA	751.6	63	2.673.028.24 5	1.425.645.00 2	7.685.617.75 6	5.053.415.54 5	211.628.747	8.116.499.65 5	4.071.610.96 1	8.022.703.68 6
Snaclec coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit B (Fragment)	sp Q9PS06 SL9B_BOTJA	2086.55	11	6.406.853.13 7	4.328.960.72 5	4.305.758.60 1	6.836.272.35 7	9.652.243.37 9	3.810.878.76 8	6.561.637.03 8	28528.73
Snaclec GPIB-binding protein subunit beta	sp Q9PSM5 SL1B_BOTJA	988.3	19	8.575.892.96 1	2.733.489.28 8	1.784.868.08 4	1.064.953.66 3	326.519.491	4.353.878.30 9	6.680.912.64 3	1.379.702.74 8
Snaclec GPIB-binding protein subunit alpha	sp Q9PSM6 SL1A_BOTJA	1920.43	16	7.861.752.15 3	4.311.884.65 4	1.570.182.98 8	1.411.885.39 3	4.710.798.27 6	7.928.650.60 7	5.291.425.69 5	1.163.433.04 7
Basic phospholipase A2 homolog M1-3-3	sp Q9PVE3 PA2H3_BOTAS	484.69	33	2.029.734.54 4	2.248.305.48 6	3.891.664.88 1	2.879.458.00 7	5.397.183.41 7	1.323.153.62 3	2.234.969.65 2	1.756.582.19 6
Acidic phospholipase A2 H1E6	sp Q9PVF2 PA2AE_CALRH	4952.65	7	1.505.779.95 2	4.444.227.08 7	0	0	3.411.541.79 9	7.405.698.96 9	0	0
Zinc metalloproteinase/disintegrin	sp Q9PVK9 VM2MD_GLOBR	485.15	60	17.864.908	9.208.789.43 8	2.353.305.59 9	1.159.962.49 9	1.383.699.78 7	1.953.725.78 6	2.405.168.76 7	2.294.803.18 5
Venom plasminogen activator Haly- PA	sp Q9YGJ8 VSPPA_GLOBR	959.97	10	4.583.452.87 8	4.926.202.79 1	5.553.983.49 6	5.379.227.07 2	1.107.229.47 8	4.177.022.94 6	4.106.152.14 4	5.131.916.35 4
Snake venom serine protease Haly-2	sp Q9YGJ9 VSPH2_GLOBR	802.17	18	6.832.155.17 5	1.321.175.92 5	2.240.105.26 8	3.070.341.76 4	1.123.945.76 4	1.107.928.62 6	1.010.984.80 3	414.003.822
Thrombin-like enzyme acutin (Fragment)	sp Q9YGS1 VSPA_DEIAC	1521.05	16	1.869.568.42 4	7.713.819.00 6	2.085.831.43 5	2.554.237.11 1	3.658.736.35 1	5.666.821.83 1	1.514.704.38 6	2.505.677.90 3

Zinc metalloproteinase/disintegrin	sp Q9YI19 VM2MC_GLOBR	1028.18	25	1.479.242.73 7	4.112.176.55 1	228.989.589	1.270.630.67 7	1.735.596.89 3	1.285.560.73 2	2.359.354.51 4	1.701.794.65 8
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	sp Q9YIB5 QPCT_BOTJA	407.81	13	1.008.602.95 6	6.221.468.88 8	5.895.353.66 8	1.068.314.98 4	2.103.469.46 2	8.810.768.23 4	178.873.119	1.014.684.11 9
Snake venom serine protease KN13	sp Q71QH6 VSP13_TRIST	564.23	10	2.017.959.02 1	6.071.544.76 6	1.653.618.26 1	2.543.054.49 1	1.148.733.67 7	2.734.552.04 8	6.152.546.65 2	2.547.410.23 7
Snake venom serine protease CL5	sp Q71QI3 VSP5_TRIST	38.47	11	3.228.986.81 1	1.917.110.03 3	2.905.150.75 7	2.897.754.60 5	136.382.621	2.151.035.16 5	1.865.528.42 7	2.532.550.98 8
Snaclec stejaggregin-A subunit beta- 1	sp Q71RQ0 SLAB1_TRIST	3026.82	1	0	2.712.193.35 4	0	0	6.048.761.04 6	4.970.127.46 1	0	0
Zinc metalloproteinase/disintegrin	sp Q072L5 VM2_BOTAS	2114.24	40	774.751.668	1.095.343.55 9	8.040.709.53 4	2.244.582.38 1	2.764.311.44 1	2.363.133.41 1	1.140.775.05 9	7.515.797.93 8
Thrombin-like enzyme asperase	sp Q072L6 VSPL_BOTAS	1136.71	36	6.527.418.56 3	5.882.916.97 7	6.160.379.57 9	7.608.310.56 1	3.862.926.60 4	5.113.257.54 2	6.010.891.06 6	2.878.293.09 5
Snake venom serine protease	sp Q072L7 VSP_LACST	944.23	19	1.460.683.02 2	5.329.183.89 1	3.329.083.50 2	8.756.686.23 6	10.797.092	5.149.743.00 9	2.488.364.15 2	5.331.044.93 7
Venom nerve growth factor	sp Q90W38 NGFV_BOTJR	1565.36	11	1.051.735.93 1	1.073.301.82 2	1.535.602.84 9	6.392.710.16 3	4.478.429.94 3	2.097.963.80 9	1.279.884.92 8	4.112.073.87 9
Snake venom vascular endothelial growth factor toxin	sp Q90X23 TXVE_BOTJA	720.19	20	1.289.712.19 5	3.603.320.41 7	1.649.362.67 9	1.812.905.06 6	3.085.910.10 8	246.789.541	108.739.201	2.105.235.52 9
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like HV1	sp Q90ZI3 VM3H1_PROFL	9534.34	15	6.274.517.86 6	2.467.198.15 3	1.572.208.37 1	1.161.928.53 9	2.698.020.47 1	5.037.216.83 9	1.128.859.15 8	1.022.801.56 5
Zinc metalloproteinase/disintegrin	sp Q98SP2 VM2J2_BOTJA	2526.65	125	4.158.050.17 4	4.040.368.72 1	3.219.741.61 9	3.989.282.24 7	4.187.363.97 2	1.271.152.43 1	4.950.021.59 3	3.614.399.16 7
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like HF3	sp Q98UF9 VM3H3_BOTJA	1118.99	37	1.361.589.36 3	1.169.013.89 5	1.222.650.40 4	2.812.793.77 8	7.608.540.59 2	8.250.876.67 9	1.687.903.90 1	2.100.010.17 4
Venom plasminogen activator TSV- PA	sp Q91516 VSPPA_TRIST	919.4	21	3.419.304.54 7	3.443.906.97 1	2.912.812.02 5	4.315.829.11 1	8.020.551.47 9	8.576.339.50 2	2.983.079.67 4	9.651.487.95 1
Snake venom metalloproteinase ACLF	sp Q92031 VM1A_AGKCL	856.78	13	4.346.864.52 6	2.653.896.35 9	4.892.111.48 1	3.846.033.53 4	1.604.863.06 4	1.123.866.74 4	5.718.729.01 7	7.416.388.79 5
Snake venom metalloproteinase ACLH	sp Q92032 VM1AH_AGKCL	774.02	12	1.746.962.15 8	3.907.396.82 6	1.964.130.04 7	2.234.506.88 3	124.206.364	3.867.244.44 2	1.666.878.12 1	1.822.142.53 9
Zinc metalloproteinase-disintegrin- like atrolysin-A (Fragment)	sp Q92043 VM3AA_CROAT	460.82	17	1.438.749.19 4	1.563.181.10 5	1.175.049.64 6	5.008.347.19 9	3.825.172.23 3	7.543.674.08 8	1.286.273.96 6	2.269.668.08 3
Acidic phospholipase A2 pgPLA 1b/pgPLA 2b	sp Q92147 PA2AP_PROFL	364.47	7	0	4.065.313.85 2	2.760.265.61 4	681.718.608	2.047.928.25 4	2.471.597.92 8	6.361.949.31 5	0
Zinc metalloproteinase-disintegrin BlatH1	sp U5PZ28 VM2H1_BOTLA	1195.33	9	6.992.857.63 8	4.867.991.18 1	7.045.442.50 4	3.596.719.54 6	1.876.530.44 9	1.897.431.68 7	1.798.552.78 1	8.507.527.29 9
Venom phosphodiesterase	sp W8E7D1 PDE_MACLB	8082.77	23	705.729.941	1.219.616.46 9	8.563.404.06 3	2.001.185.95 5	5.534.779.60 8	3.647.195.29 8	1.067.843.59 8	9.118.478.07 8
L-amino acid oxidase	sp X2JCV5 OXLAA_CERCE	11647.41	120	2.840.941.47 8	98.038.584	2.810.463.82 1	1.479.004.29 8	114.809.292	4.038.712.61 5	3.141.152.10 7	2.088.377.63 8
L-amino acid oxidase (Fragment)	sp X2L4E2 OXLA_BOTPC	3749.69	179	7.484.784.68 3	18.703.341	5.700.535.11 3	6.094.322.60 3	1.478.469.66 9	7.597.278.70 2	3.328.602.01 6	6.066.517.85 6