NATHÁLIA DA COSTA GALIZIO

Caracterização proteômica e funcional do veneno de duas espécies de serpentes do gênero *Bothrops* submetidas à mudança de dieta.

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

NATHÁLIA DA COSTA GALIZIO

Caracterização proteômica e funcional do veneno de duas espécies de serpentes do gênero *Bothrops* submetidas à mudança de dieta.

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.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Drª Karen de Morais Zani

Versão Corrigida

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)

Galizio, Nathalia da Costa
Caracterização proteômica e funcional do veneno de duas espécies de serpentes do gênero Bothrops submetidas à mudança de dieta / Nathalia da Costa Galizio; orientadora Karen de Morais-Zani. -- São Paulo, 2021.
173 p.

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

1. Biotecnologia. 2. Bioquímica. 3. Venenos. 4. Dieta. I. Morais-Zani, Karen de, 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): Nathália da Costa Galizio

Título da Dissertação: Caracterização proteômica e funcional do veneno duas espécies de serpentes do gênero *Bothrops* submetidas à mudança de dieta.

Orientador: Dra. Karen de Morais Zani

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a **27/04/2021**, considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Fernanda Calheta Vieira Portaro

Instituição: Instituto Butantan

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho

Instituição: ICB/USP

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Alexandre Keiji Tashima

Instituição: UNIFESP

Presidente: Assinatura:

Nome: Karen de Morais Zani

Instituição: Instituto Butantan

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo comparativo da composição das biomoléculas dos venenos das serpentes Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus nascidas e mantidas no Instituto Butantan e recém chegadas da natureza", protocolada sob o CEUA nº 1949030915 (ID 000194), sob a responsabilidade de **Karen de Morais Zani** *e equipe; Nathália da Costa Galizio; Marisa Maria Teixeira da Rocha; Anita Mitico Tanaka Azevedo; Kathleen Fernandes Grego* - 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 18/11/2015.

We certify that the proposal "Comparative study of biomolecules composition of Bothrops jararaca and Crotalus durissus terrificus venom born and maintained at the Butantan Institute and newly arrived from nature", utilizing 30 Isogenics mice (30 females), 355 Heterogenics mice (355 males), 10 Reptiles (males or females), 960 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 1949030915 (ID 000194), under the responsibility of **Karen de Morais Zani** *and team; Nathália da Costa Galizio; Marisa Maria Teixeira da Rocha; Anita Mitico Tanaka Azevedo; Kathleen Fernandes Grego* - 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 11/18/2015.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 07/2017 Área: Herpetologia

Origem:	Biotério Central						
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	6 a 8 semanas	N:	30
Linhagem:	Balb/c			Peso:	18 a 22 g		
Origem:	Biotério Central						
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	3 a 4 semanas	N:	355
Linhagem:	Swiss			Peso:	18 a 22 g		
Origem:	Recepção LECZ						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	2 a 10 anos	N:	10
Linhagem:	Bothrops moojeni			Peso:	05 a 1 kg		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Anfíbios	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 0 horas	N:	960
Linhagem:	Rana catesbeiana			Peso:	20 a 30 g		

Local do experimento: Laboratório de Herpetologia

São Paulo, 23 de março de 2021

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

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

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

butantan *Comissão de Ética no Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização proteômica e funcional do veneno de duas espécies de serpentes do gênero Bothrops submetidas à mudança de dieta.", protocolada sob o CEUA nº 9341230718 (ID 001312), sob a responsabilidade de **Karen de Morais Zani** *e equipe; Nathália da Costa Galizio* - 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 20/08/2018.

We certify that the proposal "Proteomic and functional characterization of the venom of two species of snakes of the genus Bothrops submitted to diet change.", utilizing 12 Reptiles (males and females), 193 Heterogenics mice (193 males), 75 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 9341230718 (ID 001312), under the responsibility of **Karen de Morais Zani** *and team; Nathália da Costa Galizio* - 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 08/20/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2018 a 07/2021 Área: Herpetologia

Origem:	Recepção LECZ						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 8 anos	N:	12
Linhagem:	Bothrops alternatus			Peso:	200 a 1500 g		
Origem:	Biotério Central						
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	1 a 12 semanas	N:	193
Linhagem:	Swiss			Peso:	18 a 22 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Anfíbios	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 24 semanas	N:	75
Linhagem:	Lithobates catesbeianus			Peso:	18 a 22 g		

Local do experimento: Laboratório de Herpetologia

Comentários da CEUA: *Prezado Pesquisador,*

A Comissão informa que apenas os pesquisadores e alunos elencados no formulário estão autorizados a manipular animais deste protocolo. A manipulação de animais por pessoas não-autorizadas constitui infração grave, podendo acarretar a suspensão das atividades.

É necessária a apresentação da Nota Fiscal de Compra junto com o Relatório Final do protocolo.

São Paulo, 23 de março de 2021

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

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution”

Theodosius Dobzhansky

Agradecimentos

Aos meus pais, Luiz Cesar e Sonia, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos da minha jornada acadêmica. Mesmo diante de dúvidas e incertezas, a certeza que poderia contar com vocês em todos os momentos me deu toda a força para continuar. Eu me orgulho muito de ter vocês dois como meus pais, não podia ter tido sorte maior. Muito obrigada.

À minha orientadora, dra. Karen de Morais Zani, muito obrigada pela oportunidade, por ter acreditado em mim, pela orientação e por todos os ensinamentos. Obrigada por me escutar, por aceitar umas ideias maravilhosas (mas que as vezes se provam não tão maravilhosas assim), obrigada pelas críticas, pela paciência e por todo o apoio. Em momentos em que eu pensei em desistir, ouvir os seus conselhos restaurou minha energia para continuar. Obrigada por me inspirar a ser uma pesquisadora melhor. A admiração que eu tenho por você é enorme e cresce a cada dia.

À dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo, por liderar o laboratório com maestria e determinação. Por ter formado uma família dentro do ambiente de trabalho, e por ter aceitado me incluir nela. Obrigada pelas conversas e pelas broncas que me auxiliaram e geraram um crescimento pessoal e profissional indispensável.

À dra. Kathleen Fernandes Grego, diretora do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por manter um plantel de serpentes único e maravilhoso e permitir a realização desse trabalho, mesmo com toda a problemática envolvida.

Ao dr. Sávio Stefanini Sant'Anna, Jarbas Prado Vidueiros e dr. Daniel Rodrigues Stuginski por alimentarem as serpentes com anfíbios e por extraírem os venenos seguindo um calendário apertado. Ao dr. Daniel, agradeço também a ajuda indispensável no manejo e inoculação dos anfíbios no experimento de dose letal 50%.

Às minhas queridas amigas, Dani e Larissa, que eu sei que posso contar em todos os momentos, compartilhar as alegrias e chorar nas tristezas. Vocês são as irmãs que eu não tive, obrigada pela amizade de uma vida inteira.

À Caroline Serino, pessoa maravilhosa, companheira de laboratório perfeita, professora e, principalmente, amiga. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por toda paciência, por escutar minhas loucuras e me aconselhar. Seus *insights* sobre as pesquisas que a gente desenvolve são sempre muito precisos e só demonstram o quão genial você é. Obrigada por todas a revisões e pela paciência de me aguentar. E, também, por toda a diversão, pelos shows, pelos cinemas (quem diria assistir dois filmes no mesmo dia!) e por ser a amiga de todas as horas.

À Caroline Fabri, obrigada pelas análises estatísticas e por todas as resoluções de problemas técnicos que eu encontro na minha frente, por revisar meus trabalhos, por estar sempre disponível para ensinar. Obrigada principalmente por me ouvir, pelas conversas, pelas risadas, pelos rolês no finado Vila Butantan, pelos shows e pelo maravilhoso gosto musical que me contagia sempre.

Ao Weslei Aguiar, meu parceiro de laboratório favorito. Desde que eu te conheci já senti uma afinidade tão grande e quando nos aproximamos mais entendi o porquê. Uma pessoa incrível dessas que eu tenho a sorte de ter na minha vida. Obrigada por compartilhar os jogos, filmes e séries. Por discutir teorias mirabolantes e me fazer rir muito de cada uma delas. Mas principalmente, obrigada pelo companheirismo, saber que eu posso contar com você nos momentos mais difíceis me faz ficar mais calma.

Ao Juan Marin, pessoa incrível que a vida trouxe lá da Colômbia. Obrigada por compartilhar a paixão pela evolução e me ajudar a desenvolver os pensamentos e os conhecimentos nessa área. Por ouvir minhas frustrações que no fim geram risadas e alívio. Obrigada por ser um companheiro incrível de jogos, e pode esperar que a platina está chegando.

A todos os colegas de laboratório Daniela Hatakeyama, Daniel Carvalho, Danylo Ferreira, Eduardo Lima, Lídia Tasima, Luccas Padueli, Luisa Martinez e Victor Kavazoi, obrigada por toda a ajuda nos experimentos e pelas discussões de resultados. Obrigada pelos almoços divertidos, pelas conversas, risadas e, principalmente, a paciência que vocês têm comigo.

A todos os técnicos e profissionais do laboratório de Herpetologia do Insituto Butantan, pela paixão e trabalho duro com que vocês lidam com as serpentes. Por sempre me deixar uma sensação de segurança dentro do biotério e pelo respeito e amor enorme que vocês possuem pelos animais.

Às secretárias do programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Fábia e Eliane, por sempre tirarem as minhas dúvidas com paciência e respeito.

Ao suporte financeiro imprescindível para a realização desse projeto de pesquisa concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e CAPES desde a iniciação científica até o mestrado pelos processos 2014/16908-2, 2016/09976-9, 2017/11108-2 e 2018/14724-4. O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, processo número 134548/2018-3.

Resumo

Galizio; N.C. **Caracterização proteômica e funcional do veneno de duas espécies de serpentes do gênero *Bothrops* submetidas à mudança de dieta.** 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

As peçonhas de serpentes são um dos venenos animais mais estudados. Sua composição é complexa, sendo compostas majoritariamente por proteínas, que correspondem a aproximadamente 90% de seu peso seco. As proteínas do veneno estão sujeitas à evolução Darwiniana e a variação na composição do veneno é observada em diferentes níveis taxonômicos. Estudos demonstram de forma consistente que há grandes variações na composição dos venenos de serpentes entre diferentes espécies e mesmo dentro de uma mesma espécie. Essas diferenças podem ser decorrentes de fatores variados, incluindo sexo, idade, distribuição geográfica e dieta. A variação da composição do veneno devido à dieta pode estar relacionada à especialização da serpente a diferentes presas. Entretanto, a relação entre a dieta e a composição e atividades do veneno ainda é um tema controverso e pouco estudado. Logo, o objetivo deste trabalho é investigar a influência da dieta na composição e nas atividades bioquímicas e biológicas do veneno das serpentes das espécies *Bothrops moojeni* e *B. alternatus*. Para isso, as serpentes de ambas as espécies tiveram sua dieta alterada de mamíferos (camundongos ou ratos), o padrão utilizado na manutenção das serpentes do plantel do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, para anfíbios (*Lithobates catesbeianus*) por um ano e, depois, retornaram à dieta com mamíferos. Com relação às serpentes, notou-se que a espécie *B. moojeni* apresentou menos rejeição à alimentação, sem episódios de regurgitação ou morte devido à dieta. Já as *B. alternatus* apresentaram muitos episódios de regurgitação, além de problemas bucais graves, incluindo estomatite com presença de cáseos. Observaram-se poucas diferenças no perfil eletroforético e cromatográfico de *B. moojeni*, porém as serpentes da espécie *B. alternatus* apresentaram uma banda de ~15 kDa mais intensa nos venenos finais, mas que se manteve após o retorno à alimentação. Além disso, houve o surgimento de novos picos cromatográficos na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em especial no veneno das fêmeas, o que não foi observado em *B. moojeni*. Com relação às atividades enzimáticas, as diferenças mais notáveis foram na atividade de LAAO e PLA_2 das serpentes *B. alternatus*, enquanto o veneno de *B. moojeni* demonstrou poucas alterações. Os ensaios *in vivo* demonstraram uma

diminuição da atividade letal em camundongos e um aumento da letalidade em anfíbios para ambas as espécies. As atividades hemorrágica e edematogênica apresentaram uma diminuição com a alimentação baseada em anfíbios em ambas as espécies, mas houve retorno à atividade inicial apenas na espécie *B. moojeni*. Sendo assim, os resultados corroboram a influência da dieta na composição e função do veneno, indicando sua plasticidade fenotípica.

Palavras-chave: Dieta, *B. moojeni*, *B. alternatus*, veneno, variação

Abstract

Galizio; N.C. **Proteomic and functional characterization of the venom of two species of snakes from the genus *Bothrops* submitted to diet change.** 2021. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Snake venoms are the most studied animal toxins. Its composition is complex, being composed mainly of proteins, which correspond to approximately 90% of its dry weight. The venom proteins are subject to Darwinian evolution and the variation in the composition of the venom is observed at different taxonomic levels. Studies consistently demonstrate that there are large variations in the composition of snake venoms between different species and even within the same species. These differences can be due to different factors, including sex, age, geographic distribution and diet. The variation in the venom composition due to diet may be related to the snake's specialization to different prey. However, the correlation between diet and venom composition and activities is still a controversial topic. Therefore, the objective of this work is to investigate the influence of the diet on the composition, and biochemical and biological activities of the venom from snakes of the species *Bothrops moojeni* and *B. alternatus*. For this, the snakes of both species had their diet changed from mammals (mice or rats), the standard diet used in the maintenance of the snakes at the Laboratory of Herpetology of the Butantan Institute, to amphibians (*Lithobates catesbeianus*) for one year and then, returned to the diet based on mammals. Regarding snakes, it was noted that the species *B. moojeni* showed less rejection of feeding, without episodes of regurgitation or death due to the diet. *B. alternatus*, on the other hand, had many episodes of regurgitation, in addition to severe oral problems, including stomatitis with the presence of pus. Few differences were observed in the electrophoretic and chromatographic profile of *B. moojeni*, but the snakes of the species *B. alternatus* showed a more intense protein band of ~15 kDa in the final venom, but which remained after returning to the diet base on mammals. In addition, there were new chromatographic peaks in high performance liquid chromatography (HPLC), especially in female venoms, which was not observed in *B. moojeni*. Regarding the enzymatic activities, the most notable differences were in the LAAO and PLA_2 activities of the *B. alternatus* snakes, whereas the *B. moojeni* venom showed few changes. *In vivo* assays demonstrated a decrease in lethal activity in mice and an increase in amphibians for both species. Hemorrhagic and edematogenic activities showed a decrease with amphibian-based

feeding in both species, but there was a return to the initial activity only in *B. moojeni* species. Thus, the results of this work corroborate the influence of the diet on the composition and function of the snake venom, indicating a phenotypic plasticity.

Keywords: Diet, *B. moojeni*, *B. alternatus*, venom, variation

Lista de figuras

Figura 1. Variação da massa das serpentes *B. moojeni* ao longo do tempo. A alimentação com anfíbios da espécie *L. catesbeianus* se iniciou em outubro de 2015 e foi finalizada em outubro de 2016. As serpentes Bm 3 e Bm 10 morreram antes do final da alimentação com anfíbios. Apenas 6 indivíduos sobreviveram até o final do retorno com alimentação baseada em mamíferos. 52

Figura 2. SDS-PAGE dos pools de veneno de *B. moojeni* nos três momentos referentes à mudança na alimentação: Inicial (Ini), final 1 (F1) e final 2 (F2). Foram aplicados 20 µg de proteínas por canaleta, em condições redutoras, em gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad. PDE: fosfodiesterase, SVMP PI/P-III: metaloproteases P-I/P-II; SVSP: serinoproteases; PLA_2: fosfolipase A_2. 53

Figura 3. SDS-PAGE dos venenos individuais das serpentes da espécie B. moojeni nos três momentos de mudança na alimentação: Inicial (Ini), Final 1 (F1) e Final 2 (F2). Foram aplicados 20 µg de proteínas do veneno por canaleta, em condições redutoras, em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad. 54

Figura 4. SDS-PAGE dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. moojeni* em todas as extrações da alimentação baseada em anfíbios. Foram aplicados 20 µg de veneno por canaleta, em condições redutoras, em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad. 56

Figura 5. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. moojeni* nos três momentos de mudança na alimentação (Inicial, Final 1 e Final 2). Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. 58

Figura 6. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. moojeni* nos dois momentos de mudança na alimentação (Inicial e Final 1). Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. 59

Figura 7. Abundância relativa das famílias de proteínas dos venenos de serpentes da espécie *B. moojeni* submetidas à mudança de alimentação. A abundância relativa foi calculada com

base na intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína individual identificada pela análise proteômica. 60

Figura 8. Atividade de L-aminoácido oxidase dos venenos de B. moojeni inicial, final 1 e final 2. A atividade de LAAO foi determinada utilizando L-metionina como substrato e incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. *p < 0,05, entre venenos inicial e final 1; # p < 0,05, entre venenos final 1 e final 2; e ± p < 0,05, entre venenos inicial e final 2..... 62

Figura 9. Comparação da atividade enzimática da LAAO do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade de LAAO foi determinada utilizando L-metionina como substrato e incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. 63

Figura 10. Atividade fosfolipásica dos venenos de B. moojeni inicial, final 1 e final 2 A atividade fosfolipásica foi obtida utilizando o NOBA como substrato, incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. A leitura foi realizada a 425 nm. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2. 64

Figura 11. Comparação da atividade enzimática da PLA_2 do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade fosfolipásica foi obtida utilizando o NOBA como substrato, incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. A leitura foi realizada a 425 nm. 65

Figura 12. Atividade proteolítica sobre a azocaseína dos venenos de *B. moojeni* inicial, final 1 e final 2. A atividade caseinolítica foi estabelecida utilizando azocaseína como substrato. Após incubação por 90 min a 37 ºC, a leitura foi realizada a 492 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg). *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2. 66

Figura 13. Comparação da atividade proteolítica sobre a azocaseína do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade caseinolítica foi estabelecida utilizando azocaseína como substrato. Após incubação por 90 minutos a 37 ºC, a leitura foi r realizada a 492 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg)..... 66

Figura 14. Atividade proteolítica sobre o colágeno (*pig skin*) dos venenos de *B. moojeni* inicial, final 1 e final 2 na ausência ou presença de EDTA (*endpoint*). A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrado. Após incubação por 60 min a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2..... 68

Figura 15. Comparação da atividade proteolítica sobre o colágeno do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrato. Após

incubação por 60 min a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP. 69

Figura 16. Atividade proteolítica sobre o colágeno dos venenos de *B. moojeni* inicial, final 1 e final 2 na ausência ou presença de EDTA. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrato. Após incubação por 60 minutos a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes da adição do substrato, para avaliar a inibição de SVMP. 70

Figura 17. Dose mínima coagulante dos venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A DMC é estabelecida pela menor quantidade de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37 ºC. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2..... 73

Figura 18. Comparação da atividade coagulante do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A Dose Mínima Coagulante é estabelecida pela menor quantidade de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37 ºC..... 74

Figura 19. Dose letal 50% e curva de sobrevivência de camundongos inoculados com o *pool* de venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. Cinco camundongos Swiss machos foram injetados via intraperitoneal com 500 µL de diferentes doses do pool de venenos dos grupos inicial, final 1 e final 2. A sobrevivência de cada animal foi registrada por 48 horas. A dose letal 50% foi calculada pela análise de probitos. O primeiro gráfico (esquerda) representa as doses letais e os valores dos limites superior e inferior. O segundo gráfico (direita) demonstra o número de camundongos mortos ao longo do tempo de observação dos três grupos experimentais inoculados com a dose de 228,5 µg/animal. 75

Figura 20. Dose letal 50% e curva de sobrevivência de anfíbios da espécie *L. catesbeianus* inoculados com o *pool* de venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. Cinco rãs foram injetadas via intracelomática com 500 µL de diferentes doses do veneno dos grupos inicial, final 1 e final 2. A sobrevivência de cada animal foi registrada por 48 horas. A dose letal 50% foi calculada pela análise de probitos. O primeiro gráfico (esquerda) representa as doses letais e os valores dos limites superior e inferior. O segundo gráfico (direita) demonstra o número de rãs mortas ao longo do tempo de observação dos três grupos experimentais inoculados com a dose de 143,7 µg/animal..... 76

Figura 21. Atividade edematogênica dos venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. O aumento do volume da pata foi induzido pela aplicação de 1 µg de veneno na pata traseira direita de camundongos Swiss machos. O edema de pata foi expresso em porcentagem de aumento da espessura e o resultado final foi obtido pela diferença entre o volume da pata afetada e da pata contralateral (controle). Os valores descritos na tabela correspondem à área sob a curva..... 77

Figura 22. Dose mínima hemorrágica dos venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade hemorrágica foi obtida aplicando-se 100 µL de veneno em diferentes concentrações via intradérmica em camundongos Swiss machos. Após 3 horas, os

camundongos foram eutanasiados e o halo hemorrágico foi mensurado com o auxílio do software ImageJ..... 78

Figura 23. Variação da massa das serpentes *B. alternatus* ao longo do tempo. A alimentação com anfíbios da espécie *L. catesbeianus* se iniciou em maio de 2018 e foi finalizada em maio de 2019. Apenas 7 indivíduos sobreviveram até o final da alimentação com anfíbios. O retorno a dieta baseada em mamíferos foi iniciado em maio de 2019 e finalizada em maio de 2020. Apenas 3 animais sobreviveram ao fim dessa etapa. 80

Figura 24. SDS-PAGE dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. alternatus* antes (inicial) e depois (final) da mudança na alimentação para anfíbios (*L. catesbeianus*). Foram aplicados 20 µg de proteínas do veneno por canaleta em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad..... 81

Figura 25. SDS-PAGE das extrações dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. alternatus* durante a alimentação com anfíbios (*L. catesbeianus*). Foram aplicados 20 µg de proteínas do veneno por canaleta em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad..... 82

Figura 26. SDS-PAGE das extrações dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. alternatus* após o retorno à alimentação com mamíferos (ratos e/ou camundongos). Foram aplicados 20 µg de proteínas do veneno por canaleta em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad..... 83

Figura 27. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes machos e dos *pools* da espécie *B. alternatus* nos três momentos de mudança na alimentação (Inicial, Final 1 e Final 2). Amostras de 75 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Jasco. As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 min, 5-25% de B por 10 min, 25-45% de B por 60 min, 45-70% de B por 10 min, 70-100% de B por 10 min e 100% de B por 10 min. A cromatografia foi acompanhada por leitura a 215 nm..... 85

Figura 28. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes fêmeas da espécie *B. alternatus* nos três momentos de mudança na alimentação (Inicial, Final 1 e Final 2). Amostras de 75 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Jasco. As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 min, 5-25% de B por 10 min, 25-45% de B por 60 min, 45-70% de B por 10 min, 70-100% de B por 10 min e 100% de B por 10 min. A cromatografia foi acompanhada por leitura a 215 nm..... 86

Figura 29. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. alternatus* nos dois momentos de mudança na alimentação (Inicial e Final 1). Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas

a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. 88

Figura 30. Perfil cromatográfico e gel SDS-PAGE das frações coletadas no RP-HPLC do veneno do indivíduo Ba 1 inicial. Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Akta (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. As frações foram secas em *Speed Vac* e aplicadas em gel de acrilamida de diferentes concentrações (20%, 15% e 12%). 90

Figura 31. Perfil cromatográfico e gel SDS-PAGE das frações coletadas no RP-HPLC do veneno do indivíduo Ba 1 final 1. Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Akta (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. As frações foram secas em *Speed Vac* e aplicadas em gel de acrilamida de diferentes concentrações (20%, 15% e 12%). 91

Figura 32. Perfil cromatográfico e gel SDS-PAGE das frações coletadas no RP-HPLC do veneno do indivíduo Ba 4 inicial. Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Akta (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. As frações foram secas em *Speed Vac* e aplicadas em gel de acrilamida de diferentes concentrações (20%, 15% e 12%). 92

Figura 33. Perfil cromatográfico e gel SDS-PAGE das frações coletadas no RP-HPLC do veneno do indivíduo Ba 4 final 1. Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Akta (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. As frações foram secas em *Speed Vac* e aplicadas em gel de acrilamida de diferentes concentrações (20%, 15% e 12%). 93

Figura 34. Atividade de L-aminoácido oxidase dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2 A atividade de LAAO foi determinada utilizando L-metionina como substrato, e

incubando a reação a 37 ºC por 60 minutos. *p < 0,05, entre veneno inicial e final, #p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2, ± p < 0,05, entre veneno inicial e final 2. 94

Figura 35. Comparação da atividade enzimática da LAAO do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade de LAAO foi determinada utilizando L-metionina como substrato e incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. 95

Figura 36. Atividade fosfolipásica dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2. A atividade fosfolipásica foi obtida utilizando o NOBA como substrato, incubado-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. A leitura foi realizada a 425 nm. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2. 96

Figura 37. Comparação da atividade enzimática da PLA_2 do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade fosfolipásica foi obtida utilizando o NOBA como substrato, incubado-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. A leitura foi realizada a 425 nm. 97

Figura 38. Atividade proteolítica sobre a caseína dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2. A atividade caseinolítica foi estabelecida utilizando azocaseína como substrato. Após incubação por 90 min a 37 ºC, a leitura foi realizada a 450 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg). *p < 0,05, entre o veneno inicial e final, #p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2, ± p < 0,05, entre veneno inicial e final 2. 98

Figura 39. Comparação da atividade proteolítica sobre a azocaseína do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade caseinolítica foi estabelecida utilizando azocaseína como substrato. Após incubação por 90 min a 37 ºC, a leitura foi realizada a 450 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg). 98

Figura 40. Atividade proteolítica sobre o colágeno dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2 na ausência ou presença de EDTA. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrato. Após incubação por 60 min a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP. 100

Figura 41. Comparação da atividade proteolítica sobre o colágeno do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrado. Após incubação por 60 min a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP. 100

Figura 42. Atividade proteolítica sobre o colágeno dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2 na ausência ou presença de EDTA. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrato. Após

incubação por 60 minutos a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP. 101

Figura 43. Dose mínima coagulante dos venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A DMC é estabelecida pela menor quantidade de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37 ºC. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final, #p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2, ± p < 0,05, entre veneno inicial e final 2. ANOVA com Tukey como teste a posteriori..... 103

Figura 44. Comparação da atividade coagulante do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A DMC é estabelecida pela menor quantidade de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37 ºC..... 104

Figura 45. Dose letal 50% e curva de sobrevivência de camundongos inoculados com o pool de venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. Cinco camundongos Swiss machos foram injetados via intraperitoneal com 500 µL de diferentes doses do pool de venenos dos grupos inicial, final 1 e final 2. A sobrevivência de cada animal foi registrada por 48 horas. A dose letal 50% foi calculada pela análise de probitos. O primeiro gráfico (esquerda) representa as doses letais e os valores dos limites superior e inferior. O segundo gráfico (direita) demonstra o número de camundongos mortos ao longo do tempo de observação dos três grupos experimentais inoculados com a dose de 253,1 µg/animal.... 105

Figura 46. Fotos da necropsia de camundongos swiss machos após a aplicação de 12,65 µg/g de animal do veneno de *B. alternatus*. A primeira imagem demonstra a hemorragia na cavidade abdominal dos animais. A segunda imagem mostra o diafragma intensamente hemorrágico..... 106

Figura 47. Dose letal 50% e curva de sobrevivência de anfíbios da espécie *L. catesbeianus* inoculados com o *pool* de venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. Cinco rãs-touro foram injetadas via intracelomática com 500 µL de diferentes doses do veneno dos grupos inicial, final 1 e final 2. A sobrevivência de cada animal foi registrada por 48 horas. A dose letal 50% foi calculada pela análise de probitos. O primeiro gráfico (esquerda) representa as doses letais e os valores dos limites superior e inferior. O segundo gráfico (direita) demonstra o número de rãs mortas ao longo do tempo de observação dos três grupos experimentais inoculados com a dose de 143,7 µg/animal. 107

Figura 48. Foto da necropsia de rãs-touro da espécie *L. catesbeianus* após a aplicação de veneno de *B. alternatus*. É possível observar a hemorragia localizada nos pulmões dos animais..... 108

Figura 49. Dose mínima hemorrágica dos venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade hemorrágica foi obtida aplicando 100 µL de veneno em diferentes concentrações via intradérmica em camundongos Swiss machos. Após 3 horas, os camundongos foram eutanasiados e o halo hemorrágico foi mensurado com o auxílio do software ImageJ..... 109

Figura 50. Atividade edematogênica dos venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. O aumento do volume da pata foi induzido pela aplicação de 1 µg de veneno na pata traseira direita de camundongos Swiss machos. O edema de pata foi expresso em porcentagem de aumento da espessura e o resultado final foi obtido pela diferença entre o volume da pata afetada e da pata contralateral (controle). 110

Figura 51. Atividade miotóxica dos venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A miotoxicidade do veneno foi mensurada através da injeção de 40 µL de veneno no músculo gastrocnêmio direito de camundongos swiss machos. Após 3 horas os animais tiveram seu sangue retirado pela cauda e a liberação da CK foi mensurada através do kit Bioclin CK NAV UV-K010 conforme indicações do fabricante. Os valores estão expressos em média e desvio padrão. 111

Lista de abreviaturas e siglas

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

µL – Microlitro

3Ftx – *Three-finger toxins*

5'NUC – 5' nucleotidases

Å- Ångström

ANOVA – Análise de variância

AUC – *Area under the curve* (Área sob a curva)

Asp-49 – Resíduo de aminoácido ácido aspártico na posição 49

B. alternatus – Bothrops alternatus

B. atrox – Bothrops atrox

B. cotiara – Bothrops cotiara

B. fonsecai – Bothrops fonsecai

B. insularis – Bothrops insularis

B. jararaca – Bothrops jararaca

B. jararacussu – Bothrops jararacussu

B. marmoratus – Bothrops marmoratus

B. matogrossensis – Bothrops matogrossensis

B. moojeni – Bothrops moojeni

B. neuwiedi – Bothrops neuwiedi

B. pauloensis – Bothrops pauloensis

BPPs – *Bradykinin-potentiating peptides* (Peptídeos potenciadores de bradicinina)

BSA – Soro albumina bovina

Ca^{2+} - Íon cálcio

$CaCl_2$ – Cloreto de cálcio

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

CIS – Cistatina

CK – Creatino quinase

CO_2 – Dióxido de carbono

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

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

DIS – *Disintegrin* (Desintegrina)

DL_{50} – Dose Letal 50%

DMC – Dose Mínima Coagulante

DMH – Dose Mínima Hemorrágica

DTT – Ditiotreitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

eV – Eletronvolt

g – Grama

GPC – Glutaminil peptidase

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

hrs – Horas

HYAL - Hialuronidase

IAA – Iodoacetamida

Kcal – Quilo calorias

kDA – Quilo daltons

KUN – *Kunitz-type Serine Protease Inhibitor* (Inibidor de serino proteases do tipo Kunitz)

kV – Quilo volts

L. catesbeianus – *Lithobates catesbeianus*

LAAO – L-aminoácido oxidase

Lys-49 – Resíduo de aminoácido lisina na posição 49

M – Molar

m/z – Razão massa sobre carga

mg – Miligrama

mL - Mililitro

Min – Minutos

mM – Milimolar

mm^2 – Milímetros ao quadrado

MT – Mato Grosso

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NanoESI-qTOF – Nano *eletrospray* – quadrupolo – tempo de vôo

Nm – Nanômetros

NOBA – *4-Nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid*

NP – Peptídeos natriuréticos

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

OPD - *O-phenilenediamine*

PDE/PHOS - Fosfodiesterase

pH – Potencial hidrogeniônico

PLA_2 – Fosfolipase A_2

PLB – Fosfolipase B

PLI – *Phospholipase A_2 plasma inhibitor*

RCF/Força G (x g) – Força centrífuga relativa ou Força Gravitacional

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

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SP – São Paulo

SVMP – Metaloprotease do veneno de serpentes (*snake venom metalloprotease*)

SVSV – Serinoprotease do veneno de serpentes (*snake venom serine protease*)

TCA – Ácido tricloroacético

TFA – Ácido trifluoroacético

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

U – Unidade

UPLC – *Ultra Performance Liquid Cromatography* (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)

V – Volts

VEGF – Fator de crescimento endotelial de venenos (*venom endothelial growth factor*)

VNGF – Fator de crescimento neural de venenos (*venom neural growth factor*)

WAP – *Waprin*

Zn^{2+} – Íon zinco

Sumário

1. Introdução 31

1.1. Venenos de serpentes 31

1.2. Proteínas dos venenos e suas funções 32

1.3. Mecanismos relativos à variação na composição dos venenos 34

1.4. Dieta e composição de venenos 34

1.5. Gênero Bothrops 36

1.6. Implicações clínicas inerentes à variação dos venenos 37

2. Objetivos 40

2.1. Objetivos gerais 40

2.2. Objetivos específicos 40

3. Materiais e métodos 40

3.1. Aprovação pela Comissão de Ética 40

3.2. Camundongos 41

3.3. Anfíbios – Lithobates catesbeianus 41

3.4. Serpentes 41

3.5. B. moojeni 42

3.6. B. alternatus 42

3.7. Venenos 43

3.8. Caracterização da composição proteica dos venenos 44

3.8.1. Dosagem de proteínas 44

3.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) 44

3.8.3. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para avaliação do perfil proteico dos venenos 44

3.8.4. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para coleta das frações do veneno de B. alternatus 45

3.8.5. Análise proteômica – B. moojeni 45

3.9. Caracterização enzimática dos venenos 47

3.9.1. Atividade proteolítica 47

3.9.1.1. Atividade caseinolítica 47

3.9.1.2. Atividade proteolítica sobre o colágeno na presença e ausência de inibidor de SVMP (EDTA) 47
3.9.2. Atividade fosfolipásica 48
3.9.3. Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO) 48
3.10. Caracterização das atividades fisiopatológicas dos venenos 49
3.10.1. Atividade coagulante 49
3.10.2. Atividade hemorrágica 49
3.10.3. Atividade edematogênica 49
3.10.4. Dose letal 50
3.10.5. Atividade miotóxica 50
3.11. Análises estatísticas 51
4. Resultados 51
4.1. B. moojeni 51
4.1.1. Serpentes 51
4.1.2. Caracterização do perfil proteico dos venenos 52
4.1.2.1. SDS-PAGE 52
4.1.2.2. RP-HPLC 57
4.1.2.3. Análise proteômica 60
4.1.3. Caracterização enzimática dos venenos 62
4.1.3.1. Atividade de LAAO 62
4.1.3.2. Atividade fosfolipásica 63
4.1.3.3. Atividade proteolítica 65
4.1.4. Resumo das atividades enzimáticas de B. moojeni 71
4.1.5. Caracterização das atividades fisiopatológicas do veneno 72
4.1.5.1. Dose mínima coagulante 72
4.1.5.2. Dose Letal 50% e tempo de morte em camundongos 74
4.1.5.3. Dose Letal 50% e tempo de morte em anfíbios (Lithobates catesbeianus) 76
4.1.5.4. Atividade edematogênica em camundongos 76
4.1.5.5. Dose mínima hemorrágica em camundongos 77
4.2. B. alternatus 78
4.2.1. Serpentes 78
4.2.2. Caracterização do perfil proteico dos venenos 80
4.2.2.1. SDS-PAGE 80
4.2.2.2. RP-HPLC – Determinação do perfil cromatográfico 83

4.2.2.3. RP-HPLC – Coleta das frações cromatográficas ____ *87*
4.2.3. Caracterização enzimática dos venenos ____ *94*
4.2.3.1. Atividade de LAAO ____ *94*
4.2.3.2. Atividade fosfolipásica ____ *95*
4.2.3.3. Atividade proteolítica ____ *97*
4.2.4. Resumo das atividades enzimáticas de B. alternatus ____ *102*
4.2.5. Caracterização fisiopatológica dos venenos de B. alternatus ____ *103*
4.2.5.1. Atividade coagulante ____ *103*
4.2.5.2. Dose letal 50% em camundongos ____ *104*
4.2.5.3. Dose letal 50% em anfíbios (L. catesbeianus) ____ *106*
4.2.5.4. Dose mínima hemorrágica ____ *108*
4.2.5.5. Atividade edematogênica ____ *109*
4.2.5.6. Atividade miotóxica ____ *110*

5. Discussão ____ **111**

5.1. Serpentes ____ *111*
5.2. SDS-PAGE ____ *113*
5.3. RP-HPLC ____ *113*
5.4. Análise proteômica das serpentes da espécie B. moojeni ____ *116*
5.5. Atividade de L-aminoácido oxidase ____ *117*
5.6. Atividade fosfolipásica ____ *118*
5.7. Atividade proteolítica ____ *119*
5.8. Dose mínima coagulante ____ *120*
5.9. Dose letal 50% ____ *121*
5.10. Edema de pata ____ *122*
5.11. Dose mínima hemorrágica ____ *123*
5.12. Atividade miotóxica ____ *124*

6. Conclusão ____ **124**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ____ **126**

APÊNDICES ____ **139**

1. Introdução

1.1. Venenos de serpentes

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, uma das mais complexas e, também, mais estudadas dentre os venenos dos animais (FOX; SERRANO, 2005; MÉNEZ, 2002; WHITE; MEIER, 2017). Esses venenos representam uma grande inovação na evolução dos ofídios, permitindo a transição da forma de captura da presa de mecânica (constrição) para química (veneno), e esta inovação desempenhou um papel importante na diversificação e na ocupação de novos nichos ecológicos destes animais (ALAPE-GIRÓN et al., 2008).

Cerca de 90% do peso seco dos venenos é constituído por proteínas. Porém, apesar de apresentarem mais de 100 proteínas distintas (SERRANO et al., 2005), estas pertencem apenas a algumas famílias proteicas, incluindo enzimas (serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases) e proteínas sem atividade enzimática (disintegrinas, lectinas, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, proteínas secretórias ricas em cisteína, fatores de crescimento neural e endotelial, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz). As frações não proteicas são representadas por carboidratos, lipídeos, metais (frequentemente na forma de glicoproteínas e metaloproteases), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (CARDOSO et al., 2009; CASEWELL et al., 2014).

A função mais comum destas toxinas é imobilizar, paralisar e matar a presa, a fim de que a mesma possa ser ingerida de maneira segura e eficaz (CASEWELL et al., 2013; RICHARDS; BARLOW; WÜSTER, 2012). Além da função relacionada a subjugar a presa, os venenos de serpentes também são utilizados para defesa e para auxiliar na digestão da presa (KAZANDJIAN et al., 2021; REICHERT, 1936; THOMAS; POUGH, 1979). Entretanto, a ação de cada um de seus componentes, bem como sua interação no envenenamento humano, ainda não está totalmente esclarecida (WARRELL, 1989).

O veneno representa uma característica adaptativa crucial para o sucesso alimentar de serpentes peçonhentas (GUTIÉRREZ et al., 2017). Como a função primária do veneno de serpentes é a captura das presas, a seleção natural atuando na composição do veneno é uma consequência natural (CASEWELL et al., 2013). Dessa maneira, as proteínas do veneno estão sujeitas à rápida evolução Darwiniana e, apesar de demonstrado que tais

proteínas são codificadas por poucos genes, ainda assim a variação na composição do veneno é comum em diferentes níveis taxonômicos (GUTIÉRREZ et al., 2017). Os mecanismos moleculares envolvidos na evolução e adaptação dos venenos vêm sendo muito estudados. Genes que codificam proteínas com papel fisiológico passam por um processo de duplicação e essa cópia é expressa de forma seletiva nas glândulas de veneno(FRY et al., 2003; KORDIŠ; GUBENŠEK, 2000). Após esse recrutamento, muitos desses genes sofrem novas duplicações juntamente com processos de neofuncionalização das proteínas, gerando grandes multilocus de genes de uma mesma família de proteínas que exibem uma variedade de atividades funcionais e toxicidade (CASEWELL et al., 2013).

1.2.Proteínas dos venenos e suas funções

Os venenos de serpentes são compostos de uma mistura de diferentes famílias de proteínas, e cada uma dessas famílias contém muitas toxinas ou isoformas diferentes (TASOULIS; ISBISTER, 2017). Tasoulis e Isbister (2017), em revisão recente sobre a composição do veneno de serpentes dos três grandes grupos (elapídeos, viperíneos e crotalíneos), relataram 59 famílias diferentes de proteínas e as classificaram entre (i) famílias de proteínas dominantes, incluindo as fosfolipases A_2 (PLA_2s), metaloproteases (SVMP), serinoproteases (SVSP) e toxinas *three-finger* (3FTx – presente somente em elapídeos); (ii) famílias de proteínas secundárias, incluindo as proteínas secretórias ricas em cisteína (CRiSP), L-amino ácido oxidases (LAAOs), peptídeos Kunitz (KUN), lectinas do tipo C (CTL), disintegrinas (DIS) e peptídeos natriuréticos (NP); (iii) famílias de proteínas minoritárias; (iv) famílias de proteínas raras; e (v) famílias de proteínas únicas (são restritas a um único gênero) (TASOULIS; ISBISTER, 2017).

Com relação às famílias de proteínas dominantes, as SVMP são proteases muito comuns nos venenos de viperídeos. Estima-se que a maior parte dos venenos desse grupo são compostos por, pelo menos, 32% de SVMP (FOX; SERRANO, 2008), mas pode-se encontrar espécies com abundância muito maior, como a *Echis ocellatus* que apresenta mais de 70% de SVMPs na composição de seu veneno (ALBULESCU et al., 2020; WAGSTAFF et al., 2009). Dentro do gênero *Bothrops*, geralmente é a família de proteínas mais abundante (SOUSA et al., 2013). As SVMP são enzimas proteolíticas

Zn^{2+}-dependentes que são classificadas em três diferentes classes, de acordo com a presença de domínios: P-I, P-II e P-III (FOX; SERRANO, 2008; KINI; KOH, 2016).

As SVMP P-I apresentam apenas o domínio proteinase, aquelas pertencentes ao grupo P-II apresentam, além do domínio proteinase, um domínio de desintegrina e as P-III apresentam, além dos domínios proteinase e desintegrina, um domínio rico em cisteína (FOX; SERRANO, 2008). As SVMPs hidrolisam componentes chave da membrana celular de capilares, já que possuem especificidade maior pelo colágeno tipo IV, causando desestabilização mecânica nos capilares (GUTIÉRREZ et al., 2017). Os sinais clínicos causados pelas SVMPs incluem hemorragia, mionecrose, degradação da matriz extracelular, bolhas, dor, edema e coagulopatias (GUTIÉRREZ et al., 2017).

A família das PLA_2s é a mais comumumente encontrada em serpentes da família dos viperídeos e dos elapídeos (TASOULIS; ISBISTER, 2017). Algumas espécies de elapídeos podem apresentar cerca de 90% de abundância de PLA_2 em seu veneno, como a *Pseudechis papuanus* (TASOULIS; ISBISTER, 2017). Já dentro do gênero *Bothrops* há grande variação na abundância relativa dessa família, em que pode-se representar entre 6 a 10% em espécies como *B. jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. atrox*, mas pode chegar a 30% de abundância na espécie *B. jararacussu* (SOUSA et al., 2013). As PLA_2s catalisam a hidrólise das ligações éster sn-2 Ca^{2+}-dependentes em fosfolipídios. Essa hidrólise produz ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (KANASHIRO et al., 2002; SOARES et al., 2001). As PLA_2s podem ser divididas em pelo menos duas subclasses: D-49, que possuem um resíduo de aspartato na porção 49 e alta atividade catalítica, e K-49, que possuem um resíduo de lisina na mesma posição e não possuem atividade catalítica (KANASHIRO et al., 2002). A ação das PLA_2s é extensa, incluindo atividade neurotóxica, miotóxica, cardiotóxica, edematogênica, hipotensiva, de agregação plaquetária e atividade anticoagulante (SOARES et al., 2001).

A família das SVSPs é, dentro do grupo de proteínas predominantes, a menos abundante dentro dos venenos de serpentes. Porém, essa família pode ser encontrada em praticamente todas as espécies de viperídeos (TASOULIS; ISBISTER, 2017), e também estão presentes nos venenos de elapídeos e colubrídeos (SERRANO; MAROUN, 2005). Dentro do gênero *Bothrops*, essa família pode representar até 15% das proteínas totais do veneno (SOUSA et al., 2013). Essas enzimas são caracterizadas por um mecanismo catalítico que inclui um resíduo de serina altamente reativo, que possui um papel chave

na formação do complexo enzimático e que é estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico (SERRANO; MAROUN, 2005). As SVSPs possuem ações farmacológicas principalmente relacionadas à hemostasia, agindo em componentes da cascata de coagulação, que incluem atividade trombina-símile, ativação do fator V, ativação da proteína C, fibrinogenólise, ativação do plasminogênio, indução da agregação plaquetária, atividade calicreína-símile, o que gera a liberação da bradicinina aumentando assim a permeabilidade vascular e leva à hipotensão (MENALDO et al., 2013; PÉREZ et al., 2007).

1.3. Mecanismos relativos à variação na composição dos venenos

A composição variável do veneno é observada ao nível de gênero, espécie, subespécie, população e individual, o que garante a esses animais a capacidade de se adaptar a diferentes nichos ecológicos. O mecanismo que gera essa diversidade de proteínas é ainda pouco entendido, mas parece estar envolvido com reorganização genômica e alterações na codificação dos genes e nos padrões de expressão de toxinas (GUTIÉRREZ et al., 2017). Estudos demonstram de forma consistente que há grandes variações na composição dos venenos de serpentes entre diferentes espécies e mesmo dentro de uma mesma espécie. Esses estudos mostram ainda que há fortes evidências que a composição do veneno pode variar de acordo com a distribuição geográfica da espécie, adaptando-se às diferentes presas (BERNARDONI et al., 2014; GIBBS et al., 2011; GONÇALVES-MACHADO et al., 2016), e, recentemente, a variação do veneno de cobras cuspideiras foi relacionado à sua utilização na defesa (KAZANDJIAN et al., 2021).

1.4.Dieta e composição de venenos

O papel da dieta na variação da composição do veneno em serpentes é um assunto muito controverso, mas de grande interesse para o estudo dos aspectos adaptativos e evolutivos das serpentes peçonhentas. A importância do tema pode ser ilustrada por um artigo publicado na revista Nature, em 1996, no qual Daltry e colaboradores propõem que a composição do veneno de indivíduos adultos da espécie *Calloselasma rhodostoma* é influenciada pela dieta desses animais (DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996). Porém,

Sassa (1999 a, b) criticou a metodologia estatística do estudo de Daltry e colaboradores (DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996), pontuando que forças microevolucionárias diferentes da seleção natural também devem ser consideradas como uma fonte de variação na composição dos venenos (SASA, 1999a, 1999b; WÜSTER; DALTRY; THORPE, 1999).

Mesmo após mais de 20 anos da publicação de Daltry e colaboradores (DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996), a relação entre a dieta das serpentes e a composição do veneno não foi elucidada. Atualmente, acredita-se que a variação na composição dos venenos permite às serpentes se especializarem em diferentes presas (BARLOW et al., 2009; DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; KORDIŠ; GUBENŠEK, 2000; LISTER et al., 2017). Para suportar essa hipótese, alguns estudos demonstram que o veneno de algumas serpentes é mais letal para as presas naturais em comparação com animais usados nos testes em laboratório (GIBBS; MACKESSY, 2009). Barlow e colaboradores (2009) demonstraram que o veneno do grupo *Echis coloratus*, que se alimentam exclusivamente de vertebrados, apresentam menor letalidade para artrópodes, em comparação com as outras espécies do gênero *Echis*, que se alimentam desse tipo de presa (BARLOW et al., 2009). Além disso, pode-se encontrar nos venenos toxinas específicas, mais letais para diferentes tipos de presa, como a Irditoxina (PAWLAK et al., 2009) e a Fulgimotoxina (HEYBORNE; MACKESSY, 2013), mais letais para aves e lagartos, respectivamente.

Em estudos recentes avaliando a manutenção de serpentes em cativeiro, que envolvem o controle rigoroso da dieta desses animais, observou-se pequenas mudanças na composição do veneno de *Crotalus atrox* (REX; MACKESSY, 2019) e *B. atrox* (AMAZONAS et al., 2019), demonstrando evidências que o veneno de serpentes apresenta plasticidade fenotípica. Porém nenhum desses estudos mudou efetivamente a dieta das serpentes estudadas.

Gibbs e colaboradores alimentaram serpentes adultas da espécie *Sistrurus miliarius barbouri* com diferentes tipos de presas por 26 meses e demonstraram que o veneno de serpentes mostra plasticidade com relação à dieta consumida (GIBBS et al., 2011). O veneno desses animais apresentou modificações presa-específicas na abundância relativa das suas principais famílias de toxinas, sendo que quando alimentadas com presas não comuns à espécie na natureza, a mudança na composição do veneno mostrou-se mais acentuada. Apesar da grande contribuição dos resultados desse estudo

para a área, os próprios autores propõem que para confirmar o impacto da dieta na composição do veneno seria necessário (1) considerar a presença de variações individuais entre os venenos dos diferentes espécimes em estudo; (2) variar a dieta do mesmo animal ao longo do tempo para observar se existem mudanças consistentes e reversíveis com relação à presa consumida; e (3) determinar se as alterações na composição refletem alterações funcionais, tornando o veneno mais específico para subjugar a presa consumida.

Dessa forma, esse e outros estudos (BARLOW et al., 2009; DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; GIBBS; MACKESSY, 2009; MACKESSY et al., 2006; SMILEY-WALTERS; FARRELL; GIBBS, 2017) fornecem evidências indiretas da influência da dieta na composição e atividades do veneno de serpentes, pois comparam as características do veneno de diferentes espécimes mantidos com dietas distintas e não o veneno do mesmo espécime submetido à alteração da alimentação, o que eliminaria a variação individual observada nesses animais.

1.5. Gênero Bothrops

O gênero *Bothrops* é composto por cerca de 40 espécies (ALENCAR et al., 2016) de viperídeos neotropicais que ocorrem desde o México até a Argentina (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 1996). A maior parte dessas espécies apresenta dieta generalista, ou seja, podem se alimentar de diferentes tipos de presa na natureza (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 1996). Essas espécies generalistas passam por mudança ontogenética na dieta, em que os filhotes se alimentam preferencialmente de presas ectotérmicas, enquanto os adultos preferem presas endotérmicas (ANDRADE; ABE, 2013; ANTUNES et al., 2010; DA SILVA AGUIAR et al., 2020; HATAKEYAMA, 2019; MODAHL; MUKHERJEE; MACKESSY, 2016; SALDARRIAGA et al., 2003; ZELANIS; SERRANO; REINHOLD, 2012). A mudança na preferência alimentar se reflete na composição do veneno dessas espécies (ANTUNES et al., 2010; DA SILVA AGUIAR et al., 2020; ZELANIS et al., 2010). O hábito alimentar especialista, em que os animais se alimentam do mesmo tipo de presa durante toda a vida, é raro dentro do gênero *Bothrops*, sendo encontrado apenas nas espécies *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. fonsecai*, *B. neuwiedi* e *B. insularis*, a única que é especialista em aves (MARTINS; MARQUES;

SAZIMA, 1996). Para esse estudo selecionamos *B. moojeni*, que é uma espécie generalista, e *B. alternatus*, que possuí hábito especialista.

A espécie *B. moojeni* é encontrada no cerrado brasileiro, e sua distribuição geográfica se estende desde o estado do Paraná até o Maranhão (BORGES; ARAÚJO, 1998). A espécie possui hábitos noturnos e semi-arborícolas, podendo ser encontrada em florestas de galeria e áreas úmidas (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). Em sua fase adulta podem chegar a 230 cm de comprimento, mas a maioria não atinge mais do que 160 cm (CAMPBELL; LAMAR, 2004). As fêmeas são, geralmente, maiores que os machos, demonstrando o dimorfismo sexual (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). A *B. moojeni* é considerada uma espécie com alimentação generalista e variada, incluindo anfíbios, lagartos e roedores. É demonstrado que há mudança ontogenética na dieta, com indivíduos mais jovens se alimentando preferencialmente de presas ectotérmicas enquanto indivíduos adultos se alimentam preferencialmente de presas endotérmicas (ANDRADE; ABE, 1996; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003).

A espécie *B. alternatus* possui uma larga distribuição pela América do Sul, sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil. A espécie habita florestas, habitats úmidos e zonas de alta altitude (LANARI et al., 2010; NUNES, 2006). Diferentemente da *B. moojeni*, a *B. alternatus* é uma serpente especialista, ou seja, se alimenta apenas de mamíferos durante todo o seu ciclo de vida, incluindo as serpentes mais jovens (ANDRADE; ABE, 2013; LÓPEZ; MANZANO; PRIETO, 2013).

1.6. Implicações clínicas inerentes à variação dos venenos

O soro antiofídico foi desenvolvido em 1894 (BON, 1996; GUTIÉRREZ, 2012) e desde então é o único tratamento efetivo dos efeitos sistêmicos dos acidentes com serpentes (GUTIÉRREZ et al., 2017). A existência de variação intraespecífica na composição dos venenos de serpentes tem sérias implicações na produção do soro antiofídico, já que muitas vezes o soro antiofídico pode apresentar menor eficiência (WÜSTER, 1996) e o envenenamento pode apresentar sintomas inesperados (GILLISSEN et al., 1994).

O soro antiofídico utilizado contra os acidentes botrópicos no Brasil é produzido pelo Instituto Butantan através da hiperimunização de cavalos com um *pool* de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em diferentes proporções: *B. jararaca* (50%), *B.*

alternatus (12,5%), *B. jararacuçu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e espécies do complexo neuwiedi (*B. neuwiedi*, *B. pauloensis*, *B. matogrossensis* e *B. marmoratus* – 12,5%) (CARDOSO et al., 2009). Os antivenenos são altamente específicos e, dessa maneira, só neutralizam os venenos das espécies de serpentes utilizadas na sua produção e algumas espécies próximas e/ou relacionadas (GUTIÉRREZ et al., 2017).

Alguns estudos demonstram que pode haver uma parcela de reatividade cruzada entre soro e veneno de diferentes espécies não utilizadas em sua produção, porém isso nem sempre resulta em neutralização eficiente. Rey-Suaréz e Lomonte (2020) demonstraram que há reatividade cruzada entre venenos de *Micrurus mipartitus* e *M. dumerilii*, que não são espécies utilizadas na produção dos soros antiofídicos testados, porém nenhum deles conseguiu neutralizar a letalidade do veneno de *M. mipartitus* (REY-SUÁREZ; LOMONTE, 2020). Por outro lado, Aguiar e seus colaboradores (2020) demonstraram que o veneno da espécie *B. jararacussu* apresenta reação cruzada com o soro anticrotálico (DA SILVA AGUIAR et al., 2020). No entando, por meio de *western blotting* pode-se notar que o soro anticrotálico não reconhece as PLA_2s desse veneno indicando a diferença entre isoformas da mesma família proteica (DA SILVA AGUIAR et al., 2020).

Estudos demonstram variações no reconhecimento e neutralização de veneno de serpentes à diferentes fatores, como idade (ANTUNES et al., 2010), sexo (AMORIM et al., 2018), localização geográfica (SOUSA et al., 2017), entre outros. Isso ressalta a importância da utilização de um *pool* de venenos diverso, abrangendo diferentes idades, localização geográfica e sexo das serpentes.

A Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) destaca os desafios na produção de um soro antiofídico de qualidade e segurança que inclui (i) quadros regulatórios deficientes e ausência de padrões de referência apropriados; (ii) investimento inadequado em pesquisa e desenvolvimento que permitam uma melhora na produção, segurança e eficácia dos antivenenos; (iii) ausência de especificações mínimas para a neutralização da letalidade e de atividades de toxinas específicas que refletem na efetividade clínica dos produtos; (iv) sistema tradicionalista de crenças que associam os acidentes ofídicos à fatores sobrenaturais, impedindo o tratamento adequado dos pacientes; (v) falta de treinamento adequado dos profissionais de saúde para tratar esse tipo de ocorrência; (vi) sistemas de saúde nacionais com estruturas inadequadas e

distribuição ineficiente dos antivenenos; e (vii) baixo investimento na produção de antivenenos, o que pode gerar diminuição na qualidade, aumento de preços e diminuição do acesso ao soro antiofídico (WHO, [s.d.]). Além disso, a manutenção de um plantel contendo uma variedade de espécies de serpentes, para a produção de um veneno de qualidade para a produção do soro antiofídico, leva tempo e exige profissionais capacitados para o manejo com segurança dos animais (FERNANDES GREGO et al., 2021).

Dessa maneira, novos tratamentos estão sendo propostos para complementar o soro antiofídico, em especial para tentar neutralizar os efeitos locais dos venenos de serpentes, já que o soro atual é pouco eficaz para combatê-los. Há estudos que utilizam nanocorpos, que são pequenas proteínas de aproximadamente 15 kDa que representam a menor parte intacta de um fragmento que se liga ao antígeno, com resultados promissores na neutralização da atividade hemorrágica e miotóxica do veneno de *B. atrox* (BAILON CALDERON et al., 2020).

Procura-se também pequenas moléculas com capacidade de inibir algumas toxinas do veneno como o varespladib, um conhecido inibidor de PLA_2s, capaz de neutralizar com eficiência a atividade anticoagulante dessa família de proteínas (ALBULESCU et al., 2020; XIE et al., 2020). Além disso, Albulesco e seus colaboradores (2020) demonstraram que a associação de varespladib com marismastat (um inibidor de SVMP) conseguiu neutralizar a letalidade do veneno de cinco espécies de serpentes (ALBULESCU et al., 2020), demonstrando que novos tratamentos para o acidente ofídico podem ser associado ao tratamento já existente. Somado a isso, a busca por inibidores em animais que apresentam resistência ao envenenamento pode levar a novas drogas. A descoberta de um inibidor de PLA_2 do tipo gama em plasma de serpentes peçonhentas (*B. jararaca*) (SERINO-SILVA et al., 2018) e não peçonhentas (*Boa constrictor*) (BITTENCOURT RODRIGUES et al., 2020) com potencial inibitório em atividades edematogênica, miotóxica e catalítica demonstram a importância da ciência básica na busca de novos medicamentos.

O estudo proteômico de venenos de serpentes e a identificação e caracterização das suas toxinas é uma área de grande importância não só ecológica e evolutiva, mas também médica, considerando que as toxinas com maior atividade incapacitante na presa são também, em geral, as que possuem maior importância no contexto do envenenamento

humano. Logo, investigar as bases moleculares relacionadas com a adaptação de serpentes ao seu ambiente natural pode ajudar na identificação dessas importantes toxinas e levar ao desenvolvimento de terapias mais eficientes contra o envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 2017). Além disso, o estudo e a caracterização de toxinas de venenos de serpentes podem contribuir para a identificação de biomoléculas com potencial biotecnológico e/ou o desenvolvimento de novos fármacos.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Considerando a necessidade de evidências diretas da relação da dieta das serpentes com a composição do veneno, o objetivo deste trabalho é investigar a influência da dieta na composição e nas atividades bioquímicas e biológicas do veneno das serpentes das espécies *B. moojeni* (generalista) e *B. alternatus* (especialista) mantidas no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

2.2.Objetivos específicos

- Avaliar a dieta como um fator de modificação do veneno das serpentes.
- Identificar as famílias de proteínas que se alteram com a mudança da dieta.
- Investigar como as alterações afetam as atividades enzimáticas e funcionais dos venenos.

3. Materiais e métodos

3.1. Aprovação pela Comissão de Ética

Os camundongos utilizados nos experimentos foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os anfíbios utilizados na alimentação e no ensaio de dose letal foram comprados do Ranário Santa Clara. Os protocolos experimentais envolvendo a utilização de animais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (protocolos número 1949030915 e 9341230718).

3.2.Camundongos

Foram utilizados para os experimentos *in vivo* camundongos machos da linhagem Swiss pesando de 18 a 22 g. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan.

3.3. Anfíbios – Lithobates catesbeianus

Foram utilizados para os experimentos *in vivo* (dose letal 50%) e para a alimentação das serpentes, anfíbios da espécie *Lithobates catesbeianus*, conhecida popularmente como rã-touro. Todos os animais foram comprados do Ranário Santa Clara. Essa espécie foi escolhida por ser facilmente encontrada em ranários.

A rã-touro é nativa do leste dos Estados Unidos e Canadá, mas foi transportada ao redor do mundo no último século para consumo humano. Essa espécie é predadora generalista, mostra grande fecundidade e são fortes competidores, todas características típicas de espécies invasoras. Na América do Sul há relatos da presença de populações invasoras de rã-touro na Argentina, Colômbia, Equador, Uruguai, Venezuela e Brasil (BOTH et al., 2011). Foi demonstrado por Ficetolla e colaboradores (2007) e Giovanelli e colaboradores (2008) que as condições climáticas nas florestas do Atlântico Sul são favoráveis para o estabelecimento dessa espécie (FICETOLA; THUILLER; MIAUD, 2007; GIOVANELLI; HADDAD; ALEXANDRINO, 2008).

3.4. Serpentes

As serpentes das espécies *B. moojeni* e *B. alternatus* são mantidas nas salas de produção de venenos, em gaiolas plásticas individualizadas, com papelão corrugado e água *ad libitum*. Para aumentar a segurança do extrator, diminuir o estresse dos animais e reduzir o desperdício de veneno devido a botes desnecessários, as serpentes são submetidas, individualmente, a ambiente saturado de dióxido de carbono por aproximadamente 5 minutos. Esta metodologia é utilizada desde 1989 e é aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB 7967310720). A extração de veneno é realizada individualmente, em microtubos de 1,5 mL. Após a extração, álcool iodado 2% é aplicado nas presas para evitar infecções. As serpentes do

plantel são alimentadas exclusivamente com mamíferos (camundongos/ratos) em quantidade equivalente a 20% do seu peso vivo, uma vez ao mês.

3.5. B. moojeni

Foram selecionados 10 espécimes de *B. moojeni*, 5 machos e 5 fêmeas, mantidos no plantel do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan por, no mínimo, 3 anos e alimentados exclusivamente com mamíferos. Todos os animais utilizados eram adultos. Esses animais tiveram sua dieta alterada para anfíbios (*L. catesbeianus*, ou rã-touro) pelo período de 12 meses e foram alimentados quinzenalmente, em quantidade equivalente a 20% do seu peso. A frequência de alimentação foi aumentada considerando-se que anfíbios são menos nutritivos do que mamíferos. Os venenos foram extraídos a cada 2 meses, até completar 6 extrações, equivalendo a um ano de mudança de alimentação.

Após um ano de alimentação com anfíbios, os espécimes de *B. moojeni* foram alimentados novamente com ratos e/ou camundongos, em quantidade equivalente a 20% do seu peso vivo, uma vez ao mês. Os venenos foram extraídos a cada 2 meses, até completar 6 novas extrações, equivalendo a um ano de retorno da alimentação com a dieta original.

Tabela 1. Relação das serpentes da espécie *B. moojeni* utilizadas para esse estudo.

B. moojeni			
Número	**Sexo**	**Ano de chegada**	**Procedência**
Bm 1	M	Nascida em cativeiro	-
Bm 2	M	Nascida em cativeiro	-
Bm 3	M	Nascida em cativeiro	-
Bm 4	M	2009	Chapada dos Guimarães – MT
Bm 5	M	Nascida em cativeiro	-
Bm 6	F	2013	Araraquara – SP
Bm 7	F	2009	Chapada dos Guimarães – MT
Bm 8	F	2012	Cajuru – SP
Bm 9	F	2011	Vale São Domingos – MT
Bm 10	F	2014	Nuporanga - SP

3.6. B. alternatus

Foram selecionados 10 espécimes de *B. alternatus*, 5 machos e 5 fêmeas, mantidos no plantel do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan por, no mínimo, 3 anos

e alimentados exclusivamente com camundongos e/ou ratos. Todos os animais utilizados eram adultos. Esses animais tiveram sua dieta alterada para anfíbios (*L. catesbeianus*) pelo período de 12 meses e foram alimentados quinzenalmente, em quantidade equivalente a 20% do seu peso. Os venenos foram extraídos a cada 2 meses, até completar 6 extrações, equivalendo a um ano de mudança de alimentação.

Após um ano de alimentação com anfíbios, as serpentes selecionadas voltaram a ser alimentadas com mamíferos (ratos e/ou camundongos), em quantidade equivalente a 20% do seu peso, uma vez ao mês. As extrações dos venenos foram realizadas uma vez a cada 2 meses nesse período, até completar 6 novas extrações, equivalendo a um ano de retorno com a dieta original.

Tabela 2. Relação das serpentes da espécie *B. alternatus* utilizadas para esse estudo.

B. alternatus			
Número	Sexo	Ano de chegada	Procedência
Ba 1	M	2016	Araraquara – SP
Ba 2	M	2016	Araraquara – SP
Ba 3	M	2017	Araraquara – SP
Ba 4	F	2015	Araraquara – SP
Ba 5	F	2016	Araraquara – SP
Ba 6	F	2016	Araraquara – SP
Ba 7	F	2018	Araraquara – SP
Ba 8	M	2018	Araraquara – SP
Ba 9	M	2018	Araraquara – SP
Ba 10	M	2018	Araraquara – SP

3.7.Venenos

Os venenos foram obtidos por meio da extração manual conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (FERNANDES GREGO et al., 2021). Após a extração, os venenos foram centrifugados a 1.700 x g por 15 minutos a 4 ºC. Uma alíquota de cada veneno foi retirada e armazenada a -20 ºC para dosagem de proteínas no veneno líquido e o restante foi liofilizado e armazenado nas mesmas condições até o momento da análise. Nomeou-se “veneno inicial” a extração zero, antes da mudança de alimentação; “veneno final 1” a sexta extração, após 12 meses de mudança de alimentação; e “veneno final 2” a extração 12, após um ano de retorno à alimentação com mamíferos. Todos os venenos foram avaliados individualmente, exceto nos ensaios

in vivo, devido à inviabilidade do número de camundongos necessário para a realização desses experimentos. Os ensaios *in vivo* foram realizados com *pools* de venenos, compostos por quantidades iguais de veneno dos diferentes indivíduos.

3.8. Caracterização da composição proteica dos venenos

3.8.1. Dosagem de proteínas

O veneno líquido foi diluído em solução salina 0,85% na proporção 1 para 400 ou 1 mg de veneno liofilizado foi ressuspendido em 1 mL de solução salina 0,85% e o conteúdo proteico das amostras foi determinado utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976), com o reagente Bio-Rad *Protein Assay* (Bio-Rad). A determinação da concentração de proteínas foi realizada através de uma curva-padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) como padrão.

3.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As amostras dos venenos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, de acordo com Laemmli (LAEMMLI, 1970). Por canaleta, foram aplicados 20 μg de proteína diluídos em tampão de corrida com beta-mercaptoetanol. Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Coomassie G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

3.8.3. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para avaliação do perfil proteico dos venenos

O perfil proteico dos venenos também foi analisado por meio de HPLC. Para o fracionamento das proteínas do veneno, foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Teknokroma Europa – 0,4 cm x 25 cm, partículas de 5 μm, e poros de 300 Å), em sistema Jasco. Setenta e cinco microgramas dos venenos foram aplicados no sistema. As proteínas e peptídeos foram separados por meio de um gradiente de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água (solução A) e de TFA 0,1% em acetonitrila 95% (solução B), sendo 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos.

3.8.4. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para coleta das frações do veneno de B. alternatus

Os venenos foram fracionados em coluna cromatográfica de fase reversa C_{18} (Teknokroma Europa – 0,4 cm x 25 cm, partículas de 5 µm, e poros de 300 Å), em sistema Äkta (GE Healthcare), como descrito por Calvete e colaboradores (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007). Para isso, 500 µg dos venenos foram ressupendidos em 500 µL de solução A (TFA, 0,1% em água). A amostra foi então centrifugada a 13.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi aplicado na coluna, equilibrada previamente com a mesma solução em fluxo de 1 mL/min e detecção UV em 215 nm. As proteínas e peptídeos foram separados por meio de um gradiente crescente de solução B (TFA 0,1% em acetonitrila 95%), sendo 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. Frações de 1 mL foram coletadas para posterior análise com SDS-PAGE, de acordo com metodologia já descrita no item *3.6.2*. As frações foram secas em *Speed Vac* e ressuspendidas em 10 µL de tampão de corrida com beta-mercaptoetanol.

3.8.5. Análise proteômica – B. moojeni

A análise proteômica dos venenos de *B. moojeni* foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Alexandre Keiji Tashima, no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As análises foram realizadas com o veneno individual de 6 espécimes de *B. moojeni* nos três momentos diferentes (venenos inicial, final 1 e final 2), de acordo com o protocolo descrito a seguir.

Cem microgramas de veneno foram dissolvidos em 50 µL de bicarbonato de amônio 50 mM. Em seguida, foram adicionados 25 µL de RapiGest 0,2% (Waters) e a mistura foi incubada a 80 ºC por 15 minutos. As amostras foram reduzidas com ditiotreitol (DTT) em concentração final de 5 mM por 30 minutos a 60 ºC e então alquiladas com iodoacetamida (IAA) em concentração final de 10 mM incubadas no escuro por 30 minutos. As proteínas foram digeridas utilizando-se tripsina (Promega) na proporção 1:100 (enzima:substrato), a 37 ºC *overnight*. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de TFA 5% e incubação a 37 ºC por 45 minutos. As amostras foram filtradas em

filtros Millex-GV 0,22 µm (Millipore) e a concentração proteica final foi ajustada para aproximadamente 2,5 µg/µL.

A análise dos peptídeos foi realizada em espectrômetro de massas Synapt G2 (Waters) acoplado a um sistema de *ultra-high performance liquid chromatography* (UPLC) (Waters). Aproximadamente 12,5 µg da mistura peptídica foram aplicados em coluna *trap* Symmetry C18 (partículas de 5 µm, 180 µm x 20 mm de comprimento) (Waters), em fluxo de 8 µL/min, utilizando-se ácido fórmico 0,1% (solução A).

Os peptídeos foram retidos pela coluna *trap* (*nanoeasy* BEH C18 de 1 mm d.i. x 25 mm) para dessalinização com solução A a 8 µL/min por 5 min e subsequentemente separados utilizando-se uma coluna analítica C18 (Acquity HSS T3 300 µm x 150 mm) (Waters) por um gradiente de 7 a 35% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (solução B) por 60 minutos, em fluxo de 3 µL/min.

A aquisição de dados foi realizada no modo independente UDMSE com separação da mobilidade iônica na região de m/z entre 50 e 2.000. As energias de colisão foram alternando-se entre os modos de baixa energia (4 eV) e de alta energia de colisão com rampa de 19-45 eV utilizando-se tempos de *scan* de 1 segundo. A fonte de ESI (*electron spray ionization*) foi operada no modo positivo com a voltagem do capilar de 3,0 kV, temperatura de 100 ºC e voltagem do cone de 40 V. Para a calibração de massas, uma solução de [Glu1]-Fibrinopeptídeo B (500 fmol/mL em acetonitrila 50% e ácido fórmico 0,1%) (Peptide 2.0) foi infundida por meio do *spray* de referência em fluxo de 0,5 µL/min e amostrada a cada 60 segundos. As amostras de veneno foram analisadas em duplicatas técnicas.

Os dados brutos foram processados pelo servidor ProteinLynx 3.0.3 (Waters) e as buscas no banco de dados UniprotKB/Swissprot foram realizadas utilizando-se sequências de *Bothrops* não revisado (www.uniprot.org, 896 sequências). Os seguintes parâmetros foram utilizados: tolerâncias automáticas para os íons precursor e fragmento; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa; oxidação da metionina, acetilação do N-terminal, deamidação da glutamina e asparagina como modificações variáveis; e dois sítios de clivagem perdidos pela digestão da tripsina. As identificações das proteínas foram consideradas com no mínimo 1 fragmento iônico por peptídeo, 5 fragmentos iônicos por proteína, 2 peptídeos por proteína e uma taxa de identificação

falsa de 1% (*false discovery rate*), estimada pela busca simultânea contra um banco de dados com sequências reversas (PEDROSO et al., 2017). A quantificação *label-free* foi realizada utilizando-se o programa ISOQuant (DISTLER et al., 2016), considerando as intensidades médias dos três peptídeos mais intensos de cada proteína identificada (SILVA et al., 2006). A significância das proteínas diferentemente abundantes entre os grupos foi determinada pelo teste t de Student, considerando $p<0,05$.

3.9. Caracterização enzimática dos venenos

3.9.1. Atividade proteolítica

3.9.1.1. Atividade caseinolítica

A atividade proteolítica sobre a caseína foi determinada conforme descrito por Wang e Huang (WANG; HUANG, 2002) e Jimenez-Charris (JIMÉNEZ-CHARRIS et al., 2015), com algumas modificações. Alíquotas de 85 µL de uma solução de azocaseína 4,25 mg/mL foram adicionadas a 10 µL de solução de veneno 1 mg/mL, ambos solubilizados em tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15M, $CaCl_2$ 5 mM, pH 8,0. A mistura foi incubada por 90 minutos a 37 ºC. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1.700 x g por 5 minutos. Cem µL do sobrenadante foram adicionados a 100 µL de solução de NaOH 0,5 M em microplaca e a absorbância foi mensurada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices), utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de veneno que causa um aumento de 0,005 unidade de absorbância por minuto. A atividade específica foi expressa como unidades por miligrama de veneno por minuto (U/mg/min). Os ensaios foram realizados em triplicatas experimentais.

3.9.1.2.Atividade proteolítica sobre o colágeno na presença e ausência de inibidor de SVMP (EDTA)

A atividade proteolítica utilizando o substrato de gelatina de pele de porco (DQ™ *from pig skin, fluorescein conjugate*, ThermoFisher, D12054), foi realizada segundo as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Brevemente, 10 µL de veneno solubilizado em solução salina 0,85% (1 mg/mL) foram previamente incubados com 5 µL

de tampão de reação (Tris-HCl 0,5 M; NaCl 1,5 M; $CaCl_2$ 50 mM; azida de sódio 2 mM) ou EDTA 25 mM por 15 minutos a 37 ºC. Posteriormente foram adicionados 10 µL de gelatina (1 mg/mL) e 185 µL de tampão de reação. A mistura foi incubada por 1 hora a 37 ºC, com leituras de absorção a 495 nm e emissão a 515 nm, em intervalos de 15 minutos. A atividade foi expressa pelo valor da leitura da absorbância em cinética ou *endpoint*.

3.9.2. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada de acordo com Holzer e Mackessy (MACKESSY; HOLZER, 1996). Em placas de microtitulação, 40 µg de veneno ressuspendido em solução salina 0,85% (40 µL) foram incubados com tampão Tris-HCl 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0 (200 µL) e com o substrato NOBA (ácido 4-nitro-3-[octanoyloxy] benzoico 4,16 mM diluído em acetonitrila) (20 µL) por 60 minutos a 37 ºC. A absorbância da reação foi mensurada a cada 20 minutos 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. A atividade específica foi expressa como nmoles de cromóforo produzidos por mg de veneno por minuto (nmoles/mg/min). Os ensaios foram realizados em triplicatas experimentais.

3.9.3. Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO)

A atividade de LAAO foi determinada de acordo com Kishimoto e Takahashi (KISHIMOTO; TAKAHASHI, 2001). Em placas de microtitulação, 10 µg de veneno ressuspendido em solução salina 0,85% (10 µL) foram incubados com uma solução reativa composta por L-metionina 250 mM, o-phenilenediamine (OPD) 2 mM e peroxidase de rábano 0,8 U/mL em tampão Tris 50 mM, pH 8,0 (90 µL) por 60 minutos a 37 ºC. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H_2SO_4 2 M. A absorbância da reação foi mensurada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices) utilizando-se o comprimento de onda de 492 nm. A determinação da atividade de LAAO foi realizada por meio da quantidade de peróxido de hidrogênio produzido (H_2O_2), utilizando-se uma curva de H_2O_2 (Merck) como padrão. A atividade específica foi

expressa como µM de H_2O_2 liberadas por miligrama de proteína por minuto (µM de H_2O_2/mg/min). Os ensaios foram realizados em triplicatas experimentais.

3.10. Caracterização das atividades fisiopatológicas dos venenos

3.10.1. Atividade coagulante

A Dose Mínima Coagulante (DMC) é definida como a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de fibrinogênio ou plasma citratado em 60 segundos a 37 ºC (THEAKSTON; REID, 1983). Cinquenta microlitros das diluições dos venenos foram incubadas com 50 µL de $CaCl_2$ 25 mM por 2 min, seguindo protocolo de Debono e colaboradores (2019) (DEBONO et al., 2019). O tempo de coagulação foi obtido adicionando-se 100 µL de plasma humano, mantido a 37 ºC. O tempo de coagulação foi mensurado usando o coagulômetro MaxCoag. Os ensaios foram realizados em triplicata e a análise da regressão dos dados (concentração de veneno x tempo de coagulação) foi realizada utilizando-se o programa Microsoft Excel. A DMC foi expressa como µg de veneno por mL.

3.10.2. Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi avaliada por meio do método de Kondo e colaboradores (KONDO et al., 1960) modificado por Gutiérrez e colaboradores (GUTIÉRREZ et al., 1985). Grupos de 5 camundongos Swiss (machos, pesando entre 18 e 22 g) foram inoculados com 100 µL de veneno em diferentes concentrações, via intradérmica, na região abdominal. Após 3 horas os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2, o tecido abdominal foi removido e a área hemorrágica foi avaliada utilizando-se o programa ImageJ. A dose mínima hemorrágica (DMH) foi definida como a mínima quantidade de veneno capaz de produzir uma área hemorrágica de 10 mm^2. A análise da regressão dos dados (concentração de veneno x área hemorrágica) foi realizada utilizando-se o programa Microsoft Excel.

3.10.3. Atividade edematogênica

A atividade edematogênica dos venenos foi avaliada utilizando o modelo de edema de pata. Para isso, 1 µg de veneno, diluído em 50 µL de solução salina 0,85% estéril, foi injetado no tecido subcutâneo do coxim plantar da pata posterior direita de

camundongos Swiss (machos, pesando entre 18 e 22 g). Cada grupo experimental foi constituído por 5 animais. Como controle, a pata contralateral foi injetada com 50 µL de solução salina 0,85% estéril. O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro digital, antes (0) e 1, 2, 4, 6 e 24 horas após a injeção do veneno. Para cada tempo avaliado, o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata, calculada pela fórmula:

$$E\% = \frac{EF - EI}{EI} x100, sendo$$

E%: aumento percentual da espessura da pata;
EI: espessura inicial da pata;
EF: espessura da pata após os animais receberem os tratamentos.

O resultado final foi obtido pela diferença entre a espessura da pata injetada com veneno e a espessura da pata controle, injetada com solução salina estéril.

3.10.4. Dose letal

Para a determinação da dose letal 50% (DL_{50}), grupos de 5 camundongos Swiss (machos, pesando entre 18 e 22 g) ou grupos de 5 rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*, pesando entre 10 e 60 g) receberam, via intraperitoneal e via intracelomática, respectivamente, solução de veneno em diferentes concentrações, diluídos em solução salina 0,85% estéril (de 2,5 a 12,6 µg/g para camundongos; e de 50,3 a 143,7 µg/g para anfíbios). O número de animais mortos para cada dose dos venenos foi observado por um período de 48 horas. A DL_{50} foi calculada pela análise de probitos (FINNEY, 1971), utilizando-se o número total de animais mortos por dose dos venenos durante o período de observação (VILLARROEL et al., 1978). O tempo que os animais levaram para morrer também foi avaliado seguindo a metodologia de Smiley-Walters e colaboradores (SMILEY-WALTERS; FARRELL; GIBBS, 2017).

3.10.5. Atividade miotóxica

A atividade miotóxica dos venenos foi determinada como descrito por Dos-Santos (DOS-SANTOS et al., 1992). Grupos de 5 de camundongos Swiss (machos, pesando entre 18 e 22 g) foram injetados via intramuscular (músculo gastrocnêmio direito) com 40 µg de veneno, diluídos em 100 µL de salina 0,85% estéril. Os camundongos do grupo

controle receberam 100 μL de salina. Três horas após a injeção, os camundongos foram sangrados pela cauda e o sangue coletado em tubos com EDTA 1%. A atividade da enzima creatinoquinase foi quantificada utilizando-se o kit Bioclin CK NAC UV-K010 conforme indicações do fabricante. Uma unidade de CK foi definida pela média das diferenças dos valores de absorbância por minuto multiplicado pela constante 8095, conforme indicação do fabricante. A atividade miotóxica foi expressa em U/L.

3.11. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (S.D.M.). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 8.0.2. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

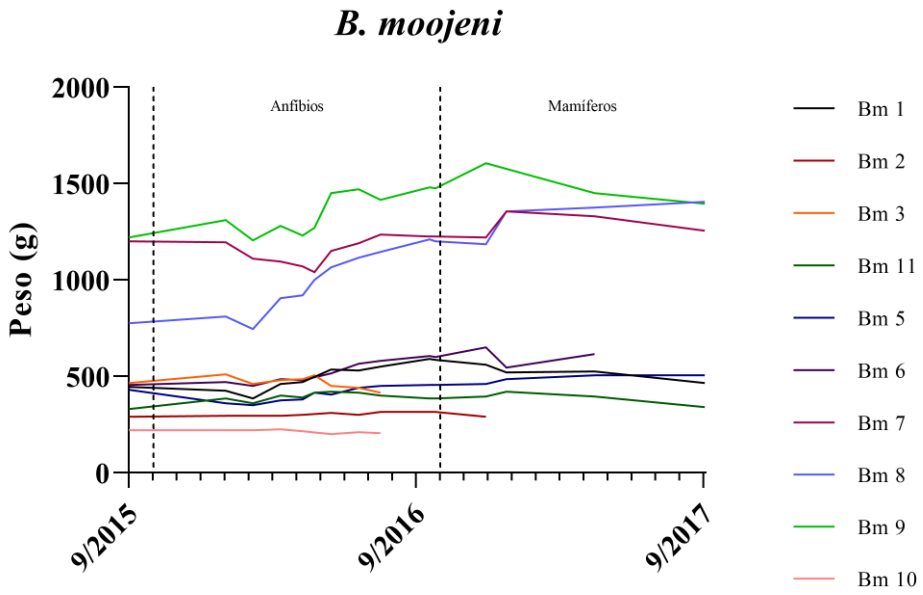
4. Resultados

4.1. B. moojeni

4.1.1. Serpentes

As serpentes *B. moojeni* não apresentaram problemas de saúde durante a alimentação forçada com anfíbios (cabe ressaltar que a manutenção das serpentes no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan é acompanhada rotineiramente por médicos veterinários). A figura 1 demonstra a variação do peso (em gramas) das serpentes utilizadas no experimento ao longo do tempo. Como pode-se observar todas as serpentes apresentaram manutenção da massa, sem ganhos ou perdas significativos. Os dados de alimentação com anfíbios e o retorno à alimentação com mamíferos demonstram evoluções semelhantes do crescimento dos animais.

Figura 1. Variação da massa das serpentes *B. moojeni* ao longo do tempo. A alimentação com anfíbios da espécie *L. catesbeianus* se iniciou em outubro de 2015 e foi finalizada em outubro de 2016. As serpentes Bm 3 e Bm 10 morreram antes do final da alimentação com anfíbios. Apenas 6 indivíduos sobreviveram até o final do retorno com alimentação baseada em mamíferos.

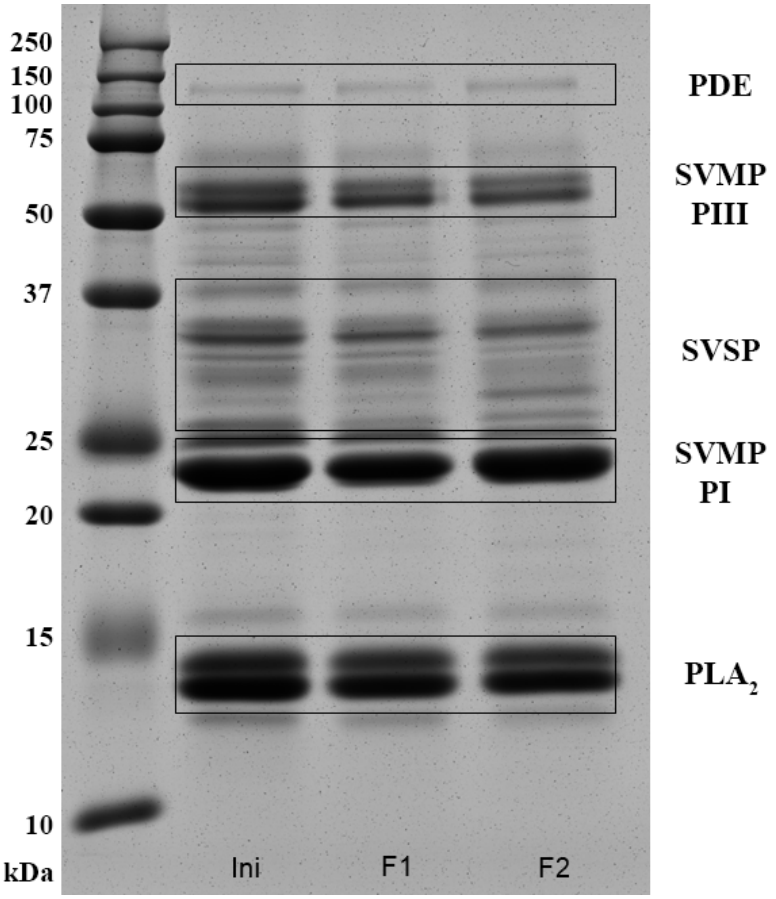


4.1.2. Caracterização do perfil proteico dos venenos

4.1.2.1. SDS-PAGE

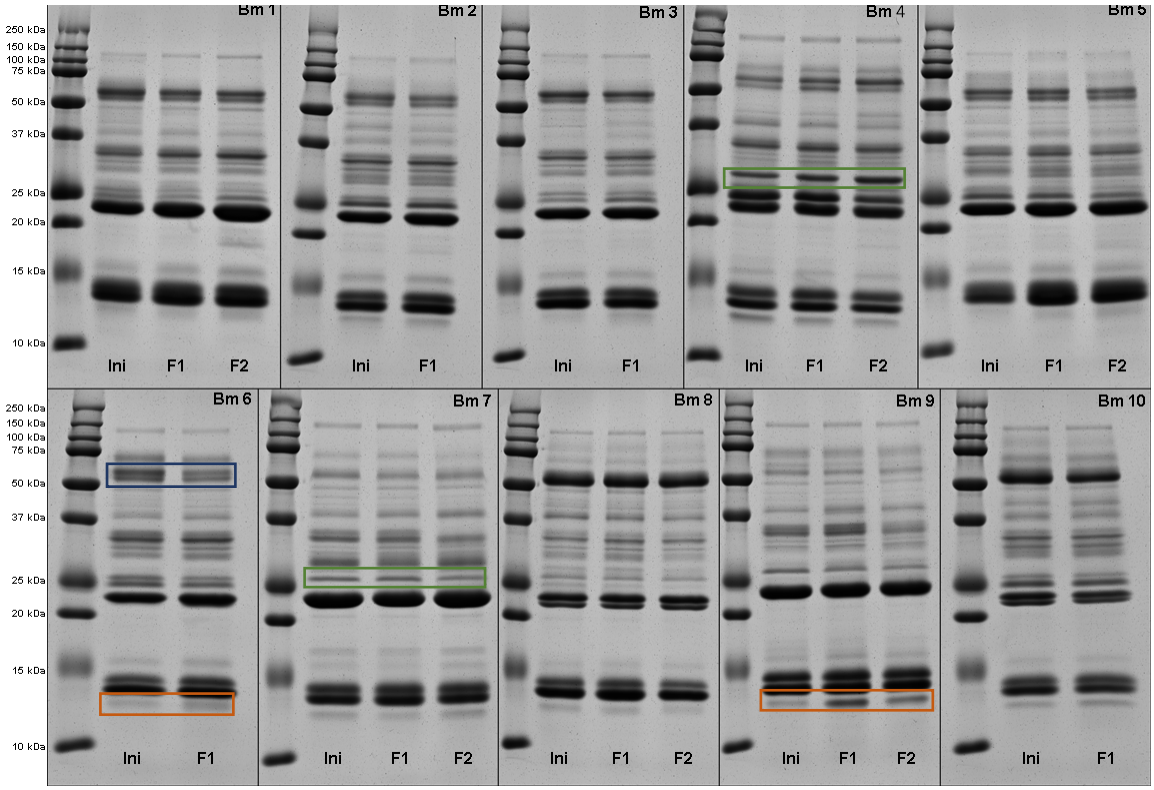
Os perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE demonstraram pouca variação entre os venenos inicial, final 1 e final 2. A figura 2 representa o perfil eletroforético dos *pool*s dos venenos inicial, final 1 e final 2 com as indicações das principais famílias de toxinas encontradas no veneno botrópico. A associação das massas moleculares nas eletroforeses e dos picos obtidos no HPLC com as famílias de toxinas foi realizada tendo como referência o veneno de *B. jararaca* (GONÇALVES-MACHADO et al., 2016; ZELANIS et al., 2011), além de utilizar a análise proteômica realizada neste trabalho e outra descrita por Hatakeyama, em 2019 (HATAKEYAMA, 2019). Cabe ressaltar que apesar das particularidades de cada veneno, as famílias de toxinas que compõem os venenos botrópicos são praticamente as mesmas nos venenos caracterizados até o momento (CALVETE et al., 2011; JORGE et al., 2015; ÖHLER et al., 2010; TASHIMA et al., 2008).

Figura 2. SDS-PAGE dos pools de veneno de *B. moojeni* nos três momentos referentes à mudança na alimentação: Inicial (Ini), final 1 (F1) e final 2 (F2). Foram aplicados 20 µg de proteínas por canaleta, em condições redutoras, em gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad. PDE: fosfodiesterase, SVMP PI/P-III: metaloproteases P-I/P-II; SVSP: serinoproteases; PLA_2: fosfolipase A_2.



Os géis dos venenos individuais (figura 3) também apresentaram poucas modificações que podem ter sido causadas pela mudança na dieta. Nos indivíduos Bm 1, Bm 2 e Bm 5, a banda de ~15 kDa parece aumentar sutilmente a intensidade ao longo do tempo. No indivíduo Bm 6 uma banda entre 50 e 75 kDa (marcado com um retângulo azul na figura 3) parece diminuir de intensidade, enquanto no indivíduo Bm 4, essa mesma região parece aumentar de intensidade. Já nos indivíduos Bm 6 e Bm 9, podemos observar um aumento de intensidade em uma banda abaixo de 15 kDa no veneno final 1, seguido por uma leve diminuição no veneno final 2 (marcado com um retângulo laranja na figura 3). Essa mesma banda também parece alterada no veneno Bm 4, porém com leve diminuição na intensidade nos venenos final 1 e final 2. Essas bandas presentes na região que compreende entre 10 e 15 kDa estão associadas às PLA_2 e lectinas do tipo C (CTL) (GONÇALVES-MACHADO et al., 2016; JORGE et al., 2015).

Figura 3. SDS-PAGE dos venenos individuais das serpentes da espécie B. moojeni nos três momentos de mudança na alimentação: Inicial (Ini), Final 1 (F1) e Final 2 (F2). Foram aplicados 20 µg de proteínas do veneno por canaleta, em condições redutoras, em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad.

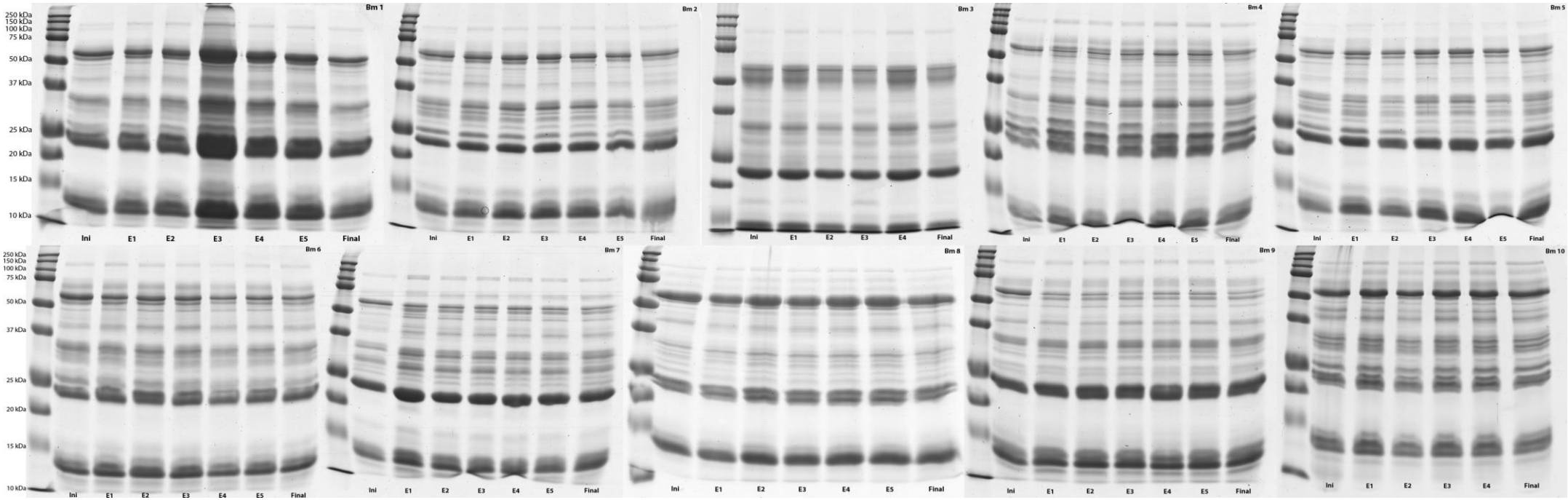


Apesar das alterações sutis em algumas bandas proteicas dos venenos possivelmente resultantes da mudança na dieta, os géis individuais são importantes para apontar a grande variação individual presente na espécie *B. moojeni*. Pode-se observar na região entre 50 e 75 kDa, onde as SVMP-PIII são mais abundantes, uma variação marcante entre os indivíduos. Em especial, os indivíduos Bm 8 e Bm 10 apresentam uma banda intensa nessa região, enquanto os demais indivíduos apresentam bandas mais sutis. A região das SVSP (entre 25 e 50 kDa) também apresenta variação entre os indivíduos, sendo a mais notável a banda logo acima de 25 kDa (marcada com retângulo verde na figura 3), presente nos indivíduos Bm 4 e Bm 7 e ausente nos demais. A banda presente entre 20 e 25 kDa parece ser a mais conservada entre os indivíduos, porém nos indivíduos Bm 4, Bm 8 e Bm 10 aparecem duas bandas ao invés de somente uma.

Para observar de forma mais detalhada se houve alguma alteração no perfil eletroforético dos venenos, todas as extrações de cada indivíduo também foram avaliadas

por meio de SDS-PAGE (figura 4). Assim como observado na figura 3, as alterações entre as extrações são muito sutis.

Figura 4. SDS-PAGE dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. moojeni* em todas as extrações da alimentação baseada em anfíbios. Foram aplicados 20 µg de veneno por canaleta, em condições redutoras, em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad.



4.1.2.2. RP-HPLC

Com o objetivo de complementar a análise por SDS-PAGE, optou-se por analisar os perfis cromatográficos individuais, comparando o mesmo indivíduo nos três momentos de mudança de alimentação, os quais estão representados na figura 5 e 6. Não é possível observar diferenças significativas entre os venenos inicial, final 1 e final 2. Apenas uma mudança sutil foi observada na região eluída logo após 75 minutos nos indivíduos Bm 1, Bm 2, Bm 5 e Bm 6, em que o primeiro pico parece diminuir ao longo das extrações.

Com base em Sousa e colaboradores (2013) (SOUSA et al., 2013), que estudaram perfis cromatográficos de diversas espécies do gênero *Bothrops*, foi possível correlacionar os perfis da *B. moojeni*, identificando quais famílias de proteínas representam, majoritariamente, cada pico. O perfil cromatográfico do veneno de *B. moojeni* é semelhante ao perfil de outros venenos botrópicos, com uma grande quantidade de metaloproteases (SVMP) eluindo no final da corrida cromatográfica (SOUSA et al., 2013). O RP-HPLC também demonstrou a grande variação intraespecífica da espécie. A região com tempo de eluição de até 25 minutos representa a família das disintegrinas e parece bem conservada nos 10 indivíduos. No tempo de eluição de 45 minutos há uma pequena variação entre os indivíduos. Todos os indivíduos possuem 2 picos nessa região, exceto o Bm 4 que possui apenas 1 pico. A região compreendida entre 50 e 75 minutos de eluição também apresenta muita variação entre os indivíduos, podendo apresentar um (Bm 9), dois (Bm 6 e Bm 8) ou quatro picos principais, sendo o último fenótipo o mais comum. Após 75 minutos de eluição, a família das SVMP é dominante e apresenta grande variação entre os indivíduos, podendo apresentar um (Bm 1, Bm 2, Bm 3, Bm 5, Bm 6 e Bm 7), dois (Bm 9) ou três picos (Bm 8, Bm 10 e Bm 4) majoritários.

Figura 5. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. moojeni* nos três momentos de mudança na alimentação (Inicial, Final 1 e Final 2). Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 500 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215.

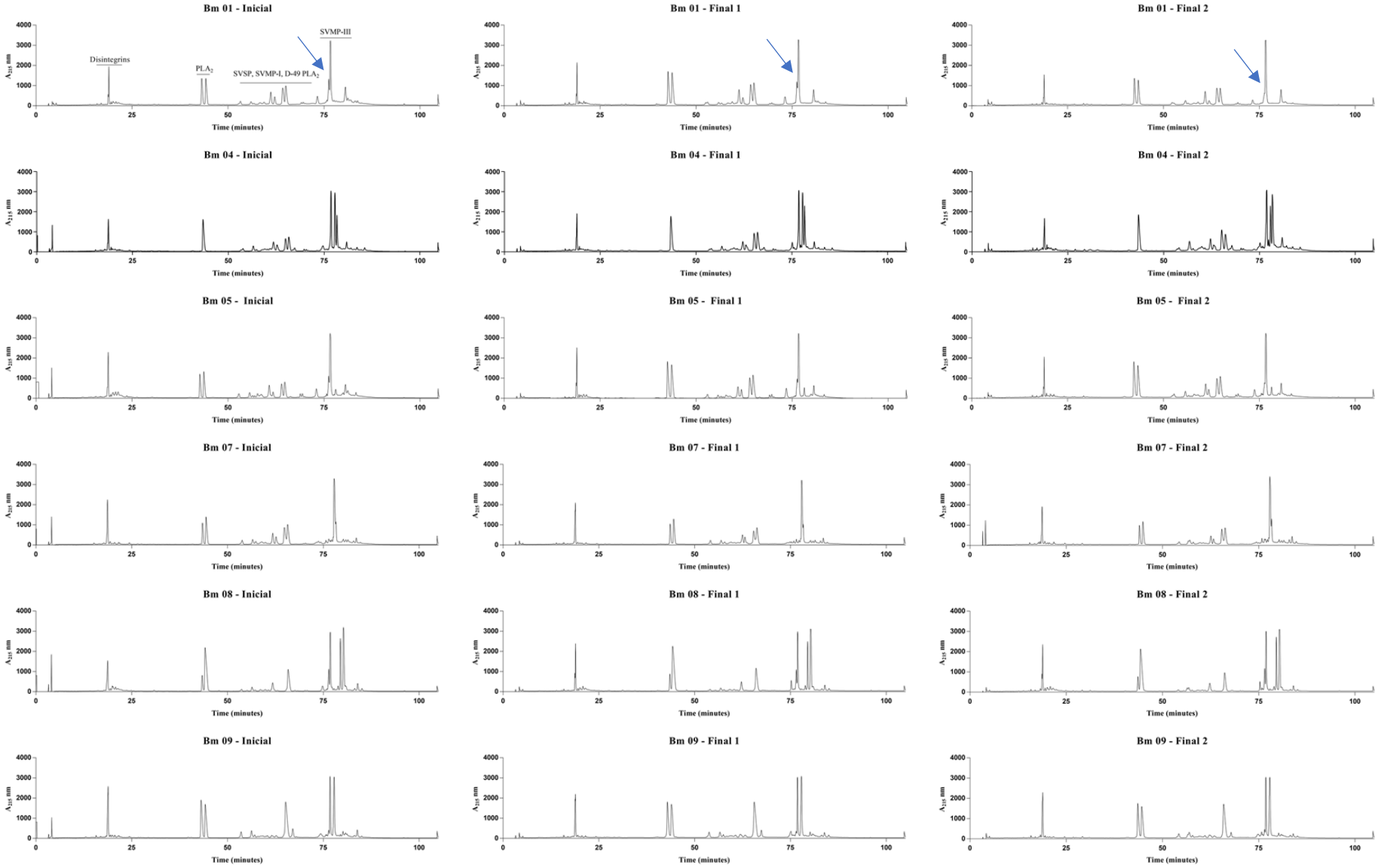
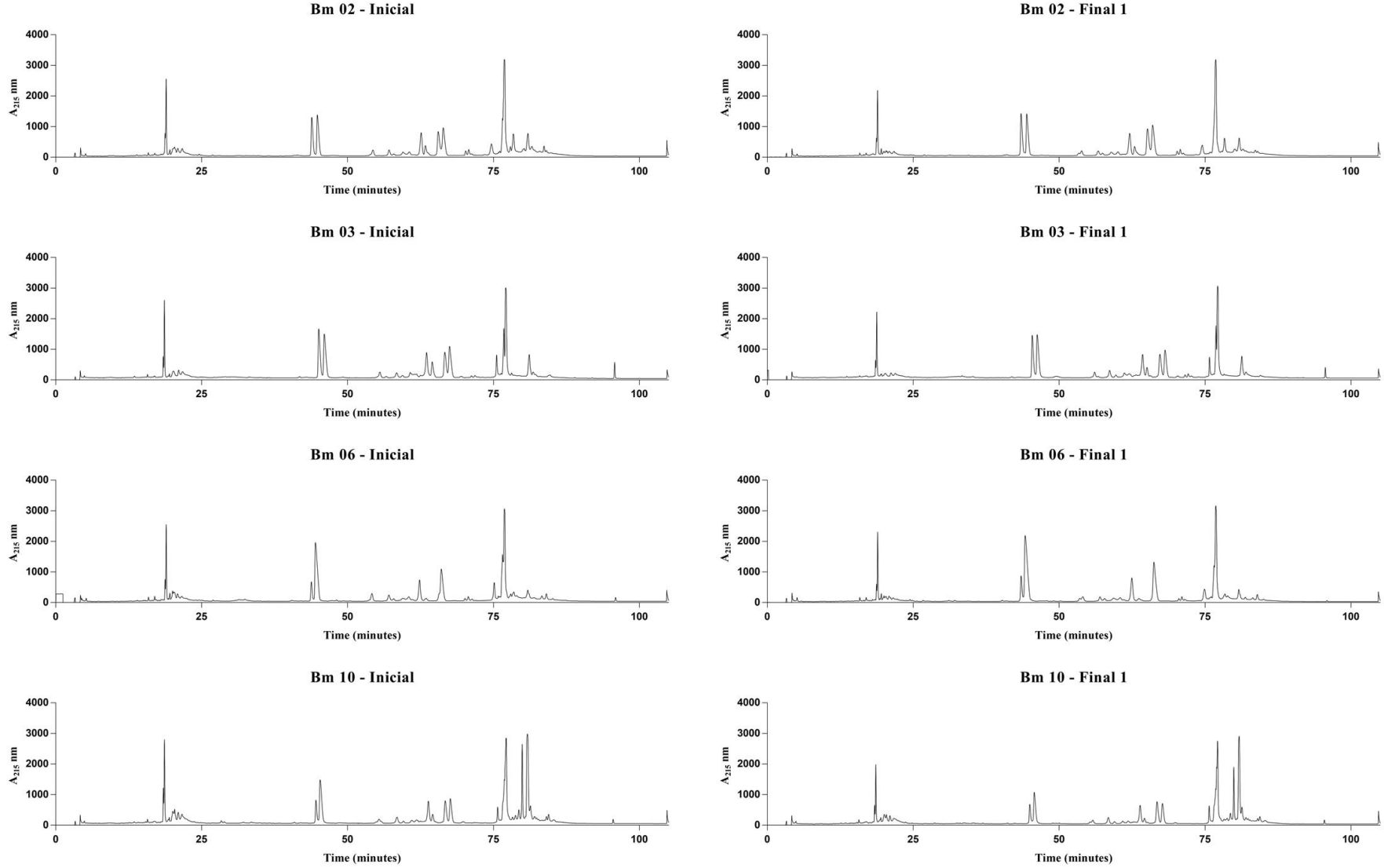


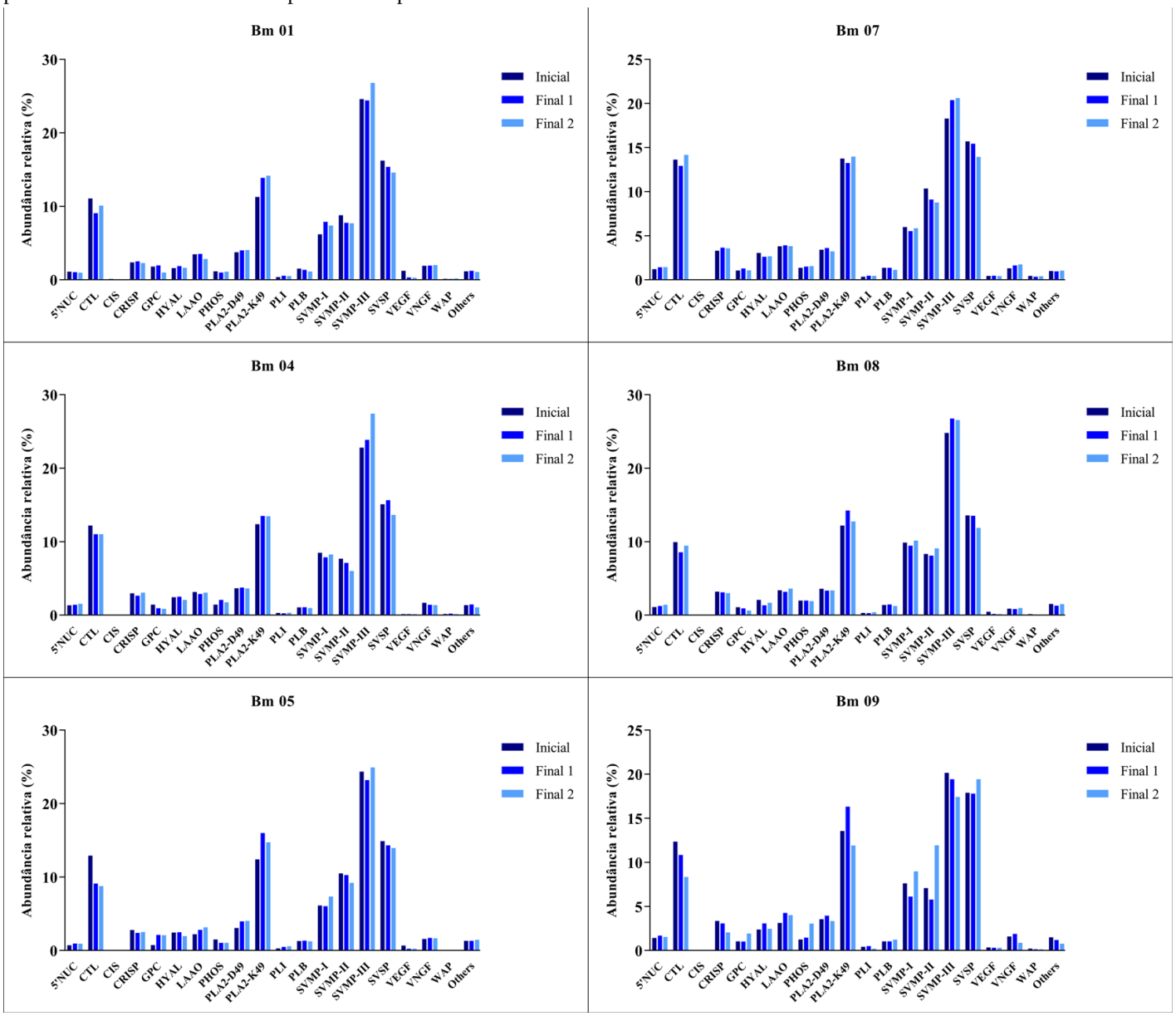
Figura 6. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. moojeni* nos dois momentos de mudança na alimentação (Inicial e Final 1). Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 500 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10



4.1.2.3. Análise proteômica

A análise proteômica foi realizada com os seis indivíduos que sobreviveram até o final do ano de retorno à alimentação com mamíferos e com os venenos inicial, final 1 e final 2. Foram encontradas 146 proteínas de 16 famílias proteicas diferentes e sua abundância relativa foi estimada com base na intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína individual identificada por *shotgun proteomics*. Como mostrado na figura 7, os indivíduos apresentaram uma composição geral do veneno similar entre eles, em termos de abundância relativa das famílias de toxinas.

Figura 7. Abundância relativa das famílias de proteínas dos venenos de serpentes da espécie *B. moojeni* submetidas à mudança de alimentação. A abundância relativa foi calculada com base na intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína individual identificada pela análise proteômica.



A família das SVMP foi a mais abundante em todos os indivíduos representando mais de 40% do veneno total, somando os 3 subtipos (PI, PII e PIII). Esse resultado era esperado já que essas proteínas estão majoritariamente presentes em muitas espécies do gênero *Bothrops*, exceto em *B. jararacussu* que possui uma abundância maior de PLA_2 (SOUSA et al., 2013). As outras famílias mais abundantes foram: PLA_2 (15 a 18%), SVSP (13 a 19%) e CTL (8 a 14%). Além dessas famílias, também foram encontradas 5' nucleotidase (5'NUC), cistatina (CIS), *Cystein Rich Secretory Protein* (CRISP), glutaminil peptidase (GPC), hialuronidase (HYAL), L-aminoácido oxidase (LAAO), fosfodiesterase (PHOS), inibidor de fosfolipases (PLI), fosfolipases B (PLB), fator de crescimento endotelial (VEGF), fator de crescimento neural (VNGF) e *waprin* (WAP).

Comparando as três extrações analisadas, observa-se que as duas famílias que apresentaram mudanças mais notáveis em termos de abundância relativa foram as SVMP e CTL. As SVMP tendem a manutenção da abundância relativa após a alimentação com anfíbios, apresentando valores similares para os venenos inicial e final 1. Já no veneno final 2, após o retorno à alimentação com mamíferos, as SVMP aumentaram em todos os indivíduos exceto no Bm 7, em que se manteve igual nos três momentos. Já as CTL diminuíram em todos os indivíduos após a alimentação com anfíbios e voltaram a aumentar em 3 indivíduos (Bm 1, Bm 7 e Bm 8) após o retorno com a dieta de mamíferos.

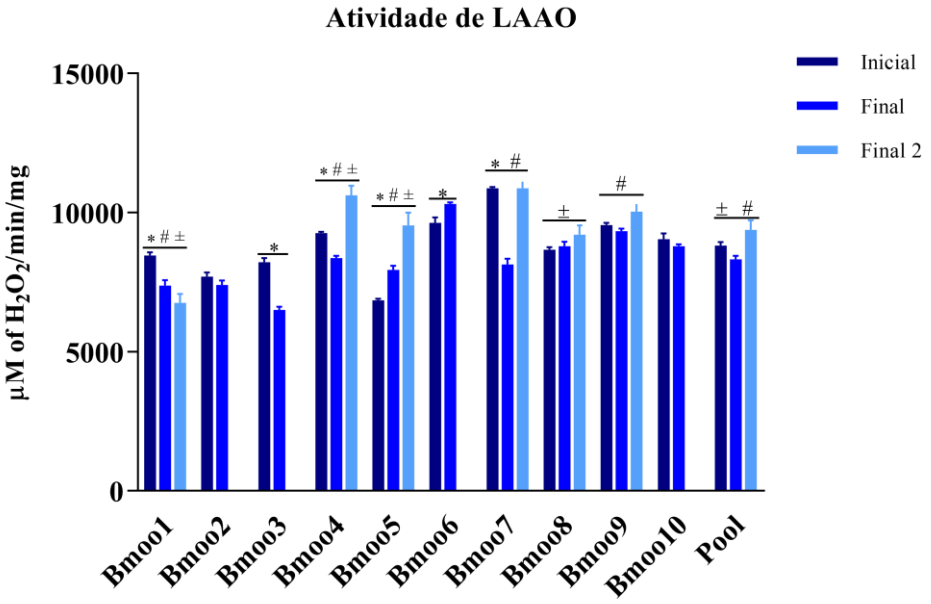
4.1.3. Caracterização enzimática dos venenos

4.1.3.1.Atividade de LAAO

Comparando a atividade de LAAO nos venenos inicial e final 1 (figura 8), podemos observar que dos 10 indivíduos, 7 e o *pool* apresentaram queda na atividade, 2 aumentaram a atividade e 1 indivíduo não apresentou alteração significativa na atividade (Bm 8). Apesar de apenas 6 dessas modificações apresentaram significância estatística, a dieta com anfíbios parece diminuir a atividade de LAAO na espécie *B. moojeni*.

Já quando comparamos a atividade de LAAO entre as extrações final 1 e final 2, podemos observar que dos 6 indivíduos, 5 e o *pool* apresentaram aumento da atividade após o retorno com alimentação com mamíferos. Apenas o indivíduo Bm 1 apresentou queda na atividade, assim como já havia apresentado na comparação entre os venenos inicial e final 1. Todas essas modificações são estatisticamente significativas, exceto para o indivíduo Bm 8. Dessa maneira, há evidências indicando que a dieta com anfíbios diminui a atividade da LAAO em *B. moojeni*. A LAAO é responsável pela coloração amarela dos venenos de serpentes (RODRIGUES et al., 2009), porém, mesmo com as mudanças observadas com relação às atividades, não identificou-se nenhuma alteração aparente na coloração dos venenos ao longo das extrações.

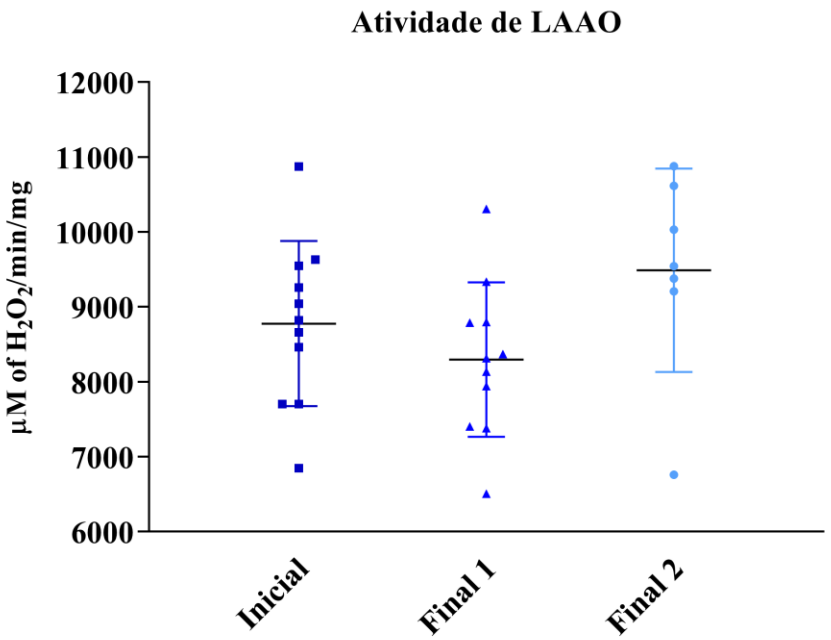
Figura 8. Atividade de L-aminoácido oxidase dos venenos de B. moojeni inicial, final 1 e final 2. A atividade de LAAO foi determinada utilizando L-metionina como substrato e incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. *p < 0,05, entre venenos inicial e final 1; # p < 0,05, entre venenos final 1 e final 2; e ± p < 0,05, entre venenos inicial e final 2.



Observando a análise proteômica, foram identificadas 3 isoformas de LAAO, e pelo menos uma delas se modifica de maneira significativa com a alteração da dieta (exceto Bm 7), apesar de não refletir em mudança na abundância relativa dessa família de proteína ao longo do tempo.

A diferença da atividade de LAAO entre os grupos inicial, final 1 e final 2 está representada na figura 9. Assim como nas análises individuais, podemos observar uma tendência à diminuição da atividade de LAAO com a alteração da dieta dos animais, porém essa diferença não é estatisticamente significante. Após o retorno à dieta com mamíferos, a atividade dessa enzima tende a aumentar, demonstrando que o veneno inicial e final 2 são mais semelhantes com relação a essa atividade. Ainda, é notável que a atividade de LAAO mostrou-se conservada entre os indivíduos analisados, demonstrando uma similaridade, com poucos *outliners*.

Figura 9. Comparação da atividade enzimática da LAAO do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade de LAAO foi determinada utilizando L-metionina como substrato e incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos.

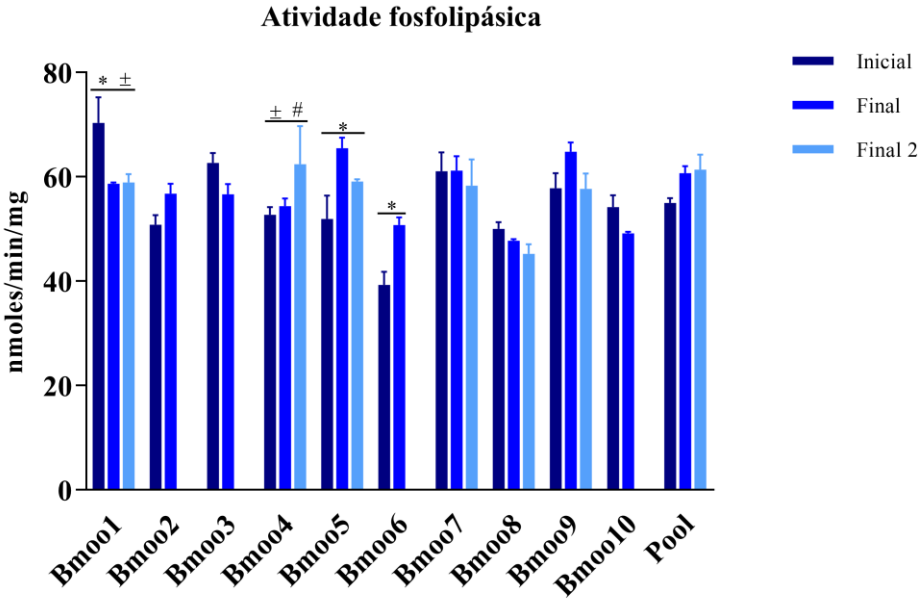


4.1.3.2.Atividade fosfolipásica

Quanto à atividade fosfolipásica, observamos que dos 10 indivíduos, 4 apresentaram diminuição da atividade (Bm 1, Bm 3, Bm 8 e Bm 10), 5 e o *pool*

apresentaram aumento (Bm 2, Bm 4, Bm 5, Bm 6 e Bm 9) e apenas um indivíduo (Bm 7) não apresentou mudança notável após a alimentação com anfíbios. Após o retorno à alimentação com mamíferos, observou-se que dos 6 indivíduos, 4 apresentaram diminuição na atividade (Bm 5, Bm 7, Bm 8 e Bm 9), 1 apresentou aumento (Bm 4) e um, juntamente com o *pool*, não apresentaram alteração (Bm 1). Esses resultados podem ser observados na figura 10.

Figura 10. Atividade fosfolipásica dos venenos de B. moojeni inicial, final 1 e final 2 A atividade fosfolipásica foi obtida utilizando o NOBA como substrato, incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. A leitura foi realizada a 425 nm. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2.

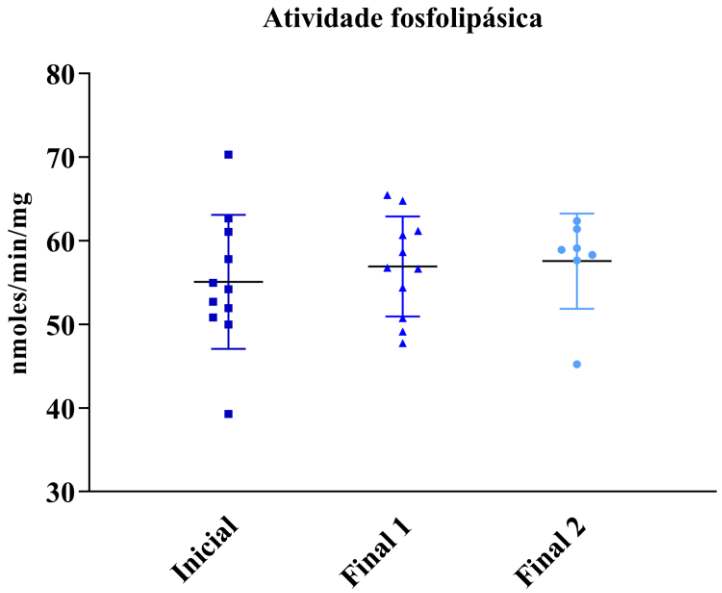


Comparando os três grupos (inicial, final 1 e final 2) é possível observar que a atividade enzimática da enzima PLA_2 é semelhante entre eles (Figura 11). Isso indica que a atividade fosfolipásica não é alterada pela dieta baseada em anfíbios. Apesar disso, pudemos observar diferenças com relevância estatística quando analisamos os indivíduos isolados. Dessa maneira, realçamos a importância de, sempre que possível, avaliar individualmente amostras de veneno de serpentes, a fim de promover uma análise mais robusta.

Correlacionando os dados da análise proteômica, podemos observar que as PLA_{2s} D-49 praticamente não se alteraram com relação a sua abundância relativa nos indivíduos estudados, apesar de haver mudanças nas possíveis isoformas em todos os indivíduos. A

maior alteração na família de PLA_2s aconteceu com as PLA_2s K-49 e, logo, não seriam expressas por meio do teste enzimático.

Figura 11. Comparação da atividade enzimática da PLA_2 do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade fosfolipásica foi obtida utilizando o NOBA como substrato, incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. A leitura foi realizada a 425 nm.

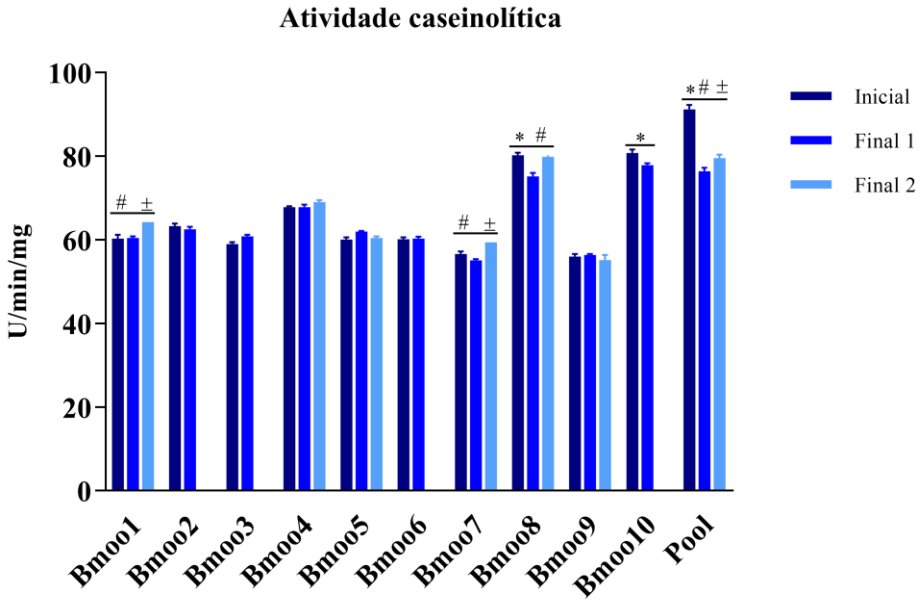


4.1.3.3.Atividade proteolítica

a. Atividade caseinolítica

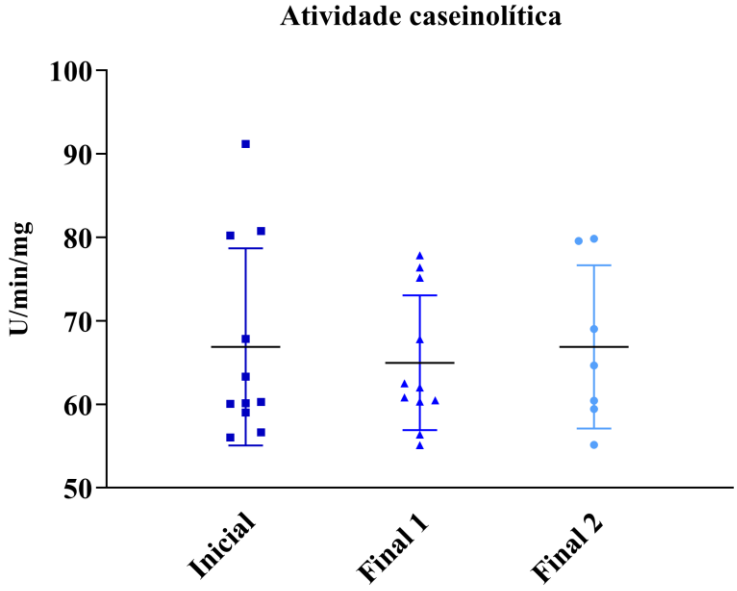
A atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína, demonstrada na figura 12, resultou em quatro indivíduos (Bm 2, Bm 7, Bm 8 e Bm 10) mais o *pool* diminuindo a atividade com a mudança da dieta para anfíbios. Dos seis restantes, dois apresentaram aumento (Bm 3 e Bm 5) e quatro não sofreram modificação (Bm 1, Bm 4, Bm 6 e Bm 9). Com o retorno da alimentação com mamíferos, também observamos modificações nos venenos do grupo final 2. Houve aumento da atividade em 4 indivíduos (Bm 1, Bm 4, Bm 7 e Bm 8) mais o *pool*.

Figura 12. Atividade proteolítica sobre a azocaseína dos venenos de *B. moojeni* inicial, final 1 e final 2. A atividade caseinolítica foi estabelecida utilizando azocaseína como substrato. Após incubação por 90 min a 37 ºC, a leitura foi realizada a 492 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg). *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2.



Assim como a atividade fosfolipásica, a comparação da atividade proteolítica sobre a caseína não demonstrou diferenças entre os grupos (Figura 13).

Figura 13. Comparação da atividade proteolítica sobre a azocaseína do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade caseinolítica foi estabelecida utilizando azocaseína como substrato. Após incubação por 90 minutos a 37 ºC, a leitura foi r realizada a 492 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg).



Observando ambas as análises, entendemos que a dieta com anfíbios não causa modificação da atividade proteolítica sobre a azocaseína dos venenos das serpentes da espécie *B. moojeni*.

b. Atividade colagenolítica

A atividade proteolítica sobre o colágeno é mais específica do que a atividade sobre a caseína, já que o colágeno é o substrato natural para as proteases do veneno, enquanto a caseína pode ser considerada um substrato exógeno (ANTUNES et al., 2010). Para avaliar a atividade proteolítica sobre o colágeno utilizou-se o substrato de gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência, que é constituído por colágeno tipo II (figuras 14 e 16).

A fim de investigar o papel das SVMP na atividade proteolítica sobre o colágeno utilizou-se EDTA, um conhecido inibidor de SVMP (BASTOS et al., 2016), para identificar se as SVMP presentes no veneno são as únicas proteases atuantes sobre o colágeno.

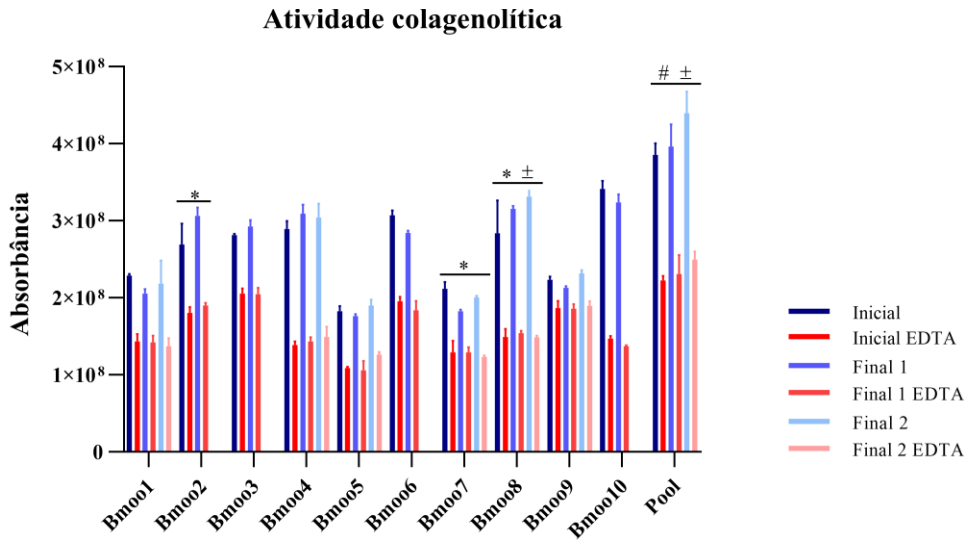
Não se observou nenhuma diferença significativa na atividade proteolítica sobre o colágeno com a alteração da alimentação no veneno dos indivíduos analisados. Esse resultado é similar ao observado quando se avaliou a atividade proteolítica sobre a caseína, indicando que as enzimas proteolíticas do veneno não parecem ser afetadas pela dieta baseada em anfíbios.

Após 60 minutos de incubação do veneno com o colágeno, todos os indivíduos apresentaram atividade proteolítica similar sobre esse substrato (figura 14). Entretanto, observando as curvas do gráfico da cinética (figura 16), nota-se uma diferença da inclinação das curvas, ressaltando diferenças entre os indivíduos analisados. De acordo com esses dados, os indivíduos Bm 8 e Bm 10, além do *pool*, apresentam uma inclinação maior das curvas da cinética enzimática, indicando uma maior velocidade na reação proteolítica sobre o colágeno.

A inibição da atividade colagenolítica causada pelo EDTA também não foi semelhante entre os indivíduos, variando de 12,81% a 57,62%. O indivíduo Bm 9 apresentou a menor porcentagem de inibição, enquanto os indivíduos Bm 4, Bm 8 e Bm 10 apresentaram a maior inibição. Esse resultado demonstra a importância das SVMP na

atividade colagenolítica, porém essas não são as únicas proteases responsáveis pela quebra do colágeno no veneno da espécie *B. moojeni*, indicando que as SVSP também possuem um papel nessa atividade. Interessante notar que a atividade residual dos venenos após a incubação com EDTA não apresenta mudanças, indicando que as SVSP não sofrem alteração com a mudança da dieta na espécie *B. moojeni*.

Figura 14. Atividade proteolítica sobre o colágeno (*pig skin*) dos venenos de *B. moojeni* inicial, final 1 e final 2 na ausência ou presença de EDTA (*endpoint*). A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrado. Após incubação por 60 min a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2.



A comparação da atividade colagenolítica dos venenos na espécie *B. moojeni* dos três grupos inicial, final 1 e final 2 (figura 15) demonstra que não há diferença entre os grupos estudados, mesmo após a incubação com EDTA. É interessante notar a ação do EDTA na inibição da atividade colagenolítica do veneno, semelhante em todos os grupos.

Figura 15. Comparação da atividade proteolítica sobre o colágeno do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrato. Após incubação por 60 min a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP.

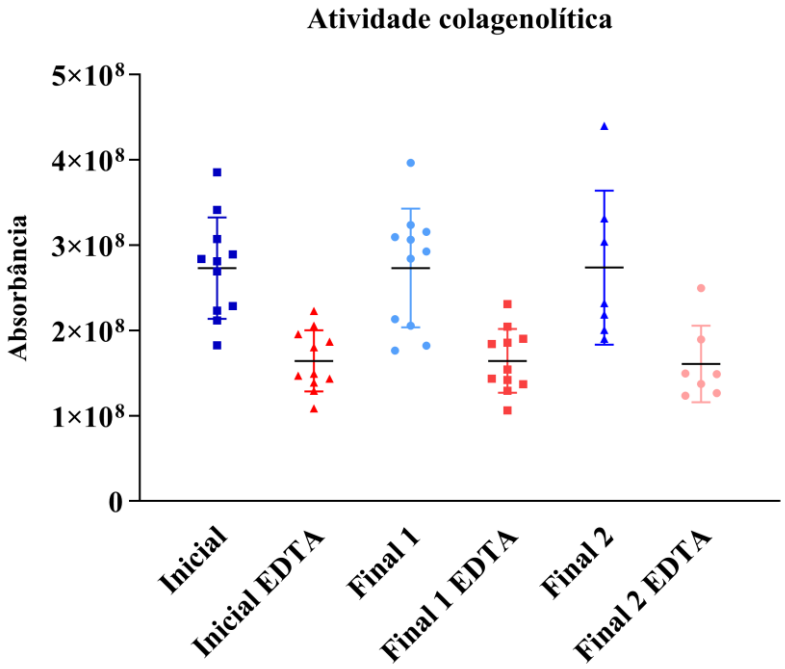
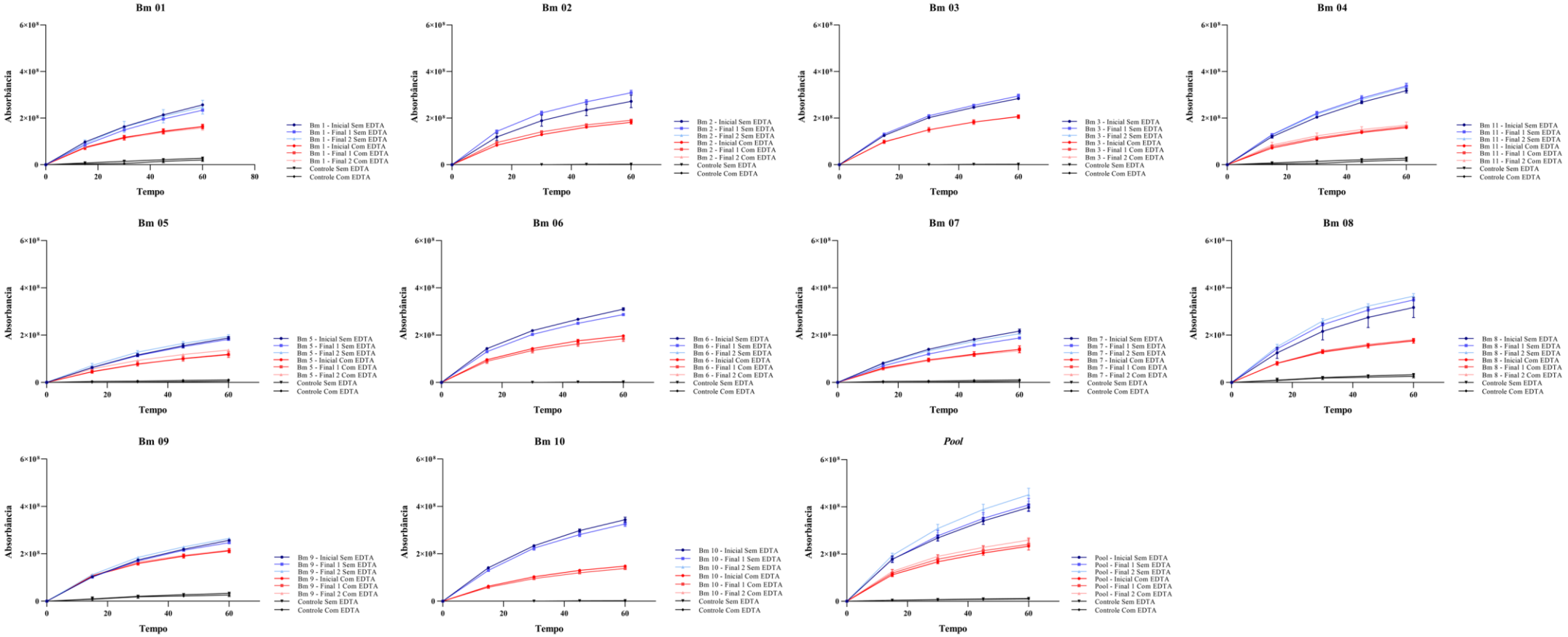


Figura 16. Atividade proteolítica sobre o colágeno dos venenos de *B. moojeni* inicial, final 1 e final 2 na ausência ou presença de EDTA. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrato. Após incubação por 60 minutos a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes da adição do substrato, para avaliar a inibição de SVMP.



4.1.4. Resumo das atividades enzimáticas de B. moojeni

Encontra-se na tabela 3, um resumo comparativo das atividades enzimáticas do veneno das serpentes *B. moojeni* submetidas à alteração da dieta.

Tabela 3. Resumo das atividades enzimáticas da espécie *B. moojeni*. A cor verde indica o maior valor da atividade dentre os três momentos de alimentação, a cor amarela indica o valor intermediário da atividade e a cor vermelha indica o menor valor da atividade.

B. moojeni												
	LAAO (uM de H202/min/mg)			**PLA_2 (nmoles/min/mg)**			**Caseinolítica (U/min/mg)**			**Colagenolítica (unidades de absorbância)**		
	Inicial	Final 1	Final 2	Inicial	Final 1	Final 2	Inicial	Final 1	Final 2	Inicial	Final 1	Final 2
Bm 1	8465,93	7380,93	6762,22	70,32	58,68	58,92	60,296	60,474	64,681	9,05E+09	8,21E+09	8,77E+09
Bm 2	7703,52	7405,93	-	50,83	56,8	-	63,319	62,511	-	1,02E+10	1,18E+10	-
Bm 3	8219,07	6507,41	-	62,67	56,66	-	59,022	60,822	-	1,07E+10	1,12E+10	-
Bm 4	9260,56	8373,7	10618,89	52,71	54,39	62,4	67,837	67,815	69,037	1,13E+10	1,21E+10	1,19E+10
Bm 5	6850,74	7943,52	9546,85	51,96	65,47	59,11	60,067	62,004	60,467	6,43E+09	6,26E+09	6,93E+09
Bm 6	9630,37	10310,19	-	39,29	50,75	-	60,156	60,341	-	1,18E+10	1,09E+10	-
Bm 7	10876,48	8135,19	10877,78	61,06	61,18	58,31	56,644	55,111	59,437	7,69E+09	6,63E+09	7,35E+09
Bm 8	8662,22	8798,89	9210,74	50,01	47,78	45,26	80,219	75,17	79,837	1,16E+10	1,30E+10	1,37E+10
Bm 9	9551,85	9338,15	10032,22	57,82	64,79	57,67	56,052	56,378	55,156	9,37E+09	9,16E+09	9,88E+09
Bm 10	9043,33	8789,44	-	54,23	49,15	-	80,778	77,874	-	1,27E+10	1,20E+10	-
Pool	8821,85	8318,33	9380,37	54,98	60,7	61,41	91,196	76,389	79,596	1,48E+10	1,51E+10	1,67E+10

4.1.5. Caracterização das atividades fisiopatológicas do veneno

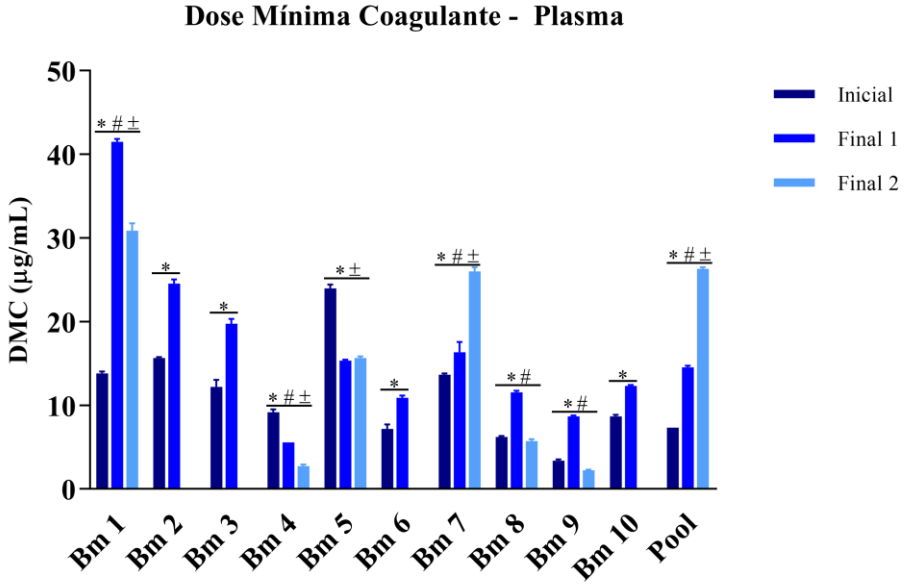
4.1.5.1. Dose mínima coagulante

A dose mínima coagulante (DMC) expressa a menor dose de veneno necessária para coagular em 60 segundos o plasma ou o fibrinogênio. Isso implica que quanto menor a dose encontrada, mais coagulante o veneno é. Ou seja, é preciso menos veneno para coagular o plasma ou o fibrinogênio. Com isso em foco, observamos que quando comparamos o veneno inicial e final 1, dos dez indivíduos analisados, oito deles apresentaram maior DMC no veneno final 1. Dessa maneira, o veneno desses oito indivíduos se tornou menos coagulante com a mudança da dieta. Alguns desses aumentos foram evidentes, como por exemplo os indivíduos Bm 1, Bm 2 e Bm 3. O *pool* dos venenos também corroborou o aumento da DMC. Apenas os indivíduos Bm 2 e Bm 4 demonstraram aumento da atividade coagulante com a mudança da dieta.

Os valores de DMC dos venenos iniciais variaram entre 3,41 e 24,0 µg de veneno por mL de plasma, enquanto nos venenos final 1 esses valores ficaram entre 5,56 e 41,5 µg de veneno por mL de plasma. Isso evidencia a grande variação individual encontrada na espécie *B. moojeni*, além de corroborar a perda de atividade coagulante com a dieta baseada em anfíbios.

Comparando os venenos final 1 e final 2, podemos observar que três dos seis indivíduos analisados apresentaram retorno à atividade inicial (Bm 1, Bm 8 e Bm 9). Os indivíduos Bm 4 e Bm 7 apresentaram padrões semelhantes no veneno final 1 e final 2, sendo que o Bm 4 apresentou aumento contínuo da atividade coagulante, enquanto o indivíduo Bm 7 apresentou diminuição contínua dessa atividade. Já o indivíduo Bm 5 não apresentou mudança de atividade com o retorno à alimentação baseada em mamíferos. O *pool* dos venenos apresenta padrão similar ao veneno do indivíduo Bm 7, sempre demonstrando uma perda de atividade coagulante.

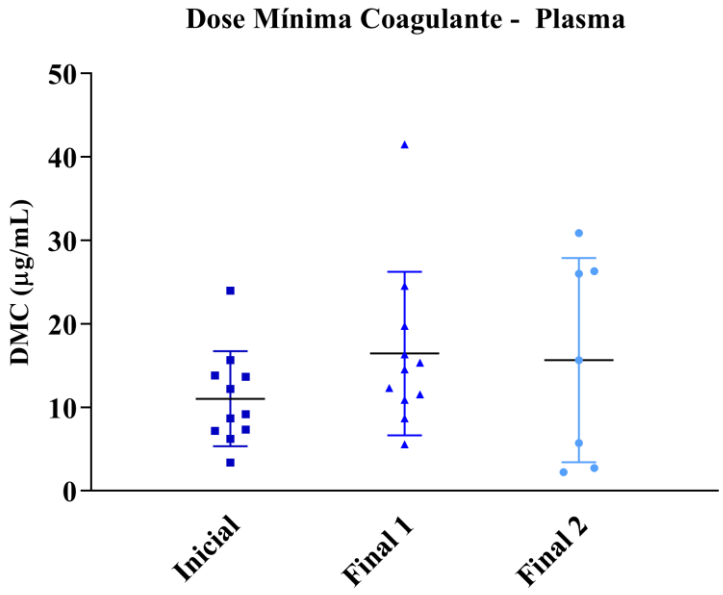
Figura 17. Dose mínima coagulante dos venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A DMC é estabelecida pela menor quantidade de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37 ºC. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2.



É interessante notar a grande variação individual nos venenos analisados. Os indivíduos Bm 4 e Bm 9 apresentaram a maior atividade coagulante entre todos os outros analisados. O *pool* demonstrou ser pouco coagulante, se assemelhando ao indivíduo Bm 7. Isso indica a importância da análise individual, já que o *pool* não demonstra as variações intraespecíficas presentes nos venenos. Nosso grupo encontrou resultados similares estudando venenos individuais da espécie *B. jararaca*, demonstrando que a atividade coagulante apresenta grande variação dentro de uma mesma espécie (GALIZIO et al., 2018).

A comparação dos grupos inicial, final 1 e final 2, observada na figura 18, corrobora os resultados individuais sobre variação intraespecífica demonstrando um grande intervalo no valor da atividade. Também pode-se observar uma tendência à diminuição da atividade coagulante com a mudança da dieta para anfíbios. Porém não é possível observar uma diferença entre o veneno final 1 e final 2, indicando que o retorno à alimentação baseada em mamíferos parece não modificar intensamente esses venenos.

Figura 18. Comparação da atividade coagulante do veneno da espécie *B. moojeni* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A Dose Mínima Coagulante é estabelecida pela menor quantidade de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37 ºC.



Analisando os resultados da caracterização proteômica, podemos observar que as CTLs apresentaram alterações importantes com a mudança da dieta. As CTLs são proteínas que afetam a função plaquetária e outras atividades funcionais relacionadas com a hemostasia, incluindo ligação com os fatores IX e X para inibir a coagulação sanguínea, inibição da ligação da trombina ao fibrinogênio, e inibição ou ativação da agregação plaquetária pela interação com fator de von Willebrand ou com receptores de colágeno (LAZAROVICI; MARCINKIEWICZ; LELKES, 2019). Dessa maneira, é importante a investigação mais aprofundada da influência da dieta na coagulopatia causada pelo envenenamento.

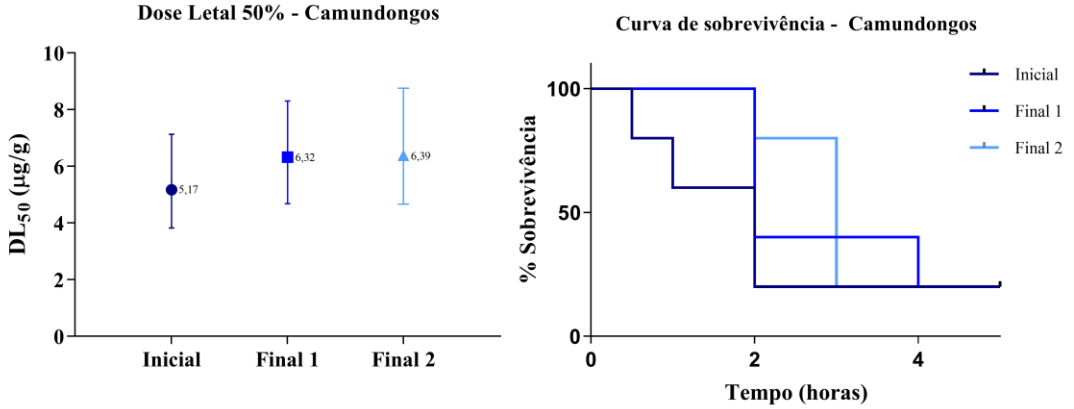
4.1.5.2.Dose Letal 50% e tempo de morte em camundongos

O *pool* de venenos das serpentes do grupo inicial é mais letal para camundongos (103,48 µg/animal ou 5,17 µg/g) do que o veneno final 1 (126,39 µg/animal ou 6,32 µg/g) e final 2 (127,8 µg/animal ou 6,39 µg/g), como demonstrado na figura 19. De forma impressionante, o veneno final 1 e final 2 são muito similares com relação à DL_{50} em camundongos. A DL_{50} é resultado da sinergia das proteínas presentes no veneno

(HATAKEYAMA, 2019; LAUSTSEN et al., 2015), sendo, portanto, muito difícil atribuir a mudança no seu valor a alguma família proteica específica.

Além de calcular a DL_{50}, optamos também por observar o tempo de morte dos camundongos, baseado em Smiley-Walters e colaboradores (2017) (SMILEY-WALTERS; FARRELL; GIBBS, 2017). É interessante notar que com dose mais alta de veneno aplicada nos camundongos (228,5 µg/animal), os animais começaram a morrer mais cedo com o *pool* de venenos iniciais. Já na primeira meia hora após a aplicação, foi constatada a morte de um animal. Para o *pool* de venenos final 1 e final 2, só houve mortes a partir de 2 horas após a aplicação. Observamos, em especial, a dose mais alta pois é a que melhor representa uma situação natural, considerando que na natureza as serpentes não injetam pouca quantidade de veneno para subjugar a presa.

Figura 19. Dose letal 50% e curva de sobrevivência de camundongos inoculados com o *pool* de venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. Cinco camundongos Swiss machos foram injetados via intraperitoneal com 500 µL de diferentes doses do pool de venenos dos grupos inicial, final 1 e final 2. A sobrevivência de cada animal foi registrada por 48 horas. A dose letal 50% foi calculada pela análise de probitos. O primeiro gráfico (esquerda) representa as doses letais e os valores dos limites superior e inferior. O segundo gráfico (direita) demonstra o número de camundongos mortos ao longo do tempo de observação dos três grupos experimentais inoculados com a dose de 228,5 µg/animal.



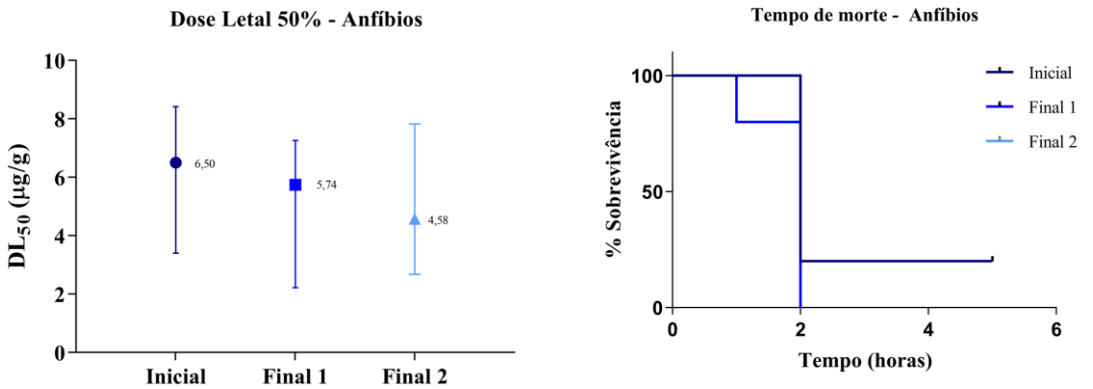
Analisando a necropsia dos camundongos mortos, pode-se observar alguns sinais comuns a praticamente todos os indivíduos analisados: (i) petéquias nos intestinos, em especial no duodeno; (ii) hemorragia no diafragma; (iii) hemorragia no peritônio; e (iv) hemorragia no epidídimo. Também se observou alguns outros sinais presentes em alguns indivíduos como hemorragia pulmonar discreta, ventrículo direito do coração congesto e líquido na cavidade peritoneal.

4.1.5.3.Dose Letal 50% e tempo de morte em anfíbios (Lithobates catesbeianus)

De maneira contrária ao observado em camundongos, o veneno das serpentes do grupo inicial é menos letal para anfíbios (65,01 µg/animal ou 6,50 µg/g) do que o veneno final 1 (57,46 µg/animal ou 5,74 µg/g) e final 2 (45,81 µg/animal ou 4,58 µg/g) (figura 20). O veneno final 2 mostrou ser o mais letal para anfíbios em comparação com os outros dois grupos, mas, ainda assim, similar ao veneno final 1. Mesmo com a sobreposição dos limites superior e inferior, os resultados sugerem que, após a alimentação com anfíbios, o veneno passa a ser mais letal para esse grupo, e o retorno à alimentação com mamíferos por apenas um ano não é tempo suficiente para que ele retorne à sua condição inicial.

Além disso, esse resultado é corroborado pelo tempo de morte. Os venenos final 1 e final 2 apresentaram curvas idênticas, e começaram a matar os anfíbios após uma hora de aplicação. Já o veneno inicial só começou a matar os animais após 2 horas de aplicação, e, das cinco rãs, uma sobreviveu até o final das 48 horas.

Figura 20. Dose letal 50% e curva de sobrevivência de anfíbios da espécie *L. catesbeianus* inoculados com o *pool* de venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. Cinco rãs foram injetadas via intracelomática com 500 µL de diferentes doses do veneno dos grupos inicial, final 1 e final 2. A sobrevivência de cada animal foi registrada por 48 horas. A dose letal 50% foi calculada pela análise de probitos. O primeiro gráfico (esquerda) representa as doses letais e os valores dos limites superior e inferior. O segundo gráfico (direita) demonstra o número de rãs mortas ao longo do tempo de observação dos três grupos experimentais inoculados com a dose de 143,7 µg/animal.



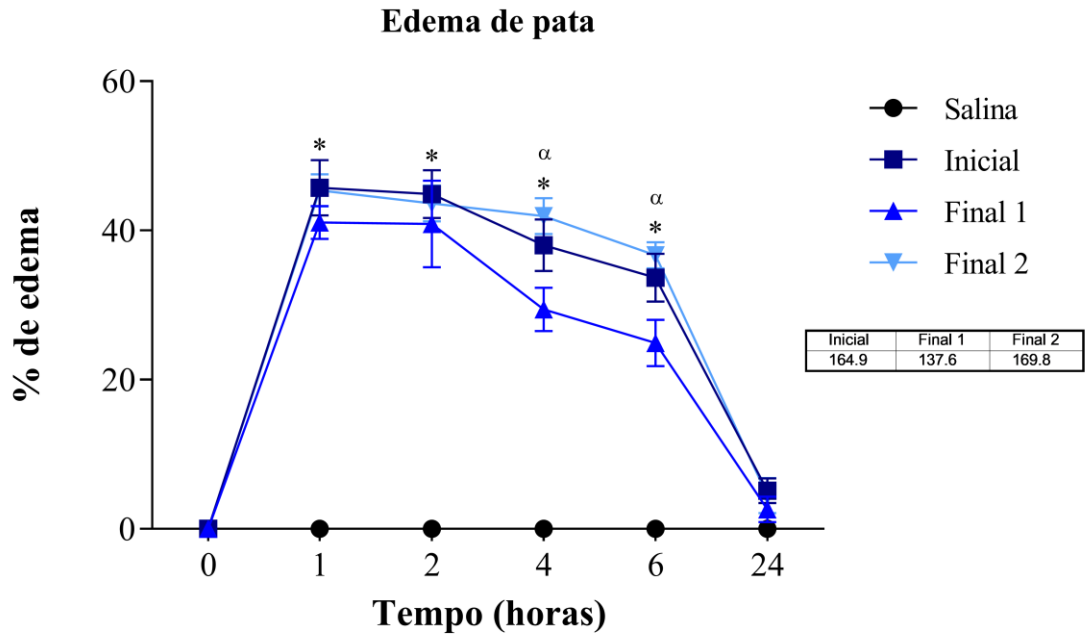
4.1.5.4.Atividade edematogênica em camundongos

Essa análise demonstrou que, de maneira distinta à DL_{50}, os venenos dos grupos inicial e final 2 são similares, com base na área sob a curva (AUC) estimada (AUC –

Ini: 164,9 e F2: 169,8), enquanto o grupo final 1 possui uma atividade edematogênica menor que os demais (AUC 137,6). Esses resultados podem ser observados na figura 21.

Podemos observar em todos os grupos analisados que o pico da atividade edematogênica acontece após uma hora da aplicação do veneno e, após 4 horas pode-se observar uma diminuição do edema, sendo que o veneno final 2 apresentou essa recuperação de maneira mais acentuada. Após 24 horas da inoculação do veneno, já não se pode mais notar o edema na pata dos camundongos.

Figura 21. Atividade edematogênica dos venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. O aumento do volume da pata foi induzido pela aplicação de 1 µg de veneno na pata traseira direita de camundongos Swiss machos. O edema de pata foi expresso em porcentagem de aumento da espessura e o resultado final foi obtido pela diferença entre o volume da pata afetada e da pata contralateral (controle). Os valores descritos na tabela correspondem à área sob a curva.

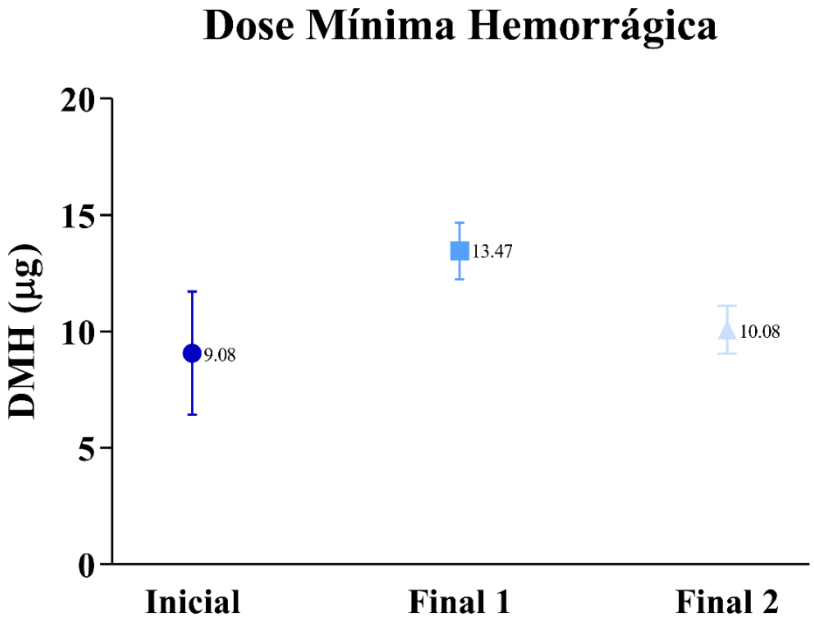


4.1.5.5. Dose mínima hemorrágica em camundongos

O veneno final 1 apresentou a menor atividade hemorrágica dentre os três analisados (13,47±1,21 µg). O veneno inicial apresentou atividade semelhante ao veneno final 2 (9,08±2,64 µg e 10,08±1,02 µg, respectivamente), ambos com atividade hemorrágica maior que o extraído após um ano de alimentação com anfíbios (figura 22). A hemorragia é um efeito muito importante do envenenamento botrópico. As SVMP, em especial as P-III, são as principais responsáveis pela hemorragia local. Quando

analisamos a atividade proteolítica sobre o colágeno, não foi observada uma diminuição dessa atividade nos venenos final 1, o que não corrobora os resultados obtidos na DMH, indicando que outras famílias de proteínas também podem contribuir para essa atividade, atuando em sinergia.

Figura 22. Dose mínima hemorrágica dos venenos de *B. moojeni* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade hemorrágica foi obtida aplicando-se 100 µL de veneno em diferentes concentrações via intradérmica em camundongos Swiss machos. Após 3 horas, os camundongos foram eutanasiados e o halo hemorrágico foi mensurado com o auxílio do software ImageJ.



4.2. B. alternatus

4.2.1. Serpentes

De maneira diferente à espécie *B. moojeni*, as serpentes da espécie *B. alternatus* demonstraram maior intolerância à alimentação forçada com anfíbios. Pudemos observar nesse período muitos episódios de regurgitação, sendo que algumas serpentes apresentaram esse quadro em duas alimentações seguidas. O experimento começou com 12 espécimes, porém apenas 7 sobreviveram até o final. Além disso, relatou-se fezes mais pastosas, diferentes do normal, e todas as serpentes exibiram inflamação na boca, com estomatite e formação de cáseos, que, inclusive, prejudicaram a extração do veneno em alguns momentos. Apesar disso, nenhum dos 7 animais sobreviventes manifestou perda de massa nesse período (figura 23).

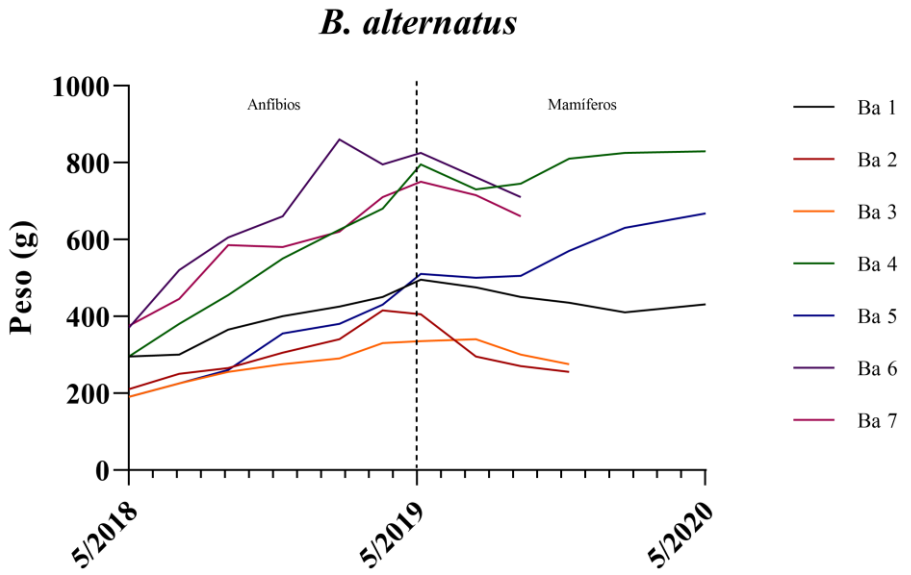
Após um ano com alimentação baseada em anfíbios, as serpentes da espécie *B. alternatus* voltaram a ser alimentadas com mamíferos, sua dieta natural. Durante o período de alimentação com mamíferos, a frequência da alimentação foi alterada para uma vez por mês, pois os mamíferos (ratos e camundongos) são mais nutritivos que os sapos, e a frequência de alimentação duas vezes por mês poderia aumentar o peso das serpentes de forma não desejada. As serpentes não apresentaram alteração no apetite, e foram alimentadas de forma natural com presas mortas, sem a necessidade de que a alimentação fosse forçada.

No decorrer do ano, as serpentes continuaram a apresentar problemas na boca, com a presença de estomatite e cáseos. Logo no início do retorno à alimentação com mamíferos podemos observar uma perda importante do peso de todos os animais (exceto indivíduo Ba 3), em especial do indivíduo Ba 2, que passou de 405 g para 295 g. Esse mesmo indivíduo não conseguiu recuperar o peso nos meses seguintes e acabou por morrer no final do ano 2019. Apenas três serpentes sobreviveram até o final de um ano de alimentação com mamíferos.

Não se sabe ao certo a causa da morte desses animais, e se a dieta com anfíbios alterou a saúde das serpentes de forma definitiva. Segundo a Dra. Kathleen Grego, veterinária responsável pela manutenção das serpentes do biotério do Laboratório de Herpetologia, a manipulação frequente dos animais (a cada duas semanas) durante o período de alimentação com anfíbios pode ter levado a uma queda da imunidade, devido ao estresse, o que pode ter agravado as doenças bucais apresentadas pelos animais. O efeito imunossupressor do estresse crônico já é muito conhecido na literatura e, também, no manejo de animais exóticos. O estresse crônico libera cortisol que, por sua vez, atua de forma a inibir a resposta imune, em especial a resposta inata, a distribuição e diferenciação de leucócitos e resposta de Th2 (TORT, 2011). De fato, na última extração o indivíduo Ba 4 apresentou a pele repleta de fungos. As infecções fúngicas em serpentes são, em sua maioria, secundárias ou oportunistas, causadas por alguns fatores, inclusive estresse (SILVA, 2007). Essas observações são corroboradas pelas fichas de necrópsias das serpentes que morreram durante o experimento. Os animais mortos não apresentavam desnutrição e nenhum problema decorrente da alimentação por anfíbios. Alguns dos animais morreram em decorrência de complicações dos cáseos na boca e outras infecções, outros apresentaram insuficiência cardiorrespiratória após a anestesia com CO_2.

Pode-se notar que, de maneira geral, as fêmeas sobreviventes (Ba 4 e Ba 5) conseguiram reestabelecer seu peso, já o macho (Ba 1) só demonstrou uma manutenção do peso no fim do período experimental.

Figura 23. Variação da massa das serpentes *B. alternatus* ao longo do tempo. A alimentação com anfíbios da espécie *L. catesbeianus* se iniciou em maio de 2018 e foi finalizada em maio de 2019. Apenas 7 indivíduos sobreviveram até o final da alimentação com anfíbios. O retorno a dieta baseada em mamíferos foi iniciado em maio de 2019 e finalizada em maio de 2020. Apenas 3 animais sobreviveram ao fim dessa etapa.



4.2.2. Caracterização do perfil proteico dos venenos

4.2.2.1. SDS-PAGE

Os perfis de eletroforese da espécie *B. alternatus* mostraram algumas diferenças evidentes em todos os indivíduos e no *pool* de venenos, demonstrando um padrão de alteração com a dieta de anfíbios. Uma banda pouco acima de 15 kDa aumenta de intensidade no veneno final em todos os indivíduos analisados. Nos indivíduos Ba 1 e Ba 2 essa banda aumenta de forma mais sutil. No indivíduo Ba 2, uma banda abaixo de 75 kDa surge no veneno final 1, porém é o único indivíduo que apresenta essa modificação. Também parece haver uma alteração na região das PLA_2, entre 10 e 15 kDa.

De maneira diferente ao observado em *B. moojeni*, as serpentes da espécie *B. alternatus* não apresentam variação intraespecífica marcante no perfil eletroforético dos venenos. Todos os indivíduos apresentam duas bandas majoritárias, uma entre 50 e

75 kDa, região de massa molecular usualmente associada às SVMP P-III, e uma entre 20 e 25 kDa, geralmente relacionada às SVMP-PI.

Figura 24. SDS-PAGE dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. alternatus* antes (inicial) e depois (final) da mudança na alimentação para anfíbios (*L. catesbeianus*). Foram aplicados 20 µg de proteínas do veneno por canaleta em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad.

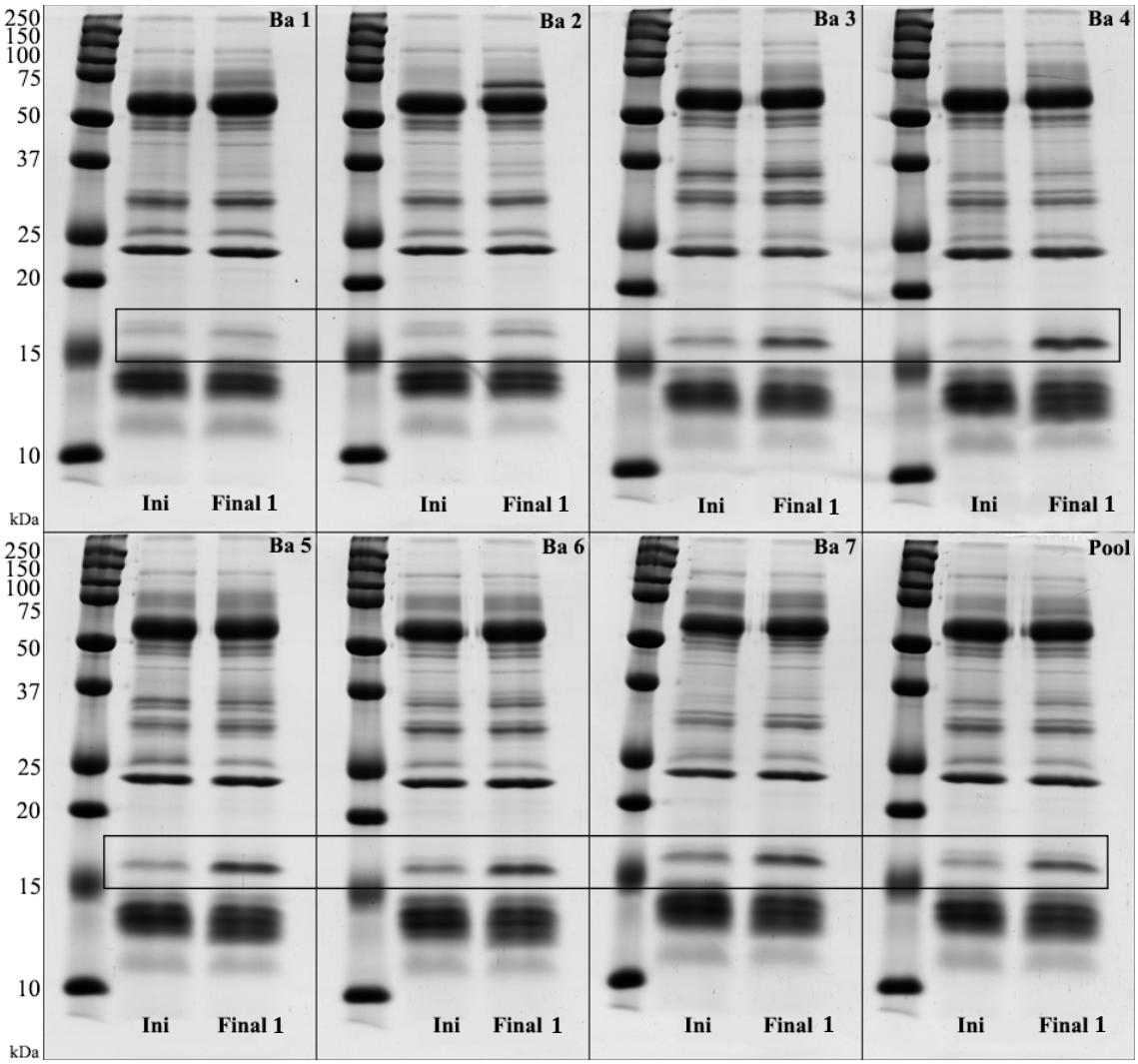
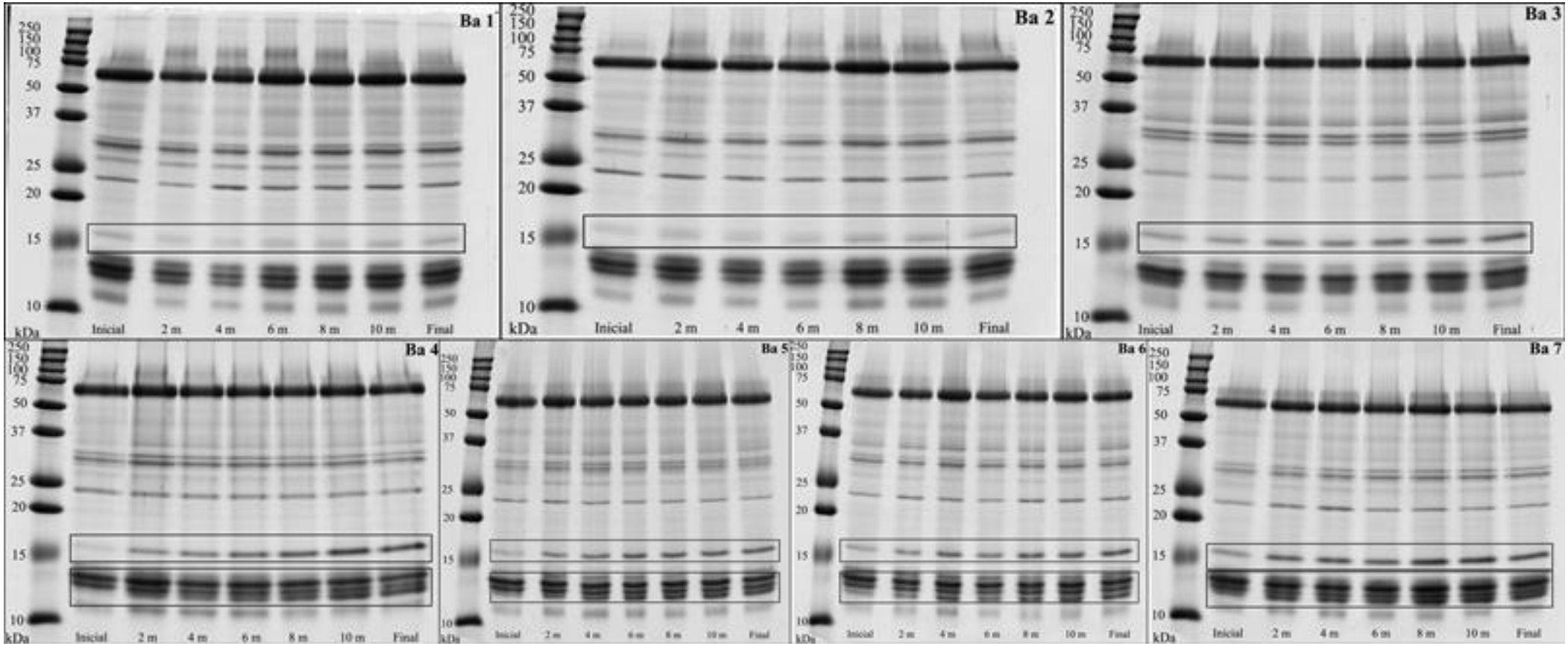
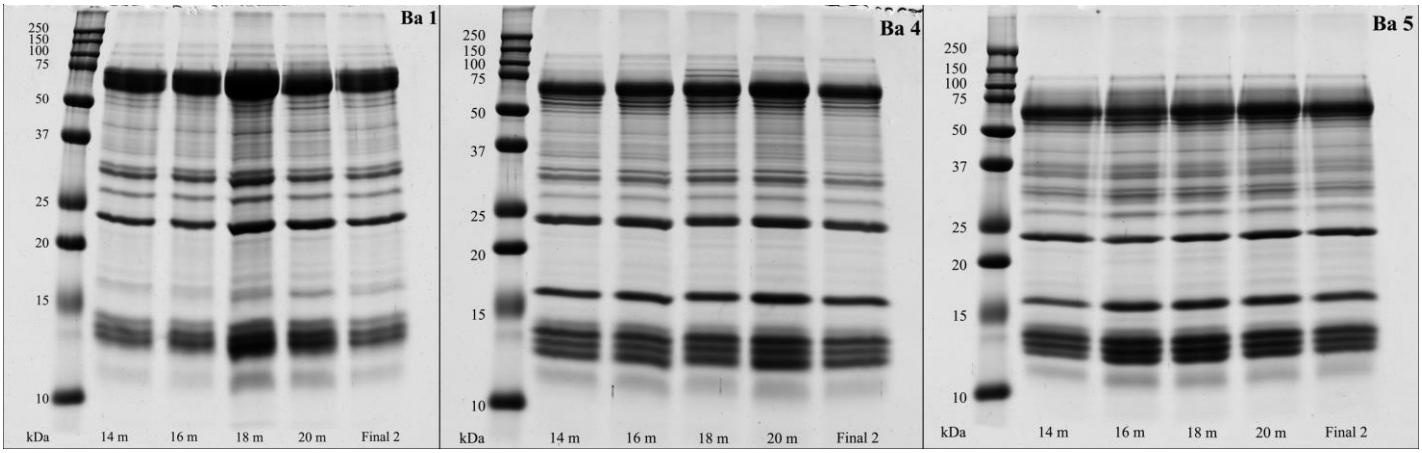


Figura 25. SDS-PAGE das extrações dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. alternatus* durante a alimentação com anfíbios (*L. catesbeianus*). Foram aplicados 20 µg de proteínas do veneno por canaleta em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad.



Após o retorno à alimentação com mamíferos, realizou-se o SDS-PAGE das cinco extrações feitas nesse período (figura 26). Interessante notar que a banda proteica de aproximadamente 15 kDa está presente de forma bem acentuada nas duas fêmeas (Ba 4 e Ba 5), demonstrando que não houve o retorno a uma situação inicial como se esperava. Os padrões eletroforéticos de todos os indivíduos analisados estão similares durante o retorno à dieta com mamíferos, não demonstrando diferenças notáveis. Deve-se ressaltar que não houve extração dos venenos no mês de março de 2020 devido à pandemia do novo coronavírus (COVID-19). Dessa maneira a extração denominada "final 2" foi feita em maio de 2020, 24 meses após o início dos experimentos e 12 meses após o retorno à dieta com mamíferos.

Figura 26. SDS-PAGE das extrações dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. alternatus* após o retorno à alimentação com mamíferos (ratos e/ou camundongos). Foram aplicados 20 µg de proteínas do veneno por canaleta em um gel com concentração de 15% de acrilamida. O gel foi corado por Coomassie G (GE Healthcare). O marcador de massa molecular utilizado foi *Dual Color Precision Plus*, BioRad.



4.2.2.2.RP-HPLC – Determinação do perfil cromatográfico

O perfil cromatográfico dos venenos de *B. alternatus* foi obtido utilizando o sistema de HPLC Jasco. Pode-se observar que o veneno de *B. alternatus* apresenta um perfil cromatográfico simples, com poucos picos situados principalmente no início e no final da corrida. Nessas regiões em venenos botrópicos pode-se encontrar disintegrinas e BPPs e SVMP, respectivamente. Assim como no SDS-PAGE, podemos notar que as serpentes da espécie *B. alternatus* possuem um perfil cromatográfico sem muitas variações entre os indivíduos, indicando um veneno conservado dentro da espécie. Esse resultado é diferente daquele encontrado para a espécie *B. moojeni*, que apresenta um veneno mais complexo, com maior número de picos e maior variação individual.

Nos machos não é possível notar muitas diferenças entre os perfis cromatográficos nas diferentes dietas. Já nas fêmeas nota-se que o segundo pico na região final do cromatograma, onde eluem majoritariamente as SVMPs, sofre uma diminuição da intensidade, assemelhando-se ao primeiro pico dessa região após a alimentação com anfíbios. Pode-se notar que a intensidade desse pico volta a subir após o retorno à alimentação com mamíferos nas duas fêmeas analisadas (Ba 4 e Ba 5), sendo um aumento mais sutil no indivíduo Ba 4.

Figura 27. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes machos e dos *pools* da espécie *B. alternatus* nos três momentos de mudança na alimentação (Inicial, Final 1 e Final 2). Amostras de 75 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Jasco. As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 min, 5-25% de B por 10 min, 25-45% de B por 60 min, 45-70% de B por 10 min, 70-100% de B por 10 min e 100% de B por 10 min. A cromatografia foi acompanhada por leitura a 215 nm.

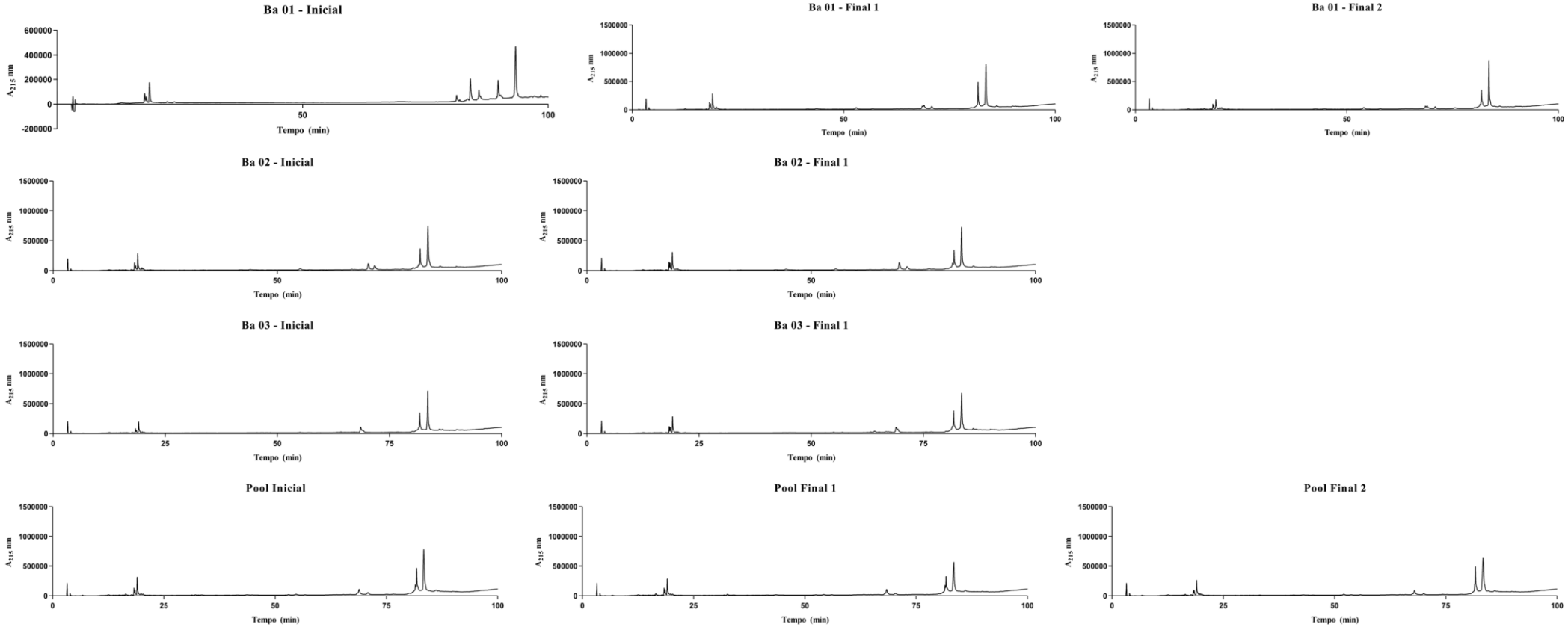
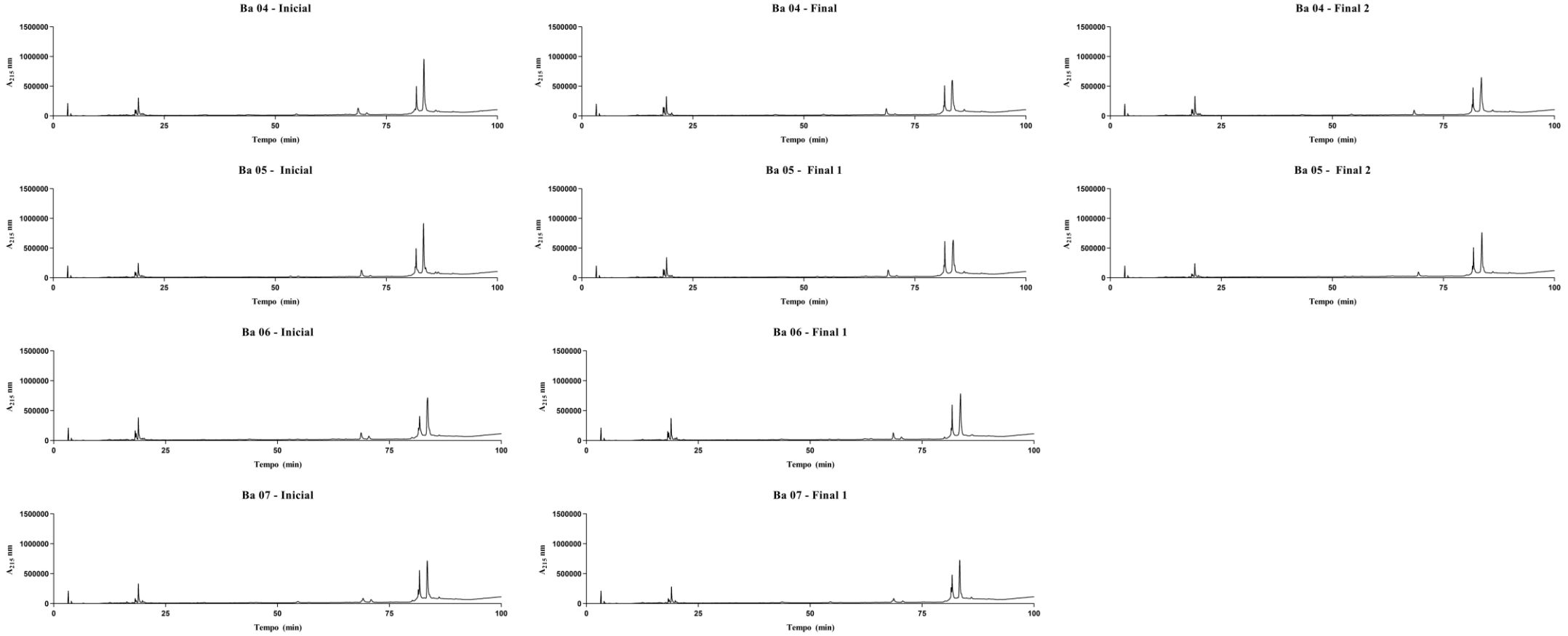


Figura 28. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes fêmeas da espécie *B. alternatus* nos três momentos de mudança na alimentação (Inicial, Final 1 e Final 2). Amostras de 75 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Jasco. As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 min, 5-25% de B por 10 min, 25-45% de B por 60 min, 45-70% de B por 10 min, 70-100% de B por 10 min e 100% de B por 10 min. A cromatografia foi acompanhada por leitura a 215 nm.



4.2.2.3.RP-HPLC – Coleta das frações cromatográficas

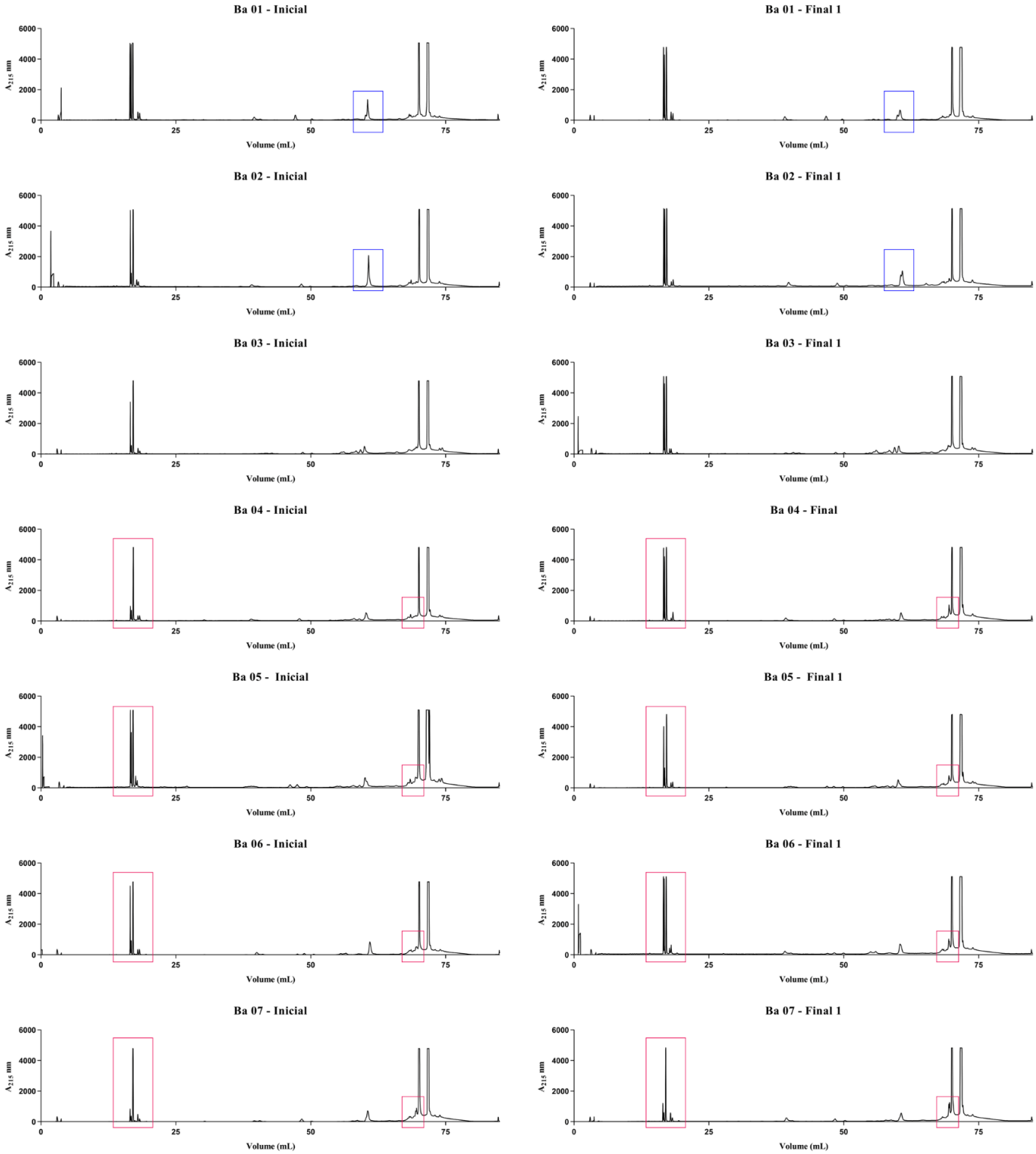
O perfil cromatográfico dos venenos de *B. alternatus* submetidas à mudança de alimentação mostrou diferenças interessantes quando avaliado pelo sistema Akta, corroborando os resultados observados pelo SDS-PAGE. Essas alterações foram observadas em especial no início do perfil, onde eluem, principalmente, BPPs e disintegrinas, e no final do perfil cromatográfico, área onde eluem em especial as SVMP-PIII, assim como no perfil cromatográfico obtido no sistema Jasco.

Assim como no sistema Jasco, é interessante notar que o veneno da espécie *B. alternatus* parece ser menos complexo do que os venenos da espécie *B. moojeni*, contendo menos picos nas regiões entre 25 e 60 mL de eluição. A maior parte das diferenças observadas se deve à quantidade de veneno aplicada em cada sistema (75 µg no sistema Jasco e 500 µg no sistema Akta). A utilização dos dois sistemas traz uma análise mais completa dos venenos.

Com cerca de 20 mL de eluição, podemos observar que a maioria dos indivíduos apresenta um aumento do número de picos majoritários nessa área, passando de um (Ba 4 e Ba 7) ou dois picos (demais), para três picos (quadrados rosas figura 29). Já no final do perfil cromatográfico, com cerca de 70 mL de eluição, há o surgimento de um novo pico. Essa alteração é observada somente nas fêmeas (Ba 4, Ba 5, Ba 6 e Ba 7).

Interessante notar que há um pico com tempo de eluição de aproximadamente 60 mL, que é muito evidente nos machos (exceto indivíduo 3) e que diminui quantitativamente com a alimentação baseada em anfíbios (quadrado azul na figura 29). Nas fêmeas esse pico é mais sutil e não apresenta alterações evidentes no perfil cromatográfico do veneno final.

Figura 29. Perfil cromatográfico dos venenos individuais das serpentes da espécie *B. alternatus* nos dois momentos de mudança na alimentação (Inicial e Final 1). Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 500 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215.



A fim de investigar quais possíveis famílias de proteínas eluem em cada pico, as frações cromatográficas de dois indivíduos, um macho (Ba 1) e uma fêmea (Ba 4) para foram analisadas por meio de SDS-PAGE. Foram coletadas entre 18 (Ba 1 Inicial) e 24 frações (Ba 4). No entanto, as frações não correspondem, necessariamente, a um pico cromatográfico único. Foram coletadas frações que continham picos bem pequenos, a fim de observar a massa molecular e a abundância relativa, mensurada pela intensidade das bandas proteicas no SDS-PAGE, dessas proteínas. Esses resultados estão representados nas figuras 30, 31, 32 e 33.

Os padrões proteicos das frações cromatográficas dos dois indivíduos, mesmo com as diferentes dietas são similares, corroborando os resultados de pouca variação intraespecífica dentro da espécie *B. alternatus*. As duas bandas proteicas predominantes estão presentes nos dois picos finais da eluição (Ba 1 Inicial – frações: 12, 13 e 14; Ba 1 Final – frações: 16, 17 e 18; Ba 4 Inicial e final – frações 19, 20 e 21). É impressionante o número de bandas proteicas observadas no segundo pico majoritário da região usualmente associada às SVMP P-III em todos os indivíduos, indicando que o veneno da espécie *B. alternatus* é rico nessa família de proteínas.

No macho (Ba 1), o pico contido nas frações 8/9 (Inicial) e 12/13 (Final 1) é menos intenso e esse resultado é corroborado pelo SDS-PAGE, em especial a banda da fração 9 (inicial) e 13 (final 1), que aparece com menos intensidade no segundo grupo. Pela massa molecular entre 10 e 15 kDa, é possível que essa banda faça parte da família das PLA_2s.

Com relação à fêmea (Ba 4), as diferenças são ainda mais marcantes. A fração 15 contém uma banda muito majoritária de cerca de 10 kDa no veneno final que não aparece no veneno inicial. Além disso, o pico que aparece na região final do perfil cromatográfico foi eluído nas frações 19 e 20, junto com uma das bandas majoritárias. É notável que há um aumento de intensidade nas bandas de 15 kDa. Essa banda aparece ainda nas frações 20 e 21, com maior intensidade no veneno final em comparação como veneno inicial. Apesar de a fração 16, mesma região que mostrou alteração no macho, não demonstrar aumento ou diminuição da intensidade do pico pelo perfil cromatográfico, é notável a maior intensidade de bandas dessa fração no veneno final da fêmea.

Figura 30. Perfil cromatográfico e gel SDS-PAGE das frações coletadas no RP-HPLC do veneno do indivíduo Ba 1 inicial. Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 500 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Akta (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. As frações foram secas em *Speed Vac* e aplicadas em gel de acrilamida de diferentes concentrações (20%, 15% e 12%).

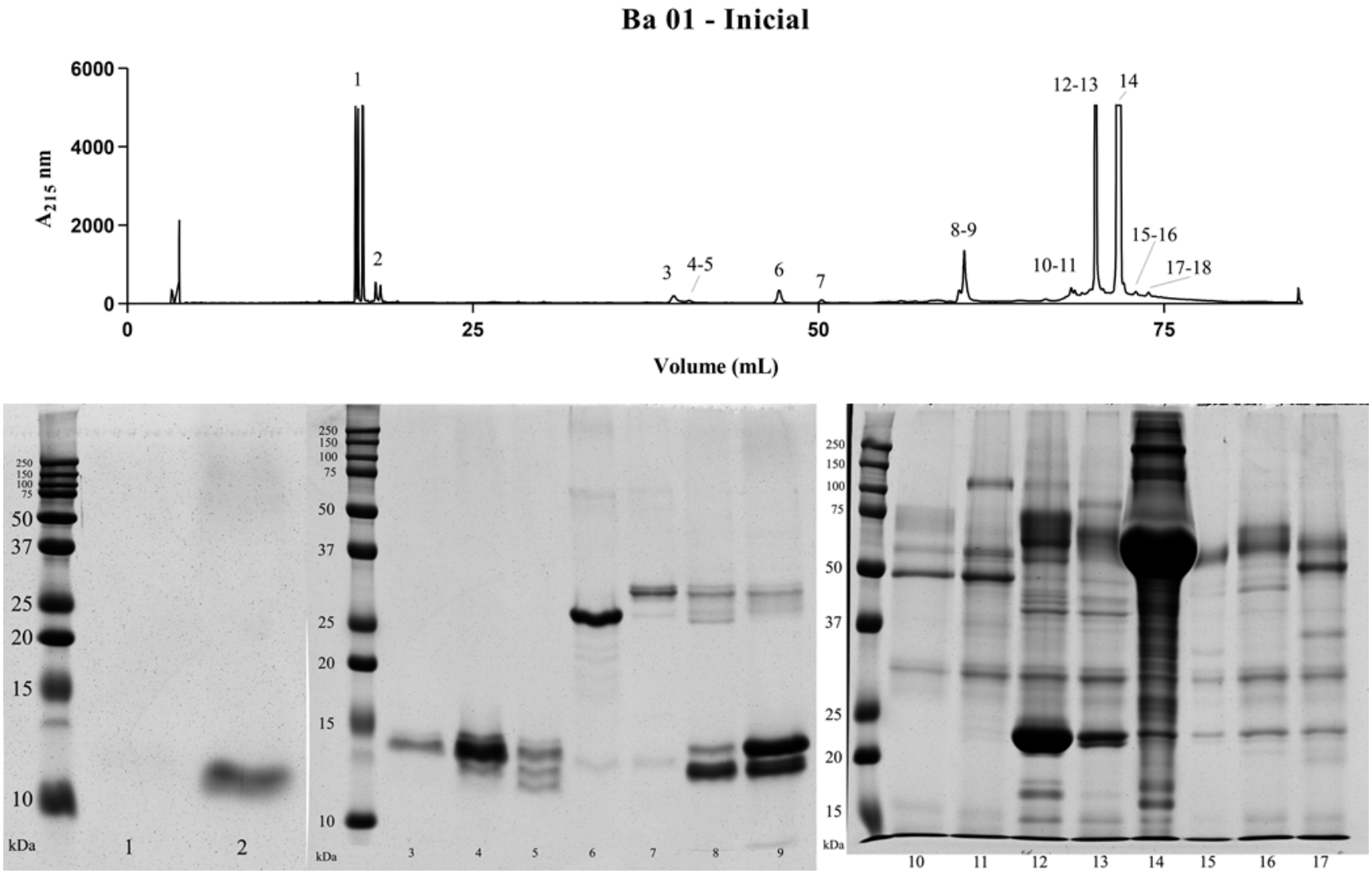


Figura 31. Perfil cromatográfico e gel SDS-PAGE das frações coletadas no RP-HPLC do veneno do indivíduo Ba 1 final 1. Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 500 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Akta (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. As frações foram secas em *Speed Vac* e aplicadas em gel de acrilamida de diferentes concentrações (20%, 15% e 12%).

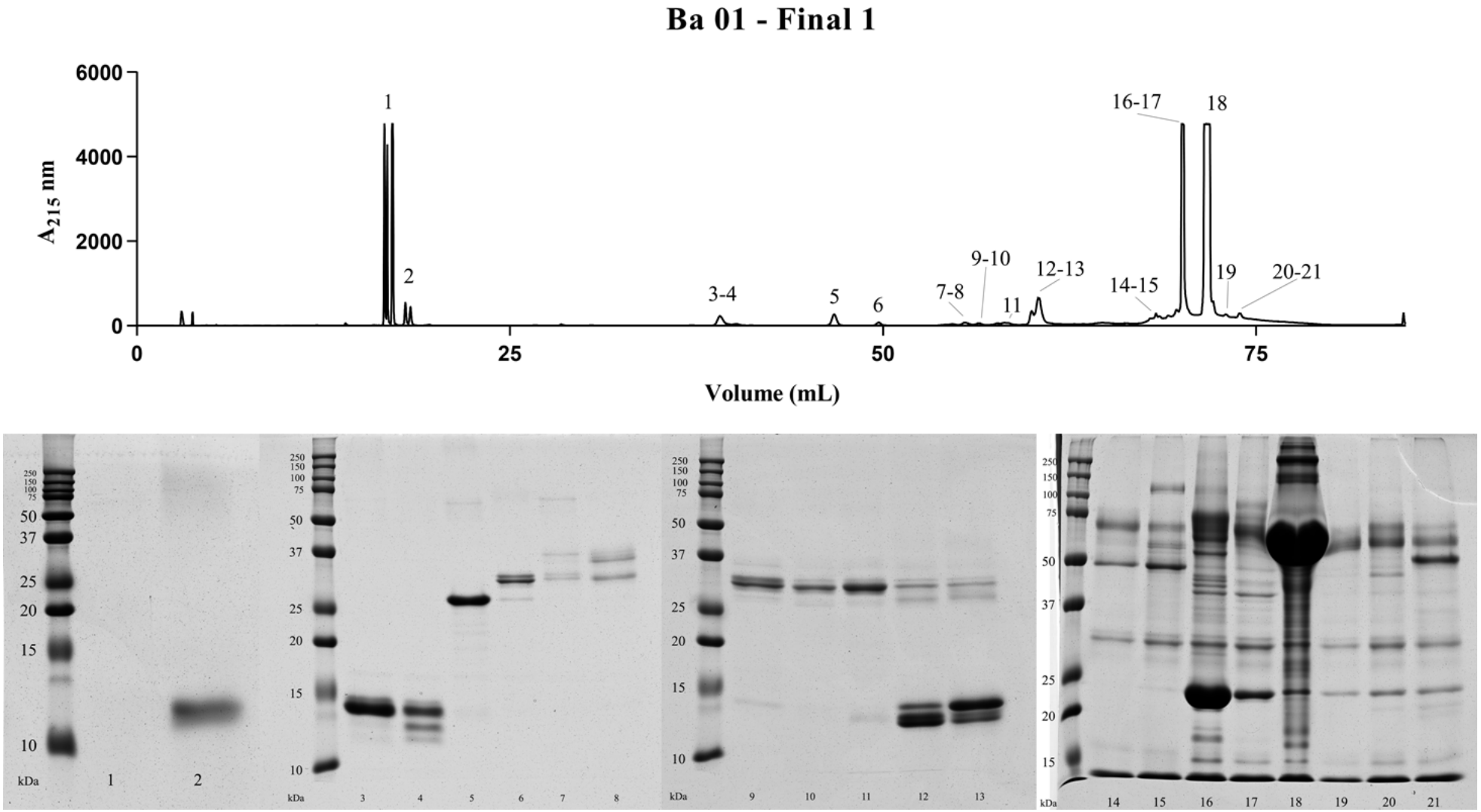


Figura 32. Perfil cromatográfico e gel SDS-PAGE das frações coletadas no RP-HPLC do veneno do indivíduo Ba 4 inicial. Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Akta (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. As frações foram secas em *Speed Vac* e aplicadas em gel de acrilamida de diferentes concentrações (20%, 15% e 12%).

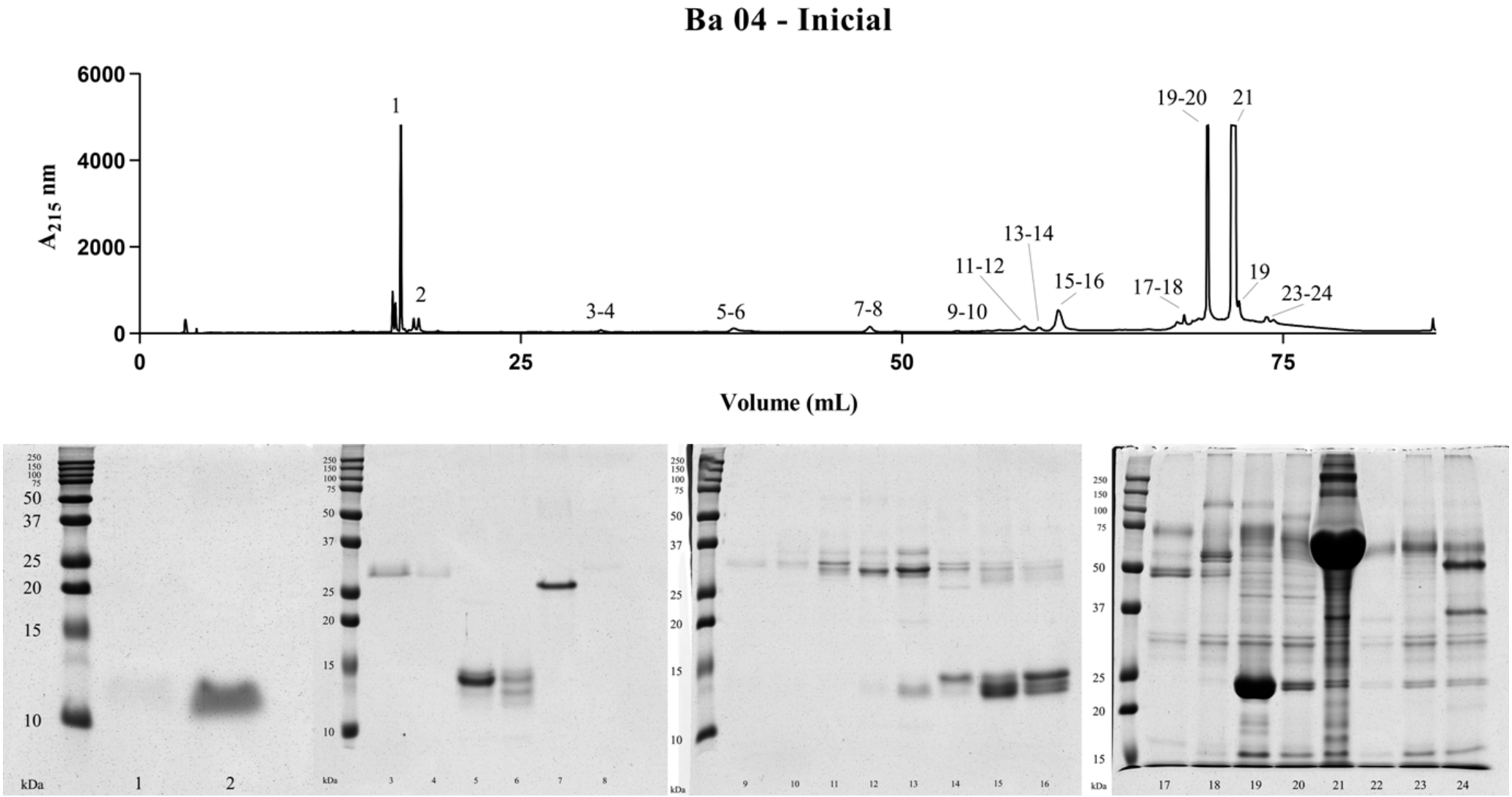
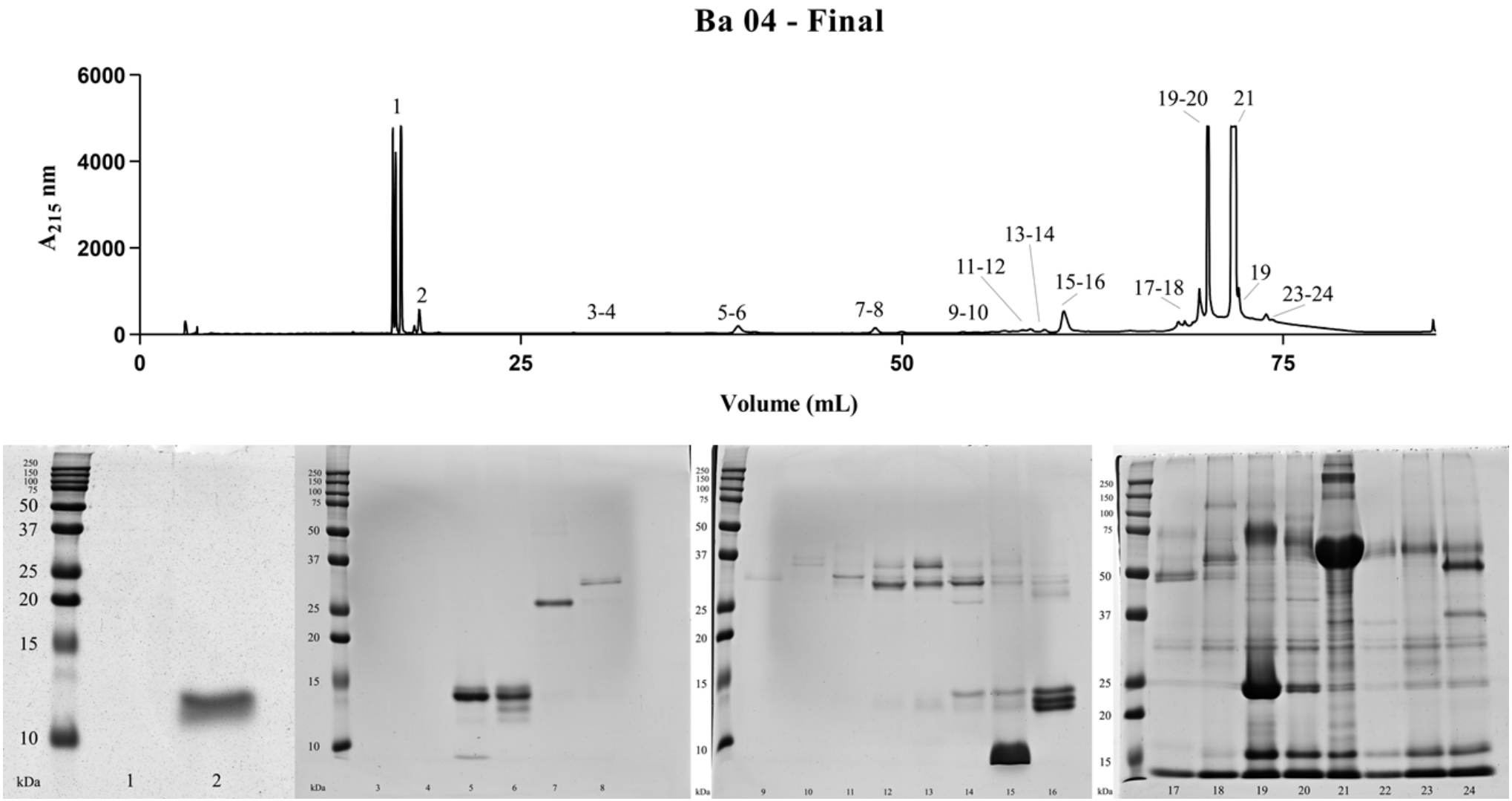


Figura 33. Perfil cromatográfico e gel SDS-PAGE das frações coletadas no RP-HPLC do veneno do indivíduo Ba 4 final 1. Amostras de 500 µg de veneno foram ressuspendidas em 200 µL de solução A (0,1% TFA), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e aplicadas a uma coluna Europa C18 (Teknokroma) em sistema Akta (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas utilizando o seguinte gradiente de solução B (acetonitrila 95% contendo TFA 0,1%): 5% de B por 5 minutos, 5-25% de B por 10 minutos, 25-45% de B por 60 minutos, 45-70% de B por 10 minutos, 70-100% de B por 10 minutos e 100% de B por 10 minutos. A cromatografia foi acompanhada por A215. As frações foram secas em *Speed Vac* e aplicadas em gel de acrilamida de diferentes concentrações (20%, 15% e 12%).

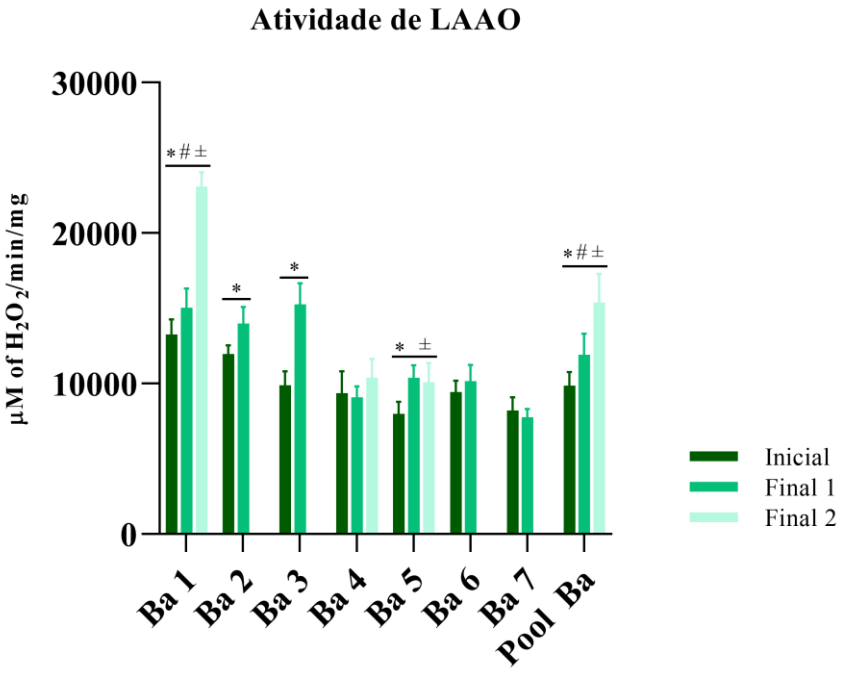


4.2.3. Caracterização enzimática dos venenos

4.2.3.1. Atividade de LAAO

Analisando a atividade de LAAO, pode-se observar que cinco dos sete indivíduos estudados e o *pool* apresentaram aumento nessa atividade com a alimentação baseada em anfíbios (figura 34). O indivíduo Ba 4 manteve a atividade, enquanto o único indivíduo que apresentou diminuição foi o Ba 7. Com o retorno à alimentação com mamíferos, dois dos três indivíduos analisados continuaram a apresentar aumento na atividade de LAAO, enquanto apenas o indivíduo Ba 5 manteve essa atividade similar ao veneno final 1. O *pool* dos venenos analisados também apresentou aumento nos dois períodos de alimentação. Mesmo observando aumento da atividade, não foi possível notar mudança aparente na coloração dos venenos, uma vez que a coloração amarelada dos venenos de serpentes é atribuída à esta família de enzimas (RODRIGUES et al., 2009).

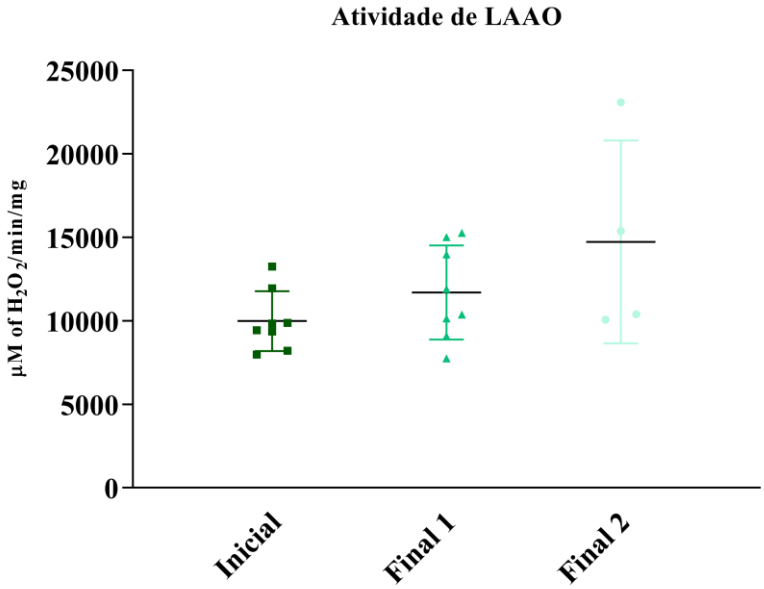
Figura 34. Atividade de L-aminoácido oxidase dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2 A atividade de LAAO foi determinada utilizando L-metionina como substrato, e incubando a reação a 37 ºC por 60 minutos. *p < 0,05, entre veneno inicial e final, #p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2, ± p < 0,05, entre veneno inicial e final 2.



A comparação dos resultados dos grupos em análise (inicial, final 1 e final 2) corrobora os resultados observados individualmente, como pode-se observar na figura 35. Apesar de não haver diferença estatística, podemos observar que a atividade de LAAO

apresenta uma tendência a aumento após um ano de alimentação baseada em anfíbios. Já após o retorno, também há aumento dessa atividade nos indivíduos analisados. É interessante notar que, de maneira diferente ao observado para a espécie *B. moojeni*, os intervalos de distribuição dessa atividade são menores, demonstrando que há maior homogeneidade e, portanto, menor variação individual dessa atividade enzimática dentro da espécie *B. alternatus*.

Figura 35. Comparação da atividade enzimática da LAAO do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade de LAAO foi determinada utilizando L-metionina como substrato e incubando-se a reação a 37 ºC por 60 minutos.

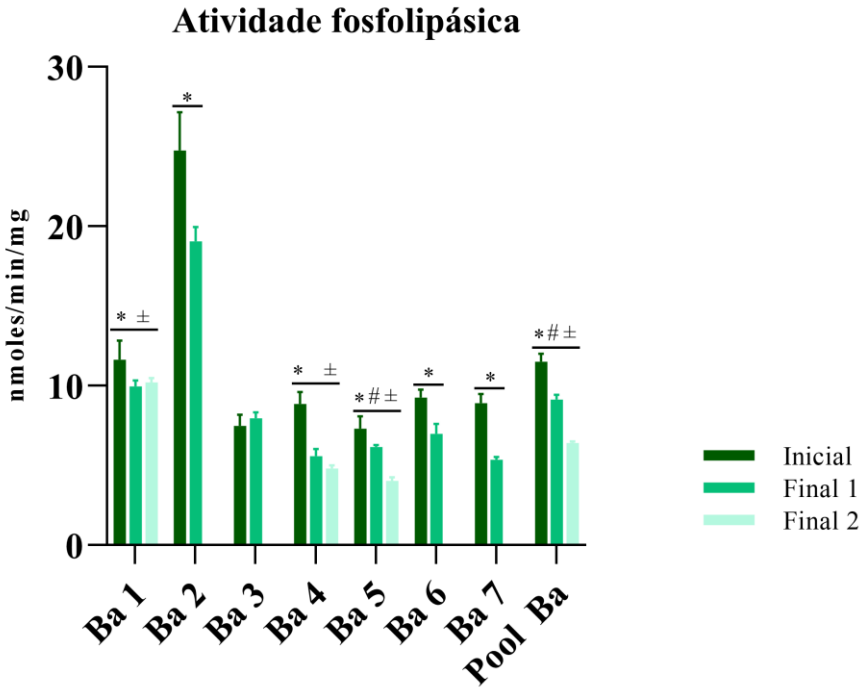


4.2.3.2.Atividade fosfolipásica

De maneira diferente da atividade de LAAO, a atividade fosfolipásica, em geral, tende a diminuir com a alteração da dieta na espécie *B. alternatus*. Das sete amostras analisadas, seis indivíduos mais o pool apresentaram atividade diminuída (Figura 36). O indivíduo Ba 3 não apresentou modificação na atividade durante o período. Já com o retorno à alimentação com mamíferos, a atividade das PLA_2s demonstrou diminuição em 2 dos 3 indivíduos analisados e se manteve igual ao veneno final 1 apenas no macho (Ba 1). O *pool* dos venenos corroborou as observações dos venenos individuais, demonstrando uma constante diminuição em ambos os venenos final 1 e final 2 em comparação com o veneno inicial.

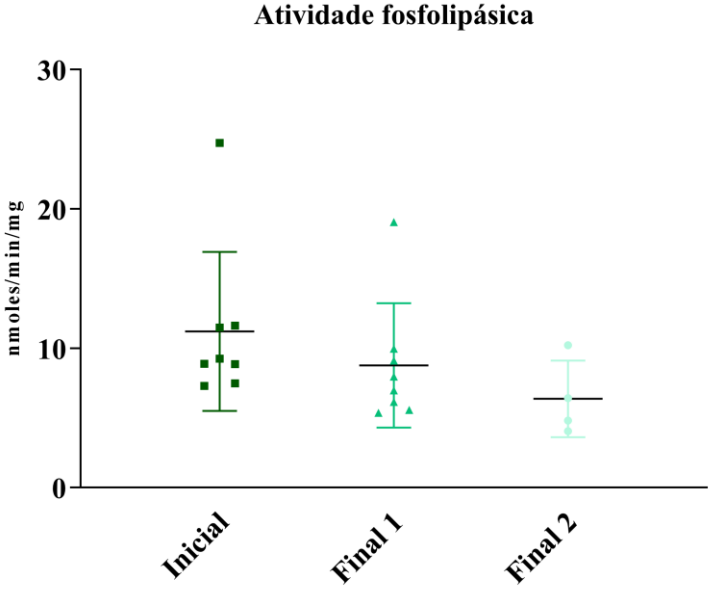
Diferentemente do que foi observado em *B. moojeni*, a dieta com anfíbios parece levar a um padrão de diminuição na atividade fosfolipásica para a espécie *B. alternatus*. Com base no SDS-PAGE, esse resultado é corroborado já que podemos observar alteração na região entre 10 e 15 kDa. Interessante notar também que o perfil cromatográfico dos machos (Ba 1 e Ba 2) demonstra uma diminuição do pico com eluição em aproximadamente 60 mL, que, de acordo com perfis cromatográficos de serpentes do gênero *Bothrops*, é a região onde eluem as PLA_2s. Para confirmar esses resultados, deve-se identificar esse pico através de espectrometria de massas.

Figura 36. Atividade fosfolipásica dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2. A atividade fosfolipásica foi obtida utilizando o NOBA como substrato, incubado-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. A leitura foi realizada a 425 nm. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final 1, # p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2; e ±p < 0,05, entre veneno inicial e final 2.



Comparando os três grupos (inicial, final 1 e final 2) não se observou diferença estatística entre eles (figura 37). Porém, assim como nos valores individuais, nota-se uma tendência à diminuição da atividade fosfolipásica com a alteração da dieta para anfíbios. E mesmo após o retorno à alimentação baseada em mamíferos, essa diminuição ainda é observada. Nota-se que um indivíduo (Ba 2) apresenta atividade superior aos demais indivíduos, ficando fora do desvio padrão apresentado.

Figura 37. Comparação da atividade enzimática da PLA$_2$ do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade fosfolipásica foi obtida utilizando o NOBA como substrato, incubado-se a reação a 37 ºC por 60 minutos. A leitura foi realizada a 425 nm.



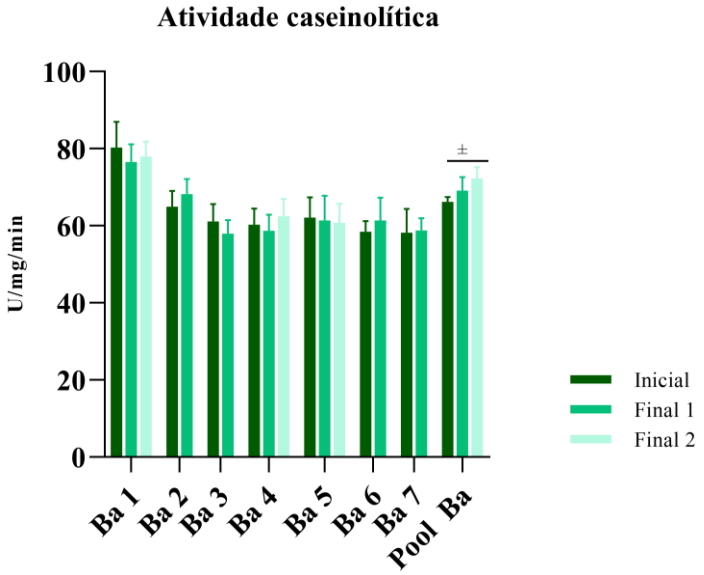
4.2.3.3. Atividade proteolítica

a. Atividade caseinolítica

A atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína, demonstrada na figura 38, não apresentou diferença significativa em nenhum indivíduo após a mudança de dieta para anfíbios. Também não houve mudança com o retorno à dieta com mamíferos. A única diferença observada foi no *pool* dos venenos, em que o veneno inicial é diferente do veneno final 2.

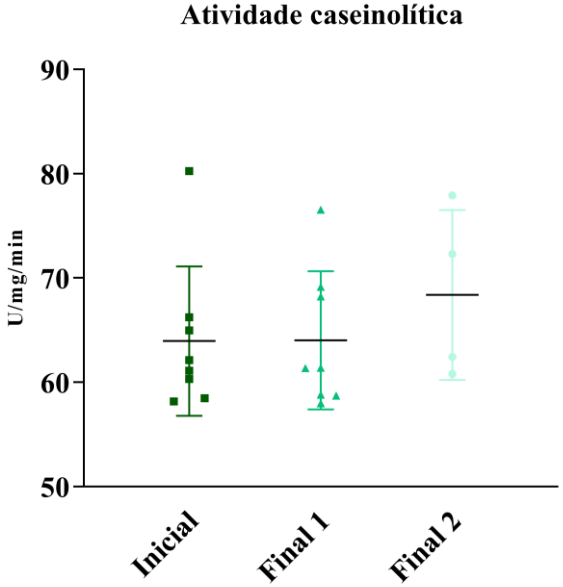
Também não foi possível estabelecer nenhuma tendência à mudança. Os indivíduos Ba 5 e Ba 7 não apresentaram alteração da atividade caseinolítica com a alteração da dieta. Os indivíduos Ba 1, Ba 3 e Ba 4 demonstraram uma ligeira queda na atividade com a dieta baseada em anfíbios, que é revertida com o retorno à dieta com mamíferos nos dois indivíduos sobreviventes (Ba 1 e Ba 4), porém nenhuma dessas modificações apresentou significância estatística. Ainda, os indivíduos Ba 2 e Ba 6 demonstraram ligeiro aumento nessa atividade com a dieta baseada em anfíbios, mas novamente sem significância estatística. Esses resultados indicam que a alteração da dieta parece não promover alteração na atividade proteolítica sobre a caseína no veneno das serpentes da espécie *B. alternatus*.

Figura 38. Atividade proteolítica sobre a caseína dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2. A atividade caseinolítica foi estabelecida utilizando azocaseína como substrato. Após incubação por 90 min a 37 ºC, a leitura foi realizada a 450 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg). *p < 0,05, entre o veneno inicial e final, #p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2, ± p < 0,05, entre veneno inicial e final 2.



A comparação da atividade caseinolítica entre os três grupos (inicial, final 1 e final 2) da espécie *B. alternatus* (figura 39) corrobora os resultados individuais observados, indicando que a dieta baseada em anfíbios não afeta essa atividade enzimática.

Figura 39. Comparação da atividade proteolítica sobre a azocaseína do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade caseinolítica foi estabelecida utilizando azocaseína como substrato. Após incubação por 90 min a 37 ºC, a leitura foi realizada a 450 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por minuto por miligrama de proteína (U/min/mg).

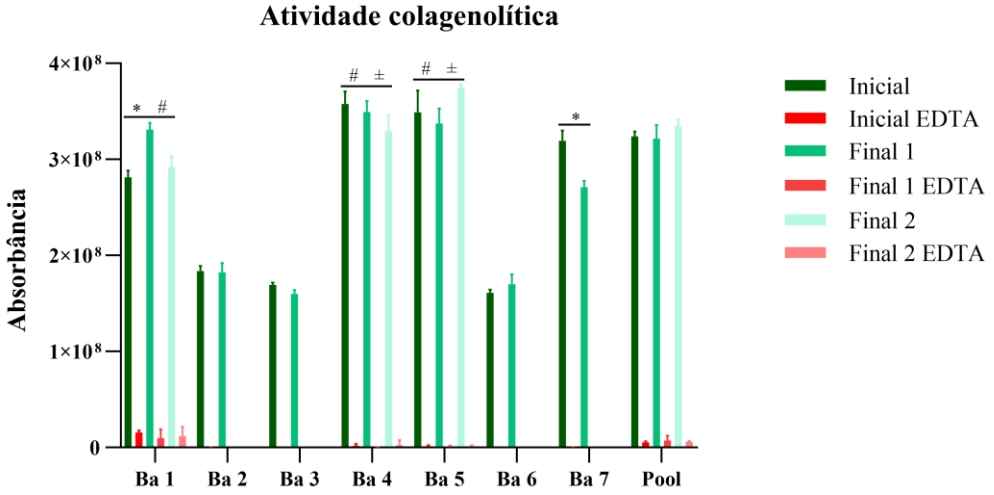


b. Atividade colagenolítica

A atividade proteolítica sobre o colágeno usando como substrato a pele de porco demonstrou resultados interessantes para a espécie *B. alternatus*. Pode-se observar poucas alterações com relação à dieta com anfíbios e mesmo após o retorno com a dieta com mamíferos (figuras 40 e 42). Os indivíduos Ba 1 e Ba 6 apresentaram aumento da atividade proteolítica com a dieta baseada em mamíferos, enquanto os indivíduos Ba 3, Ba 4, Ba 5 e Ba 7 apresentaram discreta diminuição dessa atividade com essa dieta. O indivíduo Ba 2 não demonstrou nenhuma alteração aparente na atividade. Com o retorno à dieta baseada em mamíferos dois indivíduos (Ba 1 e Ba 4) apresentaram diminuição da atividade em comparação com o veneno final 1 e um indivíduo (Ba 5) apresentou aumento, demonstrando que não há um padrão de alteração dessa atividade com a dieta para a espécie *B. alternatus*.

Com relação à inibição causada pelo EDTA, o resultado de todos os indivíduos demonstrou inibição quase total da atividade proteolítica sobre o colágeno, de maneira diferente a espécie *B. moojeni*, que manteve uma atividade residual considerável mesmo na presença de EDTA (entre cerca de 12 a 57%). Isso demonstra que as SVMP são as principais responsáveis por essa atividade em *B. alternatus*. Esse resultado pode ser corroborado ao observar o SDS-PAGE, que mostrou uma banda intensa na região entre 50 e 75 kDa, em que usualmente são encontradas as SVMP P-III. Enquanto a região entre 25 e 50 kDa, onde se encontram as SVSP, outra família de proteases presente nos venenos de serpentes, estão presentes poucas bandas levemente coradas. Assim como o perfil cromatográfico, que também demonstra dois picos bem intensos eluidos no final da corrida, entre 60 e 75 minutos, região em que eluem as SVMP P-III. Já a região entre 45 e 60 minutos do perfil cromatográfico, que eluem geralmente em venenos botrópicos uma mistura de SVSP, PLA2s e algumas outras famílias proteicas (GAY et al., 2015), é pobre no veneno de *B. alternatus*.

Figura 40. Atividade proteolítica sobre o colágeno dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2 na ausência ou presença de EDTA. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrato. Após incubação por 60 min a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP.



Quando comparamos a atividade sobre o colágeno entre os três grupos estudados também não é observado diferença significativa com as diferentes dietas (figura 41). Porém é notável o efeito do EDTA, já observado nos venenos individuais, sobre a atividade colagenolítica do veneno da espécie *B. alternatus*.

Figura 41. Comparação da atividade proteolítica sobre o colágeno do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrado. Após incubação por 60 min a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP.

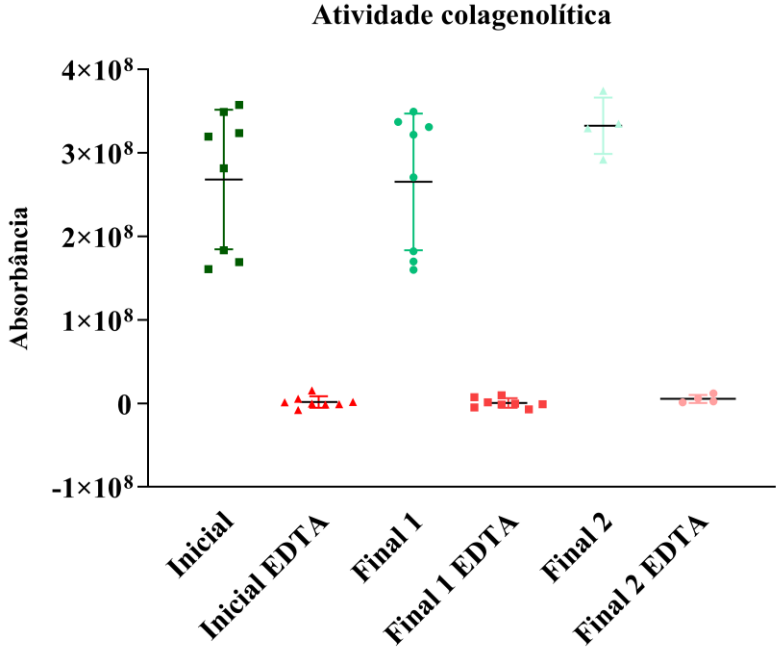
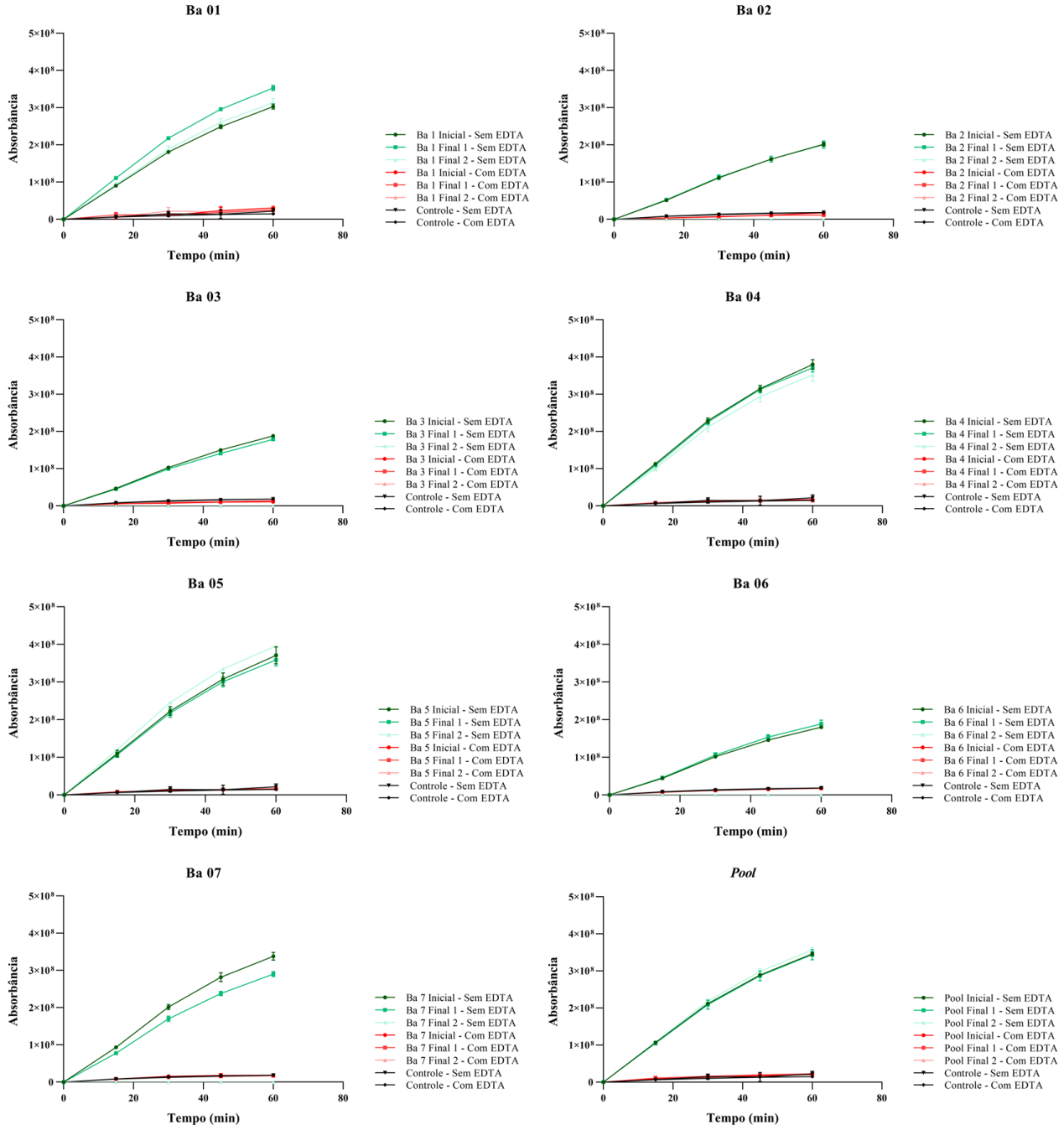


Figura 42. Atividade proteolítica sobre o colágeno dos venenos de *B. alternatus* inicial, final 1 e final 2 na ausência ou presença de EDTA. A atividade colagenolítica foi estabelecida utilizando gelatina de pele de porco conjugada com fluorescência como substrato. Após incubação por 60 minutos a 37 ºC, a leitura foi realizada com absorção a 495 nm e emissão a 515 nm. O veneno foi incubado com EDTA por 15 min a 37 ºC antes de adicionar o substrato, para avaliar a inibição de SVMP.



4.2.4. Resumo das atividades enzimáticas de B. alternatus

Na tabela 4, encontra-se um resumo comparativo das atividades enzimáticas do veneno das serpentes *B. alternatus* submetidas à alteração da dieta.

Tabela 4. Resumo das atividades enzimáticas dos venenos das serpentes da espécie *B. alternatus*. A cor verde indica o maior valor da atividade dentre os três momentos de alimentação, a cor amarela indica o valor intermediário da atividade e a cor vermelha indica o menor valor da atividade.

B. alternatus												
	LAAO (uM de H202/min/mg)			**PLA_2 (nmoles/min/mg)**			**Caseinolítica (U/min/mg)**			**Colagenolítica (unidades de absorbância)**		
	Inicial	Final 1	Final 2	Inicial	Final 1	Final 2	Inicial	Final 1	Final 2	Inicial	Final 1	Final 2
Ba 1	13261,71	15030,06	23092,58	11,64	9,97	10,22	80,253	76,562	77,932	2,82E+08	3,31E+08	2,92E+08
Ba 2	11952,78	13994,07	-	24,75	19,06	-	64,976	68,224	-	1,84E+08	1,82E+08	-
Ba 3	9883,16	15264,31	-	7,49	7,97	-	61,107	57,982	-	1,69E+08	1,60E+08	-
Ba 4	9370,8	9094,35	10393,86	8,87	5,58	4,82	60,308	58,726	62,433	3,58E+08	3,49E+08	3,30E+08
Ba 5	7983,23	10385,43	10081,89	7,31	6,15	4,05	62,127	61,408	60,824	3,49E+08	3,37E+08	3,75E+08
Ba 6	9438,64	10156,35	-	9,26	6,98	-	58,496	61,354	-	1,61E+08	1,70E+08	-
Ba 7	8214,14	7755,65	-	8,9	5,37	-	58,174	58,822	-	3,20E+08	2,71E+08	-
Pool	9853,77	11918,91	15386,05	11,5	9,13	6,42	66,234	69,142	72,322	3,24E+08	3,22E+08	3,35E+08

4.2.5. Caracterização fisiopatológica dos venenos de B. alternatus

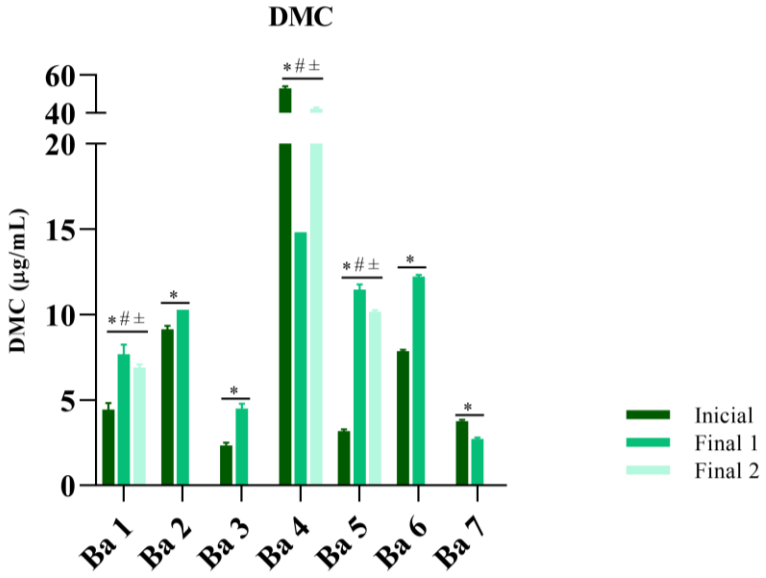
4.2.5.1.Atividade coagulante

Observamos que quando comparamos o veneno inicial e final 1, dos sete indivíduos analisados, cinco deles apresentaram maior DMC no veneno final 1 (figura 43). Dessa maneira, o veneno desses cinco indivíduos se tornou menos coagulante com a mudança da dieta. Apenas os indivíduos Ba 4 e Ba 7 apresentaram aumento da atividade coagulante (diminuição da DMC) com a alimentação baseada em anfíbios.

Todos os indivíduos da espécie *B. alternatus* demonstraram um valor similar da DMC, exceto o indivíduo Ba 4, que se mostrou menos coagulante que os demais espécimes estudados. Estudando a espécie *B. moojeni*, encontramos uma variação individual maior com relação a DMC em comparação com *B. alternatus*.

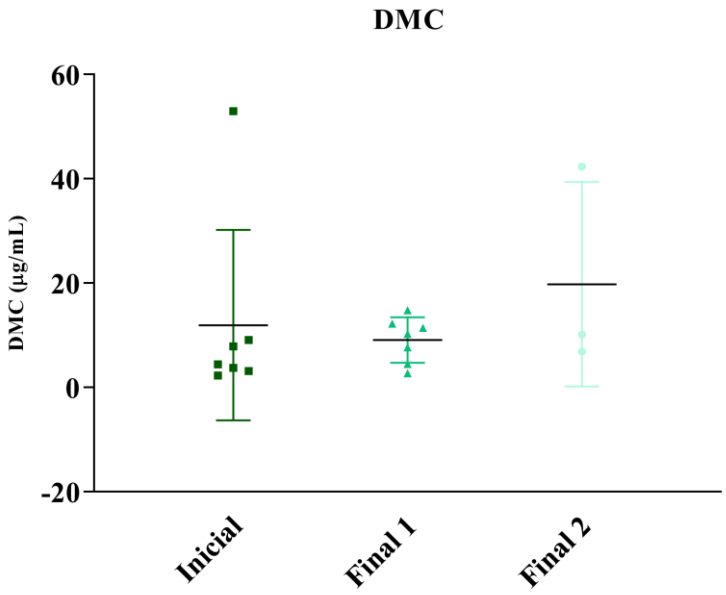
Todos os venenos final 2 retornaram aos parâmetros similares ao veneno inicial. O veneno do indivíduo Ba 4, apesar de pouco coagulante e de apresentar um padrão diferente dos demais, também apresentou retorno à atividade inicial. Esse resultado também foi diferente do demonstrado para *B. moojeni*, que não apresentou retorno à atividade coagulante inicial. Dessa maneira, evidencia-se que a dieta baseada em anfíbios afeta de forma negativa a atividade coagulante do veneno da espécie *B. alternatus*, porém o retorno à dieta baseada em mamíferos, natural da espécie, faz com que o veneno retorne aos parâmetros inicialmente encontrados.

Figura 43. Dose mínima coagulante dos venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A DMC é estabelecida pela menor quantidade de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37 ºC. *p < 0,05, entre o veneno inicial e final, #p < 0,05, entre veneno final 1 e final 2, ± p < 0,05, entre veneno inicial e final 2. ANOVA com Tukey como teste a posteriori.



Comparando os três grupos nas diferentes dietas (figura 44), não há diferença estatística entre eles. Porém, de maneira impressionante, o gráfico *box plot* demonstra uma tendência ao aumento da atividade coagulante (menor DMC), um resultado diferente do observado nos valores individuais. É também notável a diferença do indivíduo Ba 4, quando comparado aos demais. Apenas na dieta baseada em anfíbios (final 1) esse indivíduo apresentou valores similares aos outros indivíduos da mesma espécie. Analisando os indivíduos podemos notar que o Bm 4 foi o que apresentou uma mudança mais radical, diminuindo a DMC cerca de 3,5 vezes (inicial: 53 µg/mL e final 1: 14,83 µg/mL), enquanto os aumentos na DMC foram mais sutis. Portanto, o resultado demonstrado no *box plot* se deve, provavelmente, a esse indivíduo.

Figura 44. Comparação da atividade coagulante do veneno da espécie *B. alternatus* entre os grupos inicial, final 1 e final 2. A DMC é estabelecida pela menor quantidade de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37 ºC.

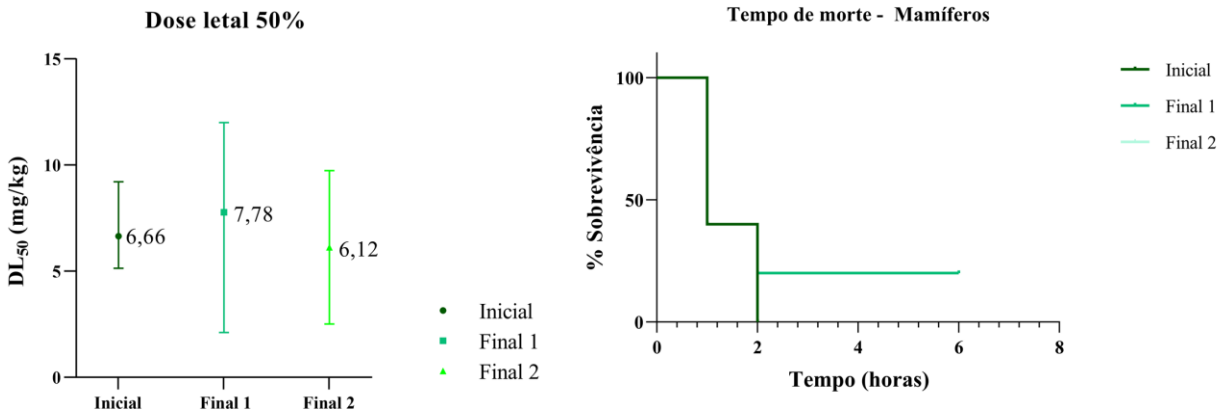


4.2.5.2.Dose letal 50% em camundongos

Para realizar as atividades *in vivo* optou-se pelo *pool* dos três indivíduos que sobreviveram até o final do retorno com a alimentação baseada em mamíferos (Ba 1, Ba 4 e Ba 5). Analisando a dose letal 50% dos venenos da espécie *B. alternatus* nos três diferentes momentos, pudemos observar que o veneno final 1 tem uma DL_{50} ligeiramente maior do que os demais venenos (inicial: 133,17 µg/animal ou 6,66 mg/kg; final 1: 155, 63 µg/animal ou 7,78 mg/kg; e final 2: 122,59 µg/animal ou 6,12 mg/kg), implicando em

menor letalidade, e os venenos inicial e final 2 são comparáveis (figura 45). Porém, os intervalos de confiança são altos e não há diferença estatística entre a DL_{50} do *pool* de venenos dos três momentos avaliados.

Figura 45. Dose letal 50% e curva de sobrevivência de camundongos inoculados com o pool de venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. Cinco camundongos Swiss machos foram injetados via intraperitoneal com 500 µL de diferentes doses do pool de venenos dos grupos inicial, final 1 e final 2. A sobrevivência de cada animal foi registrada por 48 horas. A dose letal 50% foi calculada pela análise de probitos. O primeiro gráfico (esquerda) representa as doses letais e os valores dos limites superior e inferior. O segundo gráfico (direita) demonstra o número de camundongos mortos ao longo do tempo de observação dos três grupos experimentais inoculados com a dose de 253,1 µg/animal.



Analisando a curva de sobrevivência dos animais, é notável a semelhança entre os venenos final 1 e final 2, que apresentaram curvas idênticas. O grupo inicial foi o único que matou todos os animais. Porém, todos os venenos já começaram a matar os animais a partir da primeira hora após a inoculação. Esse resultado é diferente do observado em *B. moojeni*, já que o veneno inicial dessa espécie começou a matar logo na primeira hora após a inoculação.

Durante o experimento foram observados o comportamento e os sinais clínicos dos animais após a aplicação dos venenos. Os animais injetados com veneno de *B. alternatus* apresentaram um comportamento de pular que foi associado pela veterinária Dra. Kathleen Grego como expressão de dor. Isso não foi observado nos animais injetados com veneno de *B. moojeni*, que apresentaram normalmente um comportamento de prostração e apatia. De fato, em comunicação pessoal com o Dr. Daniel Stuginski, que já foi picado por ambas as espécies, foi relatado que a picada de *B. alternatus* causou uma dor muito mais acentuada do que o veneno de *B. moojeni*. A fim de evitar a dor nos animais, foi proposto por Herrera et al (2018) e Gutierrez et al (2014) o uso de tramadol ou morfina nos testes com venenos de serpentes. Eles demonstraram que esses

analgésicos não têm influência nos testes e melhoram o bem-estar animal (GUTIÉRREZ; HERRERA, 2014; HERRERA et al., 2018). O nosso grupo adotará a administração desses medicamentos na realização de testes *in vivo*.

Após a morte dos camundongos, foi realizada a necropsia desses animais para observar a ação do veneno. O maior achado da necropsia para o veneno de *B. alternatus* foi a presença de sangue e de coágulos na cavidade abdominal e o músculo diafragma hemorrágico (figura 46). A hemorragia se estendia por toda a cavidade, inclusive no escroto dos animais. O hematoma no escroto foi visto nos animais sobreviventes até 48 horas após a aplicação. Esses achados demonstram que o veneno de *B. alternatus* apresenta uma atividade hemorrágica intensa.

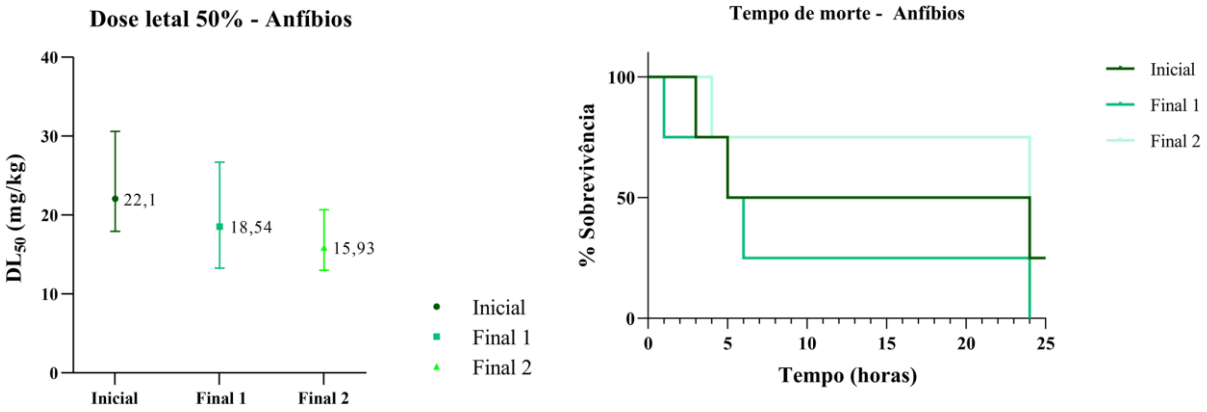
Figura 46. Fotos da necropsia de camundongos swiss machos após a aplicação de 12,65 µg/g de animal do veneno de *B. alternatus*. A primeira imagem demonstra a hemorragia na cavidade abdominal dos animais. A segunda imagem mostra o diafragma intensamente hemorrágico.

4.2.5.3.Dose letal 50% em anfíbios (L. catesbeianus)

De maneira contrária ao observado na DL_{50} realizada em camundongos, o veneno inicial parece ser menos letal (1104,91 µg/animal ou 22,1 mg/kg) para anfíbios da espécie *L. catesbeianus* do que os venenos final 1 e final 2 (926,90 µg/animal ou 18,54 mg/kg e 796,38 µg/animal ou 15,93 mg/kg, respectivamente). Para anfíbios, os venenos final 1 e final 2 apresentam DL_{50} semelhantes (figura 47), contrário ao observado na DL_{50} feita em camundongos, em que se observa uma tendência ao retorno à letalidade inicial.

É notável a maior quantidade de veneno necessária para matar os anfíbios em comparação com os camundongos. Andrade, Abe e dos Santos observaram essa tendência analisando o veneno de *B. moojeni* (ANDRADE; ABE, 1996). Não há resultados similares para a espécie *B. alternatus*, já que é uma espécie especialista e se alimenta de mamíferos ao longo de todo o ciclo de vida.

Figura 47. Dose letal 50% e curva de sobrevivência de anfíbios da espécie *L. catesbeianus* inoculados com o *pool* de venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. Cinco rãs-touro foram injetadas via intracelomática com 500 µL de diferentes doses do veneno dos grupos inicial, final 1 e final 2. A sobrevivência de cada animal foi registrada por 48 horas. A dose letal 50% foi calculada pela análise de probitos. O primeiro gráfico (esquerda) representa as doses letais e os valores dos limites superior e inferior. O segundo gráfico (direita) demonstra o número de rãs mortas ao longo do tempo de observação dos três grupos experimentais inoculados com a dose de 143,7 µg/animal.



Analisando a curva de sobrevivência dos anfíbios é notável o intervalo de tempo para as mortes acontecerem. O veneno inicial foi o único que não matou todos os animais durante o tempo de 24 horas. As mortes começaram após 1 hora no veneno final 1, mas apenas após 3 horas no veneno inicial e 4 horas no veneno final 2. Podemos observar, após esse período, que há um intervalo grande nos três grupos e as demais mortes ocorrem após 24 horas da inoculação. Esse fenômeno não foi observado na espécie *B. moojeni*.

Também se observou a sintomatologia e o tempo de morte das rãs-touro durante o experimento. Os anfíbios são animais que não expressam muita dor ou qualquer outro sinal, permanecendo passivos durante todo o experimento. Alguns animais apresentaram secreção sanguinolenta pela boca e um animal apresentou prolapso da cloaca. O veneno final 1 matou o primeiro animal logo na primeira hora após a aplicação, porém foi a única morte que ocorreu mais cedo. As mortes dos animais começaram a ocorrer de maneira mais frequente após cerca de 4 horas da aplicação do veneno, e alguns animais chegaram a morrer após 48 horas de aplicação, já no fim da observação. Esse resultado difere do

observado em camundongos, já que os animais tendem a morrer nas primeiras 6 a 8 horas de experimento, e, após esse período, começam a se recuperar. É raro observar mortes em camundongos após 48 horas de experimento.

As necrópsias das rãs-touros mortas no envenenamento demonstraram uma hemorragia localizada nos pulmões dos animais (figura 48). Não foi observado nenhum foco de hemorragia em outros órgãos e na cavidade celomática.

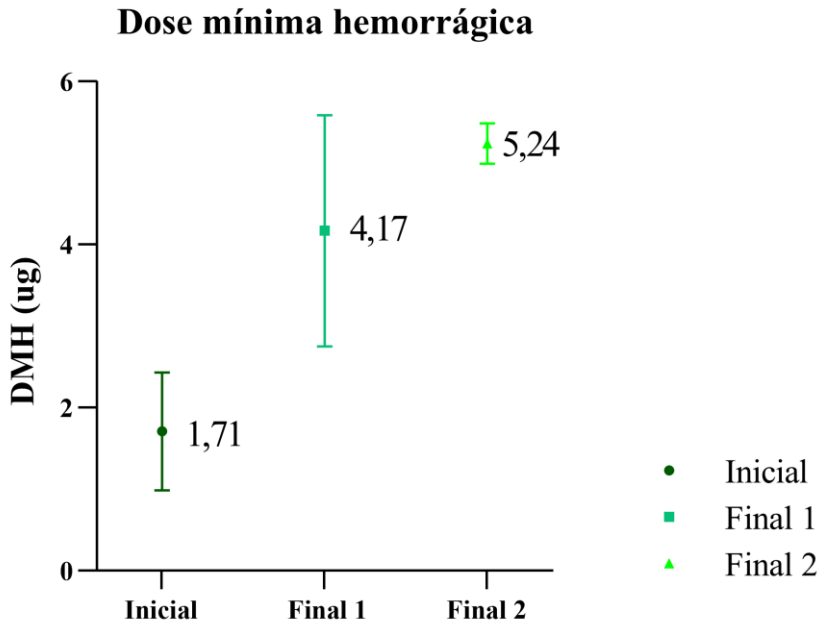
Figura 48. Foto da necropsia de rãs-touro da espécie *L. catesbeianus* após a aplicação de veneno de *B. alternatus*. É possível observar a hemorragia localizada nos pulmões dos animais.

4.2.5.4. Dose mínima hemorrágica

O veneno inicial de *B. alternatus* apresentou a maior atividade hemorrágica entre os três grupos (1,71±0,29 µg). A dieta baseada em anfíbios diminuiu a atividade hemorrágica de maneira significativa (figura 49), porém o retorno com dieta baseada em mamíferos não retornou à atividade ao estado inicial, demonstrando uma similaridade nos venenos final 1 e final 2 (4,17±0,57 µg e 5,24±0,10 µg, respectivamente). Esse resultado corrobora os achados de necropsia da DL_{50}, que demonstrou a intensa hemorragia causada pelo veneno de *B. alternatus*. Mesmo o veneno final 1 e final 2 são cerca de duas vezes mais hemorrágicos que o veneno de *B. moojeni* estudados.

Quando se analisou os venenos de *B. moojeni*, pudemos observar que o veneno inicial é similar ao veneno final 2, indicando que essa atividade retornou aos padrões esperados após a volta da dieta baseada em mamíferos. Isso não foi observado nas serpentes da espécie *B. alternatus*, já que o veneno final 2 continuou a apresentar perda da atividade hemorrágica.

Figura 49. Dose mínima hemorrágica dos venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A atividade hemorrágica foi obtida aplicando 100 µL de veneno em diferentes concentrações via intradérmica em camundongos Swiss machos. Após 3 horas, os camundongos foram eutanasiados e o halo hemorrágico foi mensurado com o auxílio do software ImageJ.



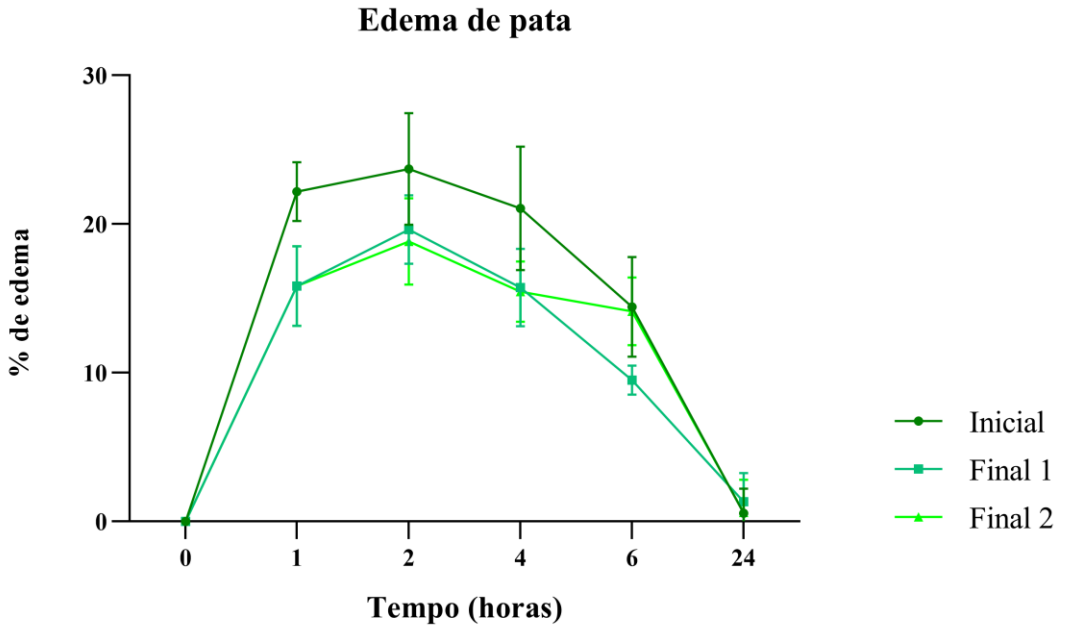
4.2.5.5. Atividade edematogênica

A atividade edematogênica do veneno inicial foi a mais intensa em comparação com os venenos final 1 e final 2 (figura 50). Além do gráfico, a área sob a curva corroborou essa observação (inicial – 81,65; final 1 – 61,40; final 2 – 64,58), demonstrando a semelhança entre os venenos final 1 e final 2 para essa atividade. Surpreendentemente o veneno inicial é estatisticamente diferente do veneno final 1, porém não é estatisticamente diferente do veneno final 2. Essa observação pode ser decorrente da semelhança entre os *pools* de veneno inicial e final 2 a partir de 6 horas após a inoculação.

As SVMPs são as principais responsáveis pelos efeitos pró-inflamatórios induzidos por venenos botrópicos, porém as PLA_2s e SVSPs também atuam na indução

desses efeitos (MAMEDE et al., 2016; ZYCHAR et al., 2010). Mamede e colaboradores (2016) propuseram que as SVMPs e PLA_2s possuem papel primário na formação do edema, enquanto as SVSPs contribuem para a sua manutenção (MAMEDE et al., 2016). Sabendo da importância das PLA_2 no desenvolvimento do edema, podemos observar uma ligação entre a atividade enzimática de PLA_2 dos venenos das serpentes submetidas à mudança da dieta para anfíbios. Praticamente todos os indivíduos apresentaram diminuição da atividade de PLA_2 e isso pode ter ligação direta com a perda de atividade edematogênica. Dessa maneira, conclui-se que a dieta com anfíbios afeta negativamente a atividade de formação de edema dos venenos das serpentes *B. alternatus*, porém o retorno por um ano com a alimentação com mamíferos não causou um retorno à atividade inicial.

Figura 50. Atividade edematogênica dos venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. O aumento do volume da pata foi induzido pela aplicação de 1 µg de veneno na pata traseira direita de camundongos Swiss machos. O edema de pata foi expresso em porcentagem de aumento da espessura e o resultado final foi obtido pela diferença entre o volume da pata afetada e da pata contralateral (controle).



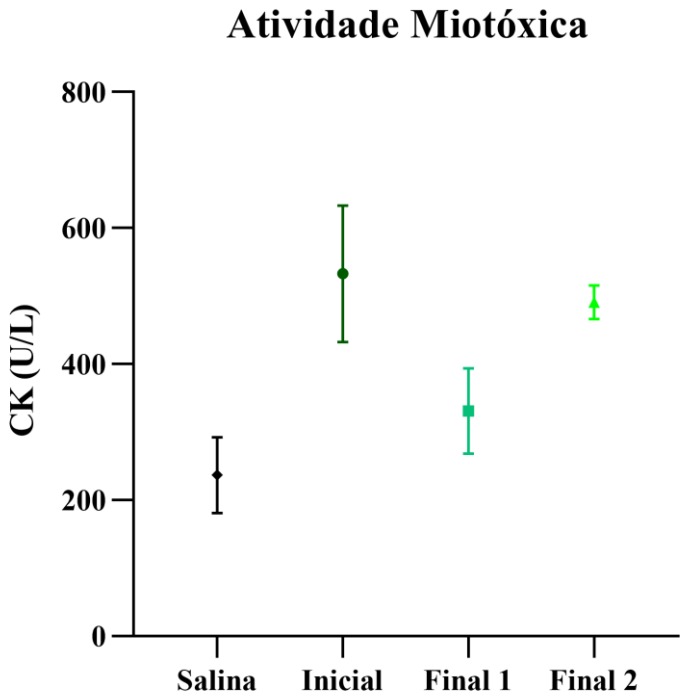
4.2.5.6. Atividade miotóxica

Para a espécie *B. alternatus* decidiu-se por realizar também a atividade miotóxica.

A atividade miotóxica demonstrou, através da liberação de creatina quinase (CK), que o veneno final 1, após um ano de dieta com anfíbios, é menos miotóxico em

comparação com os venenos inicial e final 2. De maneira interessante e com diferença estatística (ANOVA de uma via com Tukey como teste *a posteriori*, $p<0.005$), o veneno final 2 retornou a valores similares ao veneno inicial.

Figura 51. Atividade miotóxica dos venenos de *B. alternatus* dos grupos inicial, final 1 e final 2. A miotoxicidade do veneno foi mensurada através da injeção de 40 µL de veneno no músculo gastrocnêmio direito de camundongos swiss machos. Após 3 horas os animais tiveram seu sangue retirado pela cauda e a liberação da CK foi mensurada através do kit Bioclin CK NAV UV-K010 conforme indicações do fabricante. Os valores estão expressos em média e desvio padrão.



5. Discussão

5.1. Serpentes

A espécie *B. moojeni* é considerada generalista e é encontrada no cerrado, em zonas ripárias, na interface entre terra e cursos d'água (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). Durante a fase juvenil, as serpentes preferem presas ectotérmicas, como sapos e lagartos. Já na fase adulta, passam a preferir presas endotérmicas como mamíferos e aves, porém não se limitam a esse tipo de presa (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003). Dessa maneira, não era esperado que as serpentes apresentassem intolerância aos anfíbios e isso se confirmou. Nenhuma serpente exibiu episódios de regurgitação, vômito, apatia ou problemas de saúde relacionados à alimentação. Duas

mortes ocorreram durante a alimentação com anfíbios (Bm 3 e Bm 10), antes da última extração de veneno, mas de acordo com as necropsias realizadas pela médica veterinária responsável, não há evidências que as mortes foram causadas pela mudança na alimentação (Dra. Kathleen Fernandes Grego, comunicação pessoal). No período de retorno à alimentação com mamíferos, mais duas serpentes morreram (Bm 2 e Bm 6), mas também sem relação com a dieta.

As três maiores serpentes do experimento (Bm 7, Bm 8 e Bm 9), pesando mais de 1.000 g, são todas fêmeas. Isso corrobora o dimorfismo sexual já descrito nessa espécie, em que as fêmeas são maiores e mais pesadas que os machos (NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003).

A espécie *B. alternatus* é uma espécie especialista, isso significa que mesmo os animais juvenis se alimentam exclusivamente de mamíferos (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 1996; NUNES, 2006). Essa característica é rara no gênero *Bothrops*, sendo observada nas espécies *B. neuwiedi*, *B. cotiara*, *B. fonsecai* e *B. insularis*, além da *B. alternatus* (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 1996). Dessa maneira, era esperado a maior dificuldade desses animais à alimentação baseada em anfíbios, como foi observado. Deve-se considerar que os animais passaram por muito estresse durante o experimento, indicando o estresse como um fator provável para as modificações observadas no veneno. Porém, Claunch e seus colaboradores estudaram o papel do estresse na composição do veneno e não encontraram nenhuma correlação (CLAUNCH et al., 2017). Assim, as modificações observadas não foram causadas pelo estresse. Mesmo após todos os distúrbios apresentados, todos os animais sobreviventes conseguiram se adaptar à nova dieta.

B. alternatus é encontrada em áreas pantanosas, condições ribeirinhas, brejos e habitats úmidos (NUNES, 2006). Martins (2002) sugere que é improvável que a dieta especialista tenha surgido devido à baixa disponibilidade de outros tipos de presa, já que animais ectotérmicos e aves são encontradas na região ocupada por essas espécies (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 1996).

Assim como na *B. moojeni*, a espécie *B. alternatus* apresenta dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos (NUNES, 2006). As três maiores serpentes utilizadas neste trabalho (Ba 4, Ba 6 e Ba 7) são fêmeas, com massas variando entre 750 e 825 g.

5.2. SDS-PAGE

O perfil eletroforético dos venenos da espécie *B. moojeni* apresentou marcante variação individual. Esse resultado está de acordo com o observado para essa espécie. Aguiar e seus colaboradores (2019) estudando o veneno individual de *B. moojeni* observaram uma variação importante no perfil de eletroforese, em especial na banda entre 20 e 25 kDa, geralmente uma SVMP P-I, e também na região entre 25 e 50 kDa (DA SILVA AGUIAR et al., 2019).

De maneira diferente, os venenos da espécie *B. alternatus* apresentaram uma composição mais conservada. Lanari e colaboradores (2010), estudando *B. alternatus* de diferentes regiões da Argentina, encontraram pequenas variações geográficas do veneno, em especial em uma região da Argentina isolada (Olavarría) (LANARI et al., 2010), mas as duas bandas proteicas majoritárias descritas no veneno estão presentes, assim como a intensa presença de PLA_2 entre 10 e 15 kDa. Essas bandas majoritárias também foram observadas por Rocha e Furtado (2005) (ROCHA; FURTADO, 2005). Esses resultados evidenciam a menor variação intraespecífica da espécie.

A espécie *B. alternatus* demonstrou o aumento da intensidade de uma banda com aproximadamente 15 kDa com a mudança para a dieta baseada em anfíbios. Além de apresentar aumento do número de bandas na região entre 10 e 15 kDa. Nos venenos botrópicos essas regiões são associadas a CTL e PLA_2 (GAY et al., 2015; MCCLEARY et al., 2016).

5.3. RP-HPLC

O perfil cromatográfico dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* já são muito bem caracterizados por diversos autores (CALVETE et al., 2011; FERNÁNDEZ CULMA et al., 2014; GAY et al., 2015; SOUSA et al., 2013; TASHIMA et al., 2008) e, baseado nesses estudos anteriores, os picos cromatográficos majoritários foram atribuídos aos seus componentes principais.

Comparando os perfis cromatográficos de ambas as espécies, podemos notar que a espécie *B. moojeni* apresenta um perfil mais complexo, com um número maior de picos, em especial na região entre 50 e 75 minutos de eluição. Nessa região encontra-se,

normalmente, nos venenos botrópicos as famílias de proteínas SVSP, SVMP P-I e PLA_2s D-49 (SOUSA et al., 2013).

No início do perfil cromatográfico dos venenos botrópicos (cerca de 25 minutos nas duas espécies estudadas) eluem a família das disintegrinas e peptídeos potencializadores de bradicinina (BBPs) (GAY et al., 2015; HATAKEYAMA, 2019; NÚÑEZ et al., 2009; TASHIMA et al., 2008). Já podemos notar uma diferença entre as espécies nessa região. Enquanto na espécie *B. moojeni* essa região parece mais conservada nos 10 indivíduos, na espécie *B. alternatus* podemos observar uma variação importante tanto entre os indivíduos quanto na comparação entre as diferentes dietas, com o acréscimo de novos picos nessa área. As disintegrinas são polipeptídeos não enzimáticos que afetam a interação célula-célula e célula-matriz, antagonizando a função adesiva de alguns tipos de proteínas de membrana chamadas integrinas (ANGULO; LOMONTE, 2009; RODRÍGUEZ-ACOSTA et al., 2016). Suas ações no envenenamento são relacionadas à inibição da agregação plaquetária levando à hemorragia (CALVETE, 2013). Já os BPPs são peptídeos que impedem a degradação da bradicinina e a geração de angiotensina II, inibindo a atividade da enzima conversora de angiotensina. A ação desse peptídeo resulta em diminuição da pressão sanguínea (GOMES et al., 2007). Os BBPs são gerados a partir de um precursor que, na espécie *B. jararaca*, consiste em 265 resíduos de aminoácidos, com sete BPPs arranjados *in tandem* no N-terminal (MURAYAMA et al., 1997).

Com cerca de 45 minutos de eluição observa-se um pico bem marcante na espécie *B. moojeni* que apresenta pequena variação entre os indivíduos. Um pico similar foi encontrado e descrito inicialmente por Homsi-Brandeburgo e colaboradores (1988) em *B. jararacussu* como uma PLA_2 K-49 básica, denominada *bothropstoxin-I* [Q90249] (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988), com atividade miotóxica e, posteriormente, descrita também por Gonçalves-Machado e colaboradores (2016) em *B. jararaca* (GONÇALVES-MACHADO et al., 2016). Ainda que a análise proteômica não tenha identificado essa proteína específica em *B. moojeni*, foram encontradas oito isoformas de PLA_2s K-49 [A0A1S5XW05; A0A2H4N391; I6L8L6; A0A1L8D605; A0A1L8D5Z7; I2DAL6; L7VGC1; A8E2V7].

Em *B. alternatus* um pico que elui após cerca de 60 minutos de corrida apresenta diminuição na intensidade com a alteração da dieta. De acordo com a massa molecular, observada no gel das frações, pode-se inferir que é uma PLA_2. Porém, essa proteína eluí depois da PLA_2 K-49 básica descrita anteriormente, indicando que é outra isoforma de PLA_2. Foi descrito a eluição de PLA_2 D-49 nessa região em diversos veneno botrópicos como *B. diporus* (GAY et al., 2015), *B. atrox* (NÚÑEZ et al., 2009), *B. (Bothropoides) pauloensis* (RODRIGUES et al., 2012) e *B. fonsecai* (TASHIMA et al., 2008), com massas moleculares variando entre 14 e 16 kDa. É interessante notar, que a atividade fosfolipásica do indivíduo Ba 1 diminui com a mudança da dieta, indicando que esse pico pode se tratar de uma PLA_2 com atividade enzimática.

Ambos os venenos demonstraram picos intensos na região final do perfil cromatográfico, onde eluem as SVMP nos venenos botrópicos (SOUSA et al., 2013). A espécie *B. moojeni* apresentou maior complexidade de picos nessa região, enquanto a espécie *B. alternatus* apresentou apenas dois picos bem intensos. Os resultados de *B. alternatus* são muito similares ao encontrado em outras espécies como *B. jararaca* (GALIZIO et al., 2018; SOUSA et al., 2013) e *B. cotiara* (SOUSA et al., 2013; TASHIMA et al., 2008). Esse resultado é interessante já que as espécies *B. alternatus* e *B. cotiara* são filogeneticamente mais próximas (ALENCAR et al., 2016). Já a espécie *B. moojeni* apresenta essa região do perfil cromatográfico similar a sua espécie irmã *B. leucurus* (ALENCAR et al., 2016; BRAGA et al., 2020).

Como a espécie *B. moojeni* é uma espécie generalista, os filhotes dessa espécie têm preferência por presas ectotérmicas. Dessa maneira, pode-se formular a hipótese de que as possíveis alterações dos venenos do período em que as serpentes foram alimentadas com anfíbios (final 1) assemelhariam-se ao veneno de serpentes jovens. Porém, poucas alterações foram observadas no perfil cromatográfico após a mudança da dieta com anfíbios. Além disso, Hatakeyama (2019) descreveu a variação ontogenética em *B. moojeni* nascidas e mantidas em cativeiro e alimentadas exclusivamente com mamíferos e observou um aumento progressivo dos picos de SVMP (com tempo de eluição após 75 minutos) com o aumento da idade das serpentes (HATAKEYAMA, 2019). Logo, a alimentação não é a única responsável pela mudança ontogenética observada na espécie. A variação do perfil de SVMP em serpentes do gênero *Bothrops* já

foi descrita anteriormente e parece ter relação com a atividade proteolítica sobre o colágeno em *B. jararaca* (GALIZIO et al., 2018). Hatakeyama também observou essa relação, já que a atividade proteolítica sobre o colágeno aumentou progressivamente em associação com os picos cromatográficos relacionados às SVMP (HATAKEYAMA, 2019).

5.4. Análise proteômica das serpentes da espécie B. moojeni

Em estudo proteômico recente com o veneno de *B. moojeni*, Amorim e colaboradores (2018) identificaram que algumas famílias de proteínas são expressas exclusivamente em machos ou fêmeas. PLB, PLI e HYAL são expressas exclusivamente em machos e CRISP são expressas exclusivamente em fêmeas (AMORIM et al., 2018). Nosso resultado não corrobora esse trabalho, já que todas as famílias de proteínas identificadas foram encontradas em todos os indivíduos. Além de *B. moojeni*, o PLI já foi encontrado no veneno de serpentes de diversas espécies como: *B. jararaca* (LUNA et al., 2013), *Bothriechis schlegelii* (PLA et al., 2017) e *Crotalus durissus terrificus* (WIEZEL et al., 2018).

Gibbs e colaboradores demonstraram que as proteínas mais abundantes dos venenos apresentam menor variação quando comparadas às proteínas menos abundantes (GIBBS et al., 2011). Uma possível interpretação para este padrão é que as proteínas mais abundantes do veneno podem ser análogas às proteínas *housekeeping*, as quais desempenham uma grande variedade de funções essenciais (GYGI et al., 2000; WARRINGTON et al., 2000). Considerando-se esta hipótese, as proteínas abundantes do veneno podem desempenhar funções básicas para imobilizar e matar a presa, enquanto as proteínas menos abundantes apresentam maior plasticidade na escala evolutiva ou ecológica (CALVETE et al., 2009), atuando no sentido de "personalizar" o veneno de uma serpente conforme suas necessidades individuais, de acordo com o tipo de alimento que ela ingere, tornando seu veneno mais eficiente para um determinado tipo de presa (MACKESSY et al., 2006).

O veneno das serpentes tem múltiplas funções para a ecologia desses animais. As funções mais citadas são captura da presa e defesa (BERNARDONI et al., 2014; FRY et al., 2006, 2009). Porém, o veneno também possui função de digestão (ou pré-digestão)

das presas (BERNARDONI et al., 2014; FRY et al., 2006). Desde a década de 30, existem estudos que demonstram que o veneno pode acelerar a digestão de presas. Reichert (1936) (REICHERT, 1936) demonstrou que o tempo normal de digestão da *B. jararacussu* é de 4 a 5 dias, porém, quando o animal é alimentado com presas mortas e não há a inoculação do veneno, o tempo de digestão aumenta para 12 a 14 dias. Thomas e Pough (THOMAS; POUGH, 1979), em 1979, observaram que a atividade proteolítica dos venenos dos viperídeos enfraquece os tecidos do corpo da presa e aceleram a ruptura da cavidade visceral e intestinos da presa. Como os anfíbios são menos nutritivos que os mamíferos (tabela 5) (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; SERVICE, 2018), acabam por serem animais mais simples de digerir, exigindo menos toxinas com ação proteolítica, tais quais as SVMP (devido à ausência de dados nutricionais acerca de camundongos e ratos, utilizamos coelhos para fins comparativos).

Tabela 5. Valores nutricionais comparativos de coelho e rã.

		Valores em 100 g	
		Coelho	Rã
Água	g	74.51	81.9
Energia	kcal	114	73
Proteína	g	21.79	16.4
Gorduras totais	g	2.32	0.3
Carboidratos	g	0	0
Fibras	g	0	0

Com base na análise proteômica, apesar de não apresentar diminuição na abundância relativa de SVMP após a alimentação com anfíbios, é interessante notar que o veneno de todos os animais apresentou aumento da abundância relativa de SVMP no retorno à dieta com mamíferos.

5.5. Atividade de L-aminoácido oxidase

LAAOs são flavoenzimas que catalisam a desaminação dos L-aminoácidos ao seu α-cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (STÁBELI et al., 2007). A ação das LAAOs está relacionada com agregação plaquetária

e apoptose de células endoteliais vasculares, que contribuem para o sangramento prolongado após o envenenamento (DU; CLEMETSON, 2002; STÁBELI et al., 2007). Além disso, foram descritas atividades bactericida e antitumorais associadas às LAAOs (IZIDORO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009; STÁBELI et al., 2004).

As modificações mais intensas na atividade dessa enzima foram observadas em *B. alternatus*. Como mencionado anteriormente, as serpentes *B. alternatus* apresentaram estomatite e cáseos na região bucal durante grande parte da alimentação com anfíbios e mesmo após o retorno com a dieta baseada em mamíferos essas manifestações bucais continuaram. Dessa maneira, pode-se levantar a hipótese de que houve um aumento da enzima LAAO para melhorar a proteção da serpente contra as bactérias causadoras de doenças bucais. O estresse pode ser um fator que levou as serpentes a apresentarem alguns desses problemas, já que a manipulação desses animais foi frequente durante todo o período de experimento. Em artigo recém publicado, nosso grupo concluiu que a enzima LAAO aumenta com a manutenção em cativeiro em serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* (VENANCIO DE LIMA et al., 2021). Porém, em estudo semelhante comparando serpentes da espécie *Bothrops jararaca* de cativeiro e natureza não conseguimos observar o mesmo resultado (GALIZIO et al., 2018), indicando que essa alteração pode acontecer apenas em serpentes do gênero *Crotalus*. Considerando que as serpentes *B. alternatus* utilizadas no estudo já se encontravam em cativeiro por mais de dois anos, conclui-se que a modificação observada não foi causada apenas pelo cativeiro, indicando que a dieta atua na modificação da atividade dessa proteína.

5.6. Atividade fosfolipásica

As PLA_2s catalisam a hidrólise das ligações éster sn-2 Ca^{2+}-dependentes em fosfolipídios. Essa hidrólise produz ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (KANASHIRO et al., 2002; SOARES et al., 2001). As PLA_2s podem ser divididas em pelo menos duas subclasses: D-49, que possuem um resíduo de aspartato na posição 49 e alta atividade catalítica e K-49, que possuem um resíduo de lisina na mesma posição e não possuem atividade catalítica (KANASHIRO et al., 2002).

A atividade fosfolipásica foi a principal mudança observada nos testes *in vitro* da espécie *B. alternatus* com a mudança da dieta para anfíbios. Nota-se também que mesmo

após o retorno à dieta com mamíferos, o veneno não retornou à atividade inicial, conforme esperado. Dessa maneira, a dieta com anfíbios parece afetar a composição do veneno dessa espécie, porém o retorno à dieta com mamíferos por um ano não parece ser suficiente para retornar à composição do veneno para um estado inicial.

Sabendo da grande variedade de atividades de PLA_2 no envenenamento, incluindo atividade neurotóxica, miotóxica, cardiotóxica, edematogênica, hipotensiva, agregação plaquetária e atividade anticoagulante (SOARES et al., 2001), a diminuição da atividade fosfolipásica pode estar ligada a modificações nas atividades *in vivo*, como a atividade edematogênica e a atividade miotóxica.

5.7. Atividade proteolítica

As duas famílias de proteases que estão presentes nos venenos de serpentes são as SVSP e as SVMP (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). As SVSP possuem atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica e atuam principalmente na cascata de coagulação (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Já as SVMP são proteases extremamente tóxicas, e sua ação está relacionada com hidrólise de componentes da matriz extracelular (BARAMOVA et al., 1989; OLIVEIRA et al., 2010; PAES LEME et al., 2012; SOUSA et al., 2013), inibição da agregação plaquetária (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996; SOUSA et al., 2013), apoptose de células endoteliais (CLISSA et al., 2001; TANJONI et al., 2005) e regulação da expressão de mediadores pró-inflamatórios (LOPES et al., 2012; MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007). Isso leva a uma interrupção massiva da hemostasia, resultando em hemorragia e dano severo ao tecido no local da inoculação (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007; SOUSA et al., 2013).

Herrera e seus colaboradores (2015) identificaram que as SVMP PII e PIII possuem preferência pelo colágeno tipo IV presente na membrana basal de vasos sanguíneos (HERRERA et al., 2015). A degradação dessa membrana basal causa a hemorragia, sintoma muito comum em envenenamentos botrópicos. O colágeno presente no substrato pele de porco, no entanto, é o colágeno tipo II, também presente na pele. Mesmo assim, conseguimos observar a afinidade que as SVMPs têm por esse substrato, indicando que essa família de proteínas é a maior responsável pela degradação do colágeno, em especial no veneno de *B. alternatus*. Ainda assim, há uma atividade residual

que não foi inibida pelo EDTA, mais marcante nos venenos de *B. moojeni*, que pode equivaler à atividade da família das SVSP. Desta maneira não podemos afirmar que o colágeno do tipo II, utilizado neste trabalho, é um substrato específico para SVMP.

Cardoso e seus colaboradores (2010), realizaram o transcriptoma de *B. alternatus* e encontraram apenas 1,92% de SVSP de transcritos dessa família proteica, representando a quarta família mais abundante de toxinas dessa espécie (CARDOSO et al., 2010). Porém, Öhler e seus colaboradores (2010), quando fizeram a análise proteômica do veneno, encontraram 24,1% de SVSP no veneno de *B. alternatus* (ÖHLER et al., 2010). Ambos os estudos demonstraram que as SVMP é a família de toxina mais abundante nesse veneno. Analisando o veneno das serpentes *B. moojeni*, observamos que as SVSP possuem uma atividade residual sobre o colágeno e para a espécie *B. alternatus* toda a atividade proteolítica foi inibida pelo EDTA, indicando pouca atividade proteolítica relacionada a SVSP. Isso não indica que o veneno de *B. alternatus* não possui SVSP, pode apenas demonstrar que as SVSP presentes no veneno dessa espécie têm pouca afinidade pelo colágeno tipo II. Novas investigações proteômicas devem ser feitas para a identificação da abundância de SVSP do veneno das serpentes da espécie *B. alternatus* submetidas à mudança de dieta.

5.8. Dose mínima coagulante

A DMC é correlacionada, principalmente, com a presença de SVSPs e SVMPs no veneno. As SVSPs presentes em venenos de serpentes exercem diversas ações farmacológicas incluindo: ações em proteínas da cascata de coagulação, como a atividade trombina-símile sobre o fibrinogênio, ativação do fator V, ativação da proteína C, fibrinogenólise, ativação do plasminogênio e indução da agregação plaquetária. Em alguns venenos de viperídeos, pode exercer atividade calicreína-símile, liberando bradicinina e, assim, promovendo o aumento da permeabilidade vascular, levando a hipotensão (PÉREZ et al., 2007). A neofuncionalização de SVSP e SVMP para ativar fatores de coagulação, como protrombina e fator X, foram eventos evolucionários chave no sucesso evolutivo do gênero *Bothrops* (SOUSA et al., 2018).

É interessante notar que as serpentes da espécie *B. alternatus* parecem possuir menor abundância relativa de proteínas da família SVSP, quando observamos o perfil cromatográfico e os perfis eletroforéticos tanto do veneno inteiro como das frações.

Porém, os valores individuais da DMC demonstram que essa serpente é mais coagulante em comparação à espécie *B. moojeni*. Porém deve-se levar em consideração a alta variação individual que essa atividade apresenta. Aguiar e seus colaboradores (2019) estudando o veneno da espécie *B. moojeni* em 13 indivíduos diferentes, encontrou valores de DMC variando entre 3,9±0,10 µg/mL a 125,99±11,72 µg/mL (DA SILVA AGUIAR et al., 2019). Também foram encontradas SVSP com atividade de trombina-símile e fibrinogenolíticas no proteoma da espécie *B. alternatus* (ÖHLER et al., 2010), que são proteínas que tem ação importante na atividade coagulante.

5.9. Dose letal 50%

A letalidade dos venenos não pode ser atribuída a uma família específica de proteínas já que no veneno as toxinas agem de maneira sinérgica para aumentar a toxicidade do veneno total (KANG et al., 2011).

As serpentes da espécie *B. alternatus* demonstraram letalidade discretamente menor para mamíferos do que as serpentes da espécie *B. moojeni* submetidas à mudança de dieta. Queiroz e seus colaboradores (2008) compararam a letalidade de diversas espécies brasileiras do gênero *Bothrops* e demonstraram que a espécie *B. alternatus* é mais letal do que a espécie *B. moojeni* (QUEIROZ et al., 2008). Resultado também obtido por Ferreira e colaboradores (1992) (FERREIRA et al., 1992). Porém, Lanari e seus colaboradores (2010) observaram uma grande variação da dose letal em diferentes regiões de ocorrência dessa espécie (LANARI et al., 2010), indicando uma variação intrapopulacional bem marcada. Também é importante ressaltar que experimentos *in vivo* apresentam variação, por se tratar de sistemas complexos e dependente da resposta individual do modelo *in vivo* utilizado.

É notável a diferença da dose letal em mamíferos e anfíbios. Para conseguir calcular a dose letal em anfíbios foi necessário quantidade significativamente maior de veneno, em especial para as serpentes especialistas da espécie *B. alternatus*. Andrade e colaboradores estudaram a letalidade de venenos de jovens e adultos da espécie *B. moojeni* em mamíferos e anfíbios. Eles notaram que o veneno é cerca de 10 vezes menos letal para anfíbios, sendo que os filhotes apresentam maior letalidade para esses animais do que os adultos (45,02 mg/kg e 83,7 mg/kg, respectivamente). Porém, a letalidade em mamíferos foi similar (filhotes - 4,54 mg/kg e adultos – 4,8 mg/kg)

(ANDRADE; ABE, 1996). Como a espécie *B. alternatus* possui hábito alimentar especialista, estudos de letalidade com outras classes de animais não foram feitos anteriormente.

A letalidade para a presa parece estar diretamente ligada ao tipo de presa usualmente consumida pela espécie na natureza. Barlow e seus colaboradores demonstraram que as serpentes do gênero *Echis* que se alimentam de escorpiões na natureza, apresentam maior toxicidade para esses animais se comparadas com aquelas que se alimentam de mamíferos (BARLOW et al., 2009). Isso pode indicar que as serpentes da espécie *B. moojeni*, por se alimentarem de presas ectotérmicas, incluindo anfíbios, em parte do seu ciclo de vida, apresentam maior letalidade para esses animais quando comparadas a espécie especialista *B. alternatus*.

5.10. Edema de pata

As SVMPs são as principais responsáveis pelos efeitos pró-inflamatórios, que levam à formação do edema, induzidos por venenos botrópicos, porém, as PLA_2s e SVSPs também atuam na indução desses efeitos (MAMEDE et al., 2016; ZYCHAR et al., 2010). Mamede e colaboradores (2016) propuseram que as SVMPs e PLA_2s possuem papel primário na formação do edema, enquanto as SVSPs contribuem para a sua manutenção (MAMEDE et al., 2016). A capacidade de induzir edema pelas PLA_2 estão relacionadas com a liberação do ácido araquidônico durante a hidrolise dos fosfolipídios, que são, então convertidos em prostaglandinas e leucotrienos. Por sua vez, as prostaglandinas e leucotrienos levam ao aumento da permeabilidade vascular e à formação do edema no local da picada da serpente (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; MACKESSY, 2016). Também foi proposto a liberação de aminas por mastócitos como um possível mecanismo na indução do edema por PLA_2s (LANDUCCI et al., 1998). Sabendo da importância das PLA_2 no desenvolvimento do edema, podemos observar uma ligação entre a atividade enzimática de PLA_2 dos venenos das serpentes submetidas à mudança da dieta para anfíbios.

Analisando os venenos de *B. alternatus*, praticamente todos os indivíduos apresentaram diminuição da atividade de PLA_2 e isso pode ter ligação direta com a perda de atividade edematogênica. Porém, ao observar os venenos de *B. moojeni* essa perda da

atividade fosfolipásica não é observada *in vitro*, mesmo assim foi verificado uma diminuição da atividade edematogênica com a modificação da dieta para anfíbios.

Mais uma vez, cabe ressaltar que não só as PLA_2s com atividade enzimática possuem papel na formação do edema. As PLA_2 K-49, que não possuem atividade enzimática, também são capazes de induzir a formação de edema. Soares e colaboradores (1999) isolaram uma PLA_2 não enzimática do veneno de *B. moojeni*, nomeada MjTxI e conseguiram demonstrar que essa proteína foi capaz de induzir edema em camundongos (SOARES et al., 2000). Estudos recentes apontam para uma sinergia entre os dois tipos de PLA_2s, indicando que a atividade de hidrólise das PLA_2s D-49 na membrana celular pode criar novos sítios aniônicos que facilitam a interação eletrostática das PLA_2s K-49, aumentando, dessa maneira, a toxicidade de ambas as formas (BUSTILLO et al., 2019; MORA-OBANDO et al., 2014).

5.11. Dose mínima hemorrágica

A hemorragia é um efeito central do envenenamento botrópico. As SVMP, em especial as P-III, são as principais responsáveis pela hemorragia local. A habilidade das SVMP de destruir a membrana basal e a integridade das células endoteliais (TASHIMA et al., 2008) e, também, a capacidade de bloquear a interação da integrina $\alpha_2\beta_1$ com o colágeno contribuem para a hemorragia (FREITAS-DE-SOUSA et al., 2015).

Além das SVMP, outras famílias de proteínas também estão envolvidas com hemorragia, como as disintegrinas, lectinas tipo C e LAAOs, que agem evitando a coagulação sanguínea ou inibindo a agregação plaquetária (TASHIMA et al., 2008). As serinoproteases degradam o fibrinogênio e ativam fatores de coagulação sanguínea, como o fator X e II. O fator de crescimento endotelial vascular (svVEGF), também presente nos venenos botrópicos, aumenta a permeabilidade dos capilares sanguíneos (TASHIMA et al., 2008).

Os valores de DMH obtidos para a espécie *B. moojeni* foram diferentes daqueles encontrados por Aguiar e seus colaboradores, que indicam que as serpentes analisadas nesse estudo são mais hemorrágicas (1,55±0,35 µg e 3,21±0,64 µg) (DA SILVA AGUIAR et al., 2019). Porém, vale ressaltar que o estudo de Aguiar usou veneno

individual para a dosagem da atividade hemorrágica, enquanto neste estudo foi utilizado um *pool* de venenos dessa espécie.

Os valores obtidos para a espécie *B. alternatus* são similares ao observado por Almeida e colaboradores (2002) que determinaram a DMH de *B. alternatus* em 5,06 µg (MIRANDA, 2002), porém diferentes de Lanari et al (2010) que encontraram variação de 50,6 a 321 µg na DMH de *B. alternatus* de diferentes regiões (LANARI et al., 2010).

5.12. Atividade miotóxica

As PLA_2s são as principais toxinas responsáveis pelo efeito miotóxico observado nos venenos. Geralmente as PLA_2-K49, que não possuem atividade enzimática são altamente associadas à miotoxicidade nos venenos de viperídeos (SOARES et al., 1998). Porém, o grupo do Dr. Bruno Lomonte vem estudando as PLA_2s dos venenos e conseguiram estabelecer que não só as K49 têm atividade miotóxica. As PLA_2s-D49 também possuem atividade miotóxica, porém com um modo de ação diferente. Enquanto as K49 são capazes de interagir com a membrana dos miócitos e diretamente desestabilizar sua integridade, as D49, com sua atividade enzimática, hidrolisam as membranas celulares formadas por fosfolipídeos desestabilizando, assim, a integridade da membrana celular (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

6. Conclusão

Os resultados obtidos indicam que ambas as espécies estudadas apresentam uma certa plasticidade no veneno, podendo ajustá-lo em relação à dieta, porém de maneiras diferentes. Esse resultado é, de certa forma, surpreendente. Os juvenis da espécie *B. moojeni* se alimentam preferencialmente de animais ectotérmicos, como anfíbios e répteis. Isso indica que os animais possuem os mecanismos necessários para que essa mudança ocorra. Já a espécie *B. alternatus*, por ser especialista, se alimenta desde o nascimento de mamíferos. Ainda assim, essa espécie apresenta plasticidade do veneno, em alguns experimentos de maneira mais acentuada, quando comparada à espécie generalista (p.e., SDS-PAGE e RP-HPLC). Além disso, atividades das enzimas LAAO e PLA_2 apresentaram mudanças notáveis nessa espécie, assim como as atividades *in vivo*,

que demonstraram maior letalidade em anfíbios quando alimentados com esse tipo de presa, mesmo que não seja a presa natural desses animais.

Os mecanismos moleculares que podem estar envolvidos com a plasticidade fenotípica observada nos venenos podem estar relacionados com a regulação da transcrição gênica por microRNA (miRNA). Esse mecanismo já foi descrito anteriormente por Durban e colaboradores indicando que os miRNAs são os moduladores da mudança ontogenética da composição do veneno encontrada nas espécies *Crotalus simus simus* (DURBAN et al., 2013), *C. tzabacan* e *C. culminatus* (DURBAN et al., 2017). A dieta é parte importante da mudança na biologia das espécies de serpentes com hábito generalista, logo, podemos sugerir que os miRNAs podem estar envolvidos com as mudanças observadas nesse estudo. Outros mecanismos que podem estar envolvidos com as alterações na composição e função dos venenos em relação à dieta são: modificações epigenéticas e modificações pós-traducionais como glicosilação e fosforilação de proteínas (ZELANIS et al., 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAPE-GIRÓN, Alberto; SANZ, Libia; ESCOLANO, José; FLORES-DÍAZ, Marietta; MADRIGAL, Marvin; SASA, Mahmood; CALVETE, Juan J. Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: Geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of Proteome Research**, *[S. l.]*, v. 7, n. 8, p. 3556–3571, 2008. DOI: 10.1021/pr800332p.

ALBULESCU, Laura Oana et al. A therapeutic combination of two small molecule toxin inhibitors provides broad preclinical efficacy against viper snakebite. **Nature Communications**, *[S. l.]*, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-19981-6. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19981-6.

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.

AMAZONAS, Diana R.; FREITAS-DE-SOUSA, Luciana A.; OREFICE, Daniele P.; SOUSA, Leijiane F. d.; MARTINEZ, Melissa G.; MOURÃO, Rosa H. V.; CHALKIDIS, Hipócrates M.; CAMARGO, Plínio B.; MOURA-DA-SILVA, Ana M. Evidence for Snake Venom Plasticity in a Long-Term Study with Individual Captive *Bothrops atrox*. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 11, n. 5, 2019. DOI: 10.3390/toxins11050294.

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. 177, 2018. DOI: 10.3390/toxins10050177.

ANDRADE, Denis V; ABE, AS. Is the venom related to diet and tail color during *Bothrops moojeni* ontogeny? **Journal of Herpetology**, *[S. l.]*, v. 30, n. 2, p. 285–288, 1996. DOI: 10.2307/1565528. Disponível em: http://www.jstor.org/stable/10.2307/1565528.

ANDRADE, Denis V; ABE, Augusto S. Relationship of Venom Ontogeny and Diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, *[S. l.]*, v. 55, n. 2, p. 200–204, 2013.

ANGULO, Yamileth; LOMONTE, Bruno. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 54, n. 7, p. 949–957, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.12.014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.014.

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.

BAILON CALDERON, Henri et al. Development of Nanobodies Against Hemorrhagic and Myotoxic Components of *Bothrops atrox* Snake Venom. **Frontiers in Immunology**, *[S. l.]*, v. 11, n. May, p. 1–12, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00655.

BARAMOVA, Eugenia N.; SHANNON, John D.; BJARNASON, Jon B.; FOX, Jay W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, *[S. l.]*, v. 275, n. 1, p. 63–71, 1989. DOI: 10.1016/0003-9861(89)90350-0.

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.

BASTOS, Viviane A.; GOMES-NETO, Francisco; PERALES, Jonas; NEVES-FERREIRA, Ana Gisele C.; VALENTE, Richard H. Natural inhibitors of snake venom metalloendopeptidases: History and current challenges. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 8, n. 9, 2016. DOI: 10.3390/toxins8090250.

BERNARDONI, Juliana L.; SOUSA, Leijiane F.; WERMELINGER, Luciana S.; LOPES, Aline S.; PREZOTO, Benedito C.; SERRANO, Solange M. T.; ZINGALI, Russolina B.; MOURA-DA-SILVA, Ana M. Functional variability of snake venom metalloproteinases: Adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 9, n. 10, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109651.

BITTENCOURT RODRIGUES, Caroline Fabri et al. Boaγpli: Structural and functional characterization of the gamma phospholipase A2 plasma inhibitor from the non-venomous Brazilian snake *Boa constrictor*. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 15, n. 2, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0229657. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229657.

BON, C. The serum-therapie was discovered 100 years ago. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 2, n. 34, p. 142–143, 1996.

BORGES, Roberto Cabral; ARAÚJO, A. F. B. Seleção de hábitat em duas espécies de jararacas (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. neuwiedi* Wagler). **Revista Brasileira de Biologia**, *[S. l.]*, v. 58, n. 4, p. 591–601, 1998.

BOTH, Camila; LINGNAU, Rodrigo; SANTOS-JR, Alfredo; MADALOZZO, Bruno; LIMA, Leoncio Pedrosa; GRANT, Taran. Widespread occurrence of the American bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)(Anura: Ranidae), in Brazil. **South American Journal of Herpetology**, *[S. l.]*, v. 6, n. 2, p. 127–134, 2011.

BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

BRAGA, Jacqueline Ramos Machado; 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. May, p. 127–135, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.05.028.

BUSTILLO, Soledad; FERNÁNDEZ, Julián; CHAVES-ARAYA, Stephanie; ANGULO, Yamileth; LEIVA, Laura C.; LOMONTE, Bruno. Isolation of two basic phospholipases A2 from *Bothrops diporus* snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49 variants. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 168, p. 113–121, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.07.004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.07.004.

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.

CALVETE, Juan J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 62, p. 40–49, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.09.005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.005.

CALVETE, Juan J.; JUÁREZ, P.; SANZ, Libia. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of mass spectrometry : JMS**, *[S. l.]*, v. 42, p. 1405–1414, 2007. DOI: 10.1002/jms.1242.

CALVETE, Juan J.; SANZ, Libia; ANGULO, Yamileth; LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José Maria. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, *[S. l.]*, v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 2009.

DOI: 10.1016/j.febslet.2009.03.029. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029.

CAMPBELL, Jonathan A.; LAMAR, WW. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca NY: Commstock (Cornell University Press), 2004.

CARDOSO, Joao Luiz Costa; FRANÇA, Francisco Oscar de Siqueira; WEN, Fran Hui; MÁLAQUE, Ceila Maria Sant'Ana; HADDAD JR, Vidal. **Animais Peçonhentos No Brasil**. [s.l.] : Savier, 2009.

CARDOSO, Kiara C.; DA SILVA, Márcio J.; COSTA, Gustavo G. L.; TORRES, Tatiana T.; DEL BEM, Luiz E. V.; VIDAL, Ramon O.; MENOSSI, Marcelo; HYSLOP, Stephen. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, *[S. l.]*, v. 11, n. 1, p. 9–12, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-605.

CASEWELL, Nicholas R. et al. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *[S. l.]*, v. 111, n. 25, p. 9205–10, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1405484111. Disponível em: http://www.pnas.org/content/111/25/9205.short.

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.

CLAUNCH, Natalie M.; HOLDING, Matthew L.; ESCALLÓN, Camilo; VERNASCO, Ben; MOORE, Ignacio T.; TAYLOR, Emily N. Good vibrations: Assessing the stability of snake venom composition after researcher-induced disturbance in the laboratory. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 133, p. 127–135, 2017. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.05.010.

CLISSA, Patricia B.; LAING, Gavin D.; THEAKSTON, R. David G.; MOTA, Ivan; TAYLOR, Mark J.; MOURA-DA-SILVA, Ana M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 39, n. 10, p. 1567–1573, 2001. DOI: 10.1016/S0041-0101(01)00131-3.

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.]*, v. 186, n. May, p. 67–77, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.07.030.

DA SILVA AGUIAR, Weslei; DA COSTA GALIZIO, Nathália; SERINO-SILVA, Caroline; SANT'ANNA, Sávio Stefanini; GREGO, Kathleen Fernandes; TASHIMA, Alexandre Keiji; NISHIDUKA, Erika Sayuri; DE MORAIS-ZANI, Karen; TANAKA-AZEVEDO, Anita Mitico. Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 14, n. 9, p. 1–26, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0222206.

DALTRY, Jennifer C.; WÜSTER, Wolfgang; THORPE, Roger S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, *[S. l.]*, v. 379, p. 537–540, 1996.

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. November 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; TENZER, Stefan. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. **Nature protocols**, *[S. l.]*, v. 11, n. 4, p. 795–812, 2016.

DOS-SANTOS, Maria Cristina; GONÇALVES, Luís Roberto de Camargo; FORTES-DIAS, Consuelo L.; CURY, Yara; GUTIÉRREZ, José Maria; FURTADO, Maria de Fátima D. **A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de Bothrops jararacussuRevista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1992. DOI: 10.1590/s0036-46651992000200001.

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.

DURBAN, Jordi et al. Integrated "omics" profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. **BMC genomics**, *[S. l.]*, v. 14, p. 234, 2013. DOI: 10.1186/1471-2164-14-234. Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3660174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

DURBAN, Jordi; SANZ, Libia; TREVISAN-SILVA, Dilza; NERI-CASTRO, Edgar; ALAGÓN, Alejandro; CALVETE, Juan J. Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. **Journal of Proteome Research**, *[S. l.]*, v. 16, n. 9, p. 3370–3390, 2017. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00414.

FERNANDES GREGO, Kathleen et al. Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present: a scoping history. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, *[S. l.]*, n. December 2020, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0068.

FERNÁNDEZ CULMA, Maritza; ANDRÉS PEREAÑEZ, Jaime; NÚÑEZ RANGEL, Vitelbina; LOMONTE, Bruno. Snake venomics of *Bothrops punctatus*, a semiarboreal pitviper species from Antioquia, Colombia. **PeerJ**, *[S. l.]*, v. 2, n. 2004, p. e246, 2014. DOI: 10.7717/peerj.246. Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3912449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

FERREIRA, Monica L.; MOURA-DA-SILVA, Ana M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L.; MOTA, I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 30, n. 12, p. 1603–1608, 1992. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90032-Z.

FICETOLA, Gentile Francesco; THUILLER, Wilfried; MIAUD, Claude. Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species—the American bullfrog. **Diversity and Distributions**, *[S. l.]*, v. 13, n. 4, p. 476–485, 2007.

FINNEY, David John. **Probit Analysis: 3d 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. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.012.

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.

FREITAS-DE-SOUSA, L. A. et al. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. **Biochimie**, *[S. l.]*, v. 118, p. 60–70, 2015. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.08.006.

FRY, Bryan G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, *[S. l.]*, v. 439, n. 7076, p. 584–588, 2006. DOI: 10.1038/nature04328.

FRY, Bryan G.; VIDAL, Nicolas; VAN DER WEERD, Louise; KOCHVA, Elazar; RENJIFO, Camila. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 72, n. 2, p. 127–136, 2009. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.01.009.

FRY, Bryan Grieg; WÜSTER, W.; KINI, R. M.; BRUSIC, V.; KHAN, A.; VENKATARAMAN, D.; ROONEY, A. P. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **Journal of Molecular Evolution**, *[S. l.]*, v. 57, n. 1, p. 110–129, 2003. DOI: 10.1007/s00239-003-2461-2.

GALIZIO, Nathália da Costa; SERINO-SILVA, Caroline; STUGINSKI, Daniel Rodrigues; ABREU, Patrícia Antônia Estima; SANT'ANNA, Sávio Stefanini; GREGO, Kathleen Fernandes; TASHIMA, Alexandre Keiji; TANAKA-AZEVEDO, Anita Mitico; MORAIS-ZANI, Karen De. Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 186, n. July, p. 56–70, 2018. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.07.007. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.007.

GAY, Carolina; SANZ, Libia; CALVETE, Juan J.; PLA, Davinia. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015. DOI: 10.3390/toxins8010009.

GIBBS, H. Lisle; MACKESSY, Stephen P. Functional basis of a molecular adaptation: Prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus* rattlesnakes. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 53, n. 6, p. 672–679, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.01.034.

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.]*, v. 74, n. 10, p. 2169–2179, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.06.013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.013.

GILLISSEN, Adrian; THEAKSTON, R. David G.; BARTH, J??rgen; MAY, Burkard; KRIEG, Michael; WARRELL, David A. Neurotoxicity, haemostatic disturbances and haemolytic anaemia after a bite by a Tunisian saw-scaled or carpet viper (*Echis "pyramidum"*-complex): Failure of antivenom treatment. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 32, n. 8, p. 937–944, 1994. DOI: 10.1016/0041-0101(94)90372-7.

GIOVANELLI, Joao G. R.; HADDAD, Célio F. B.; ALEXANDRINO, Joao. Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. **Biological Invasions**, *[S. l.]*, v. 10, n. 5, p. 585–590, 2008.

GOMES, Claudiana L. et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. **Biochemical Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 74, n. 9, p. 1350–1360, 2007. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.07.014.

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.

GUTIÉRREZ, José Maria et al. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 23, n. 6, p. 887–893, 1985.

GUTIÉRREZ, José María. Improving antivenom availability and accessibility: Science, technology, and beyond. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 60, n. 4, p. 676–687, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.02.008.

GUTIÉRREZ, José María; CALVETE, Juan J.; HABIB, Abdulrazaq G.; HARRISON, Robert A.;

WILLIAMS, David J.; WARRELL, David A. Snakebite envenoming. **Nature reviews. Disease primers**, *[S. l.]*, v. 3, p. 17063, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.63.

GUTIÉRREZ, José María; HERRERA, Cristina. The analgesics morphine and tramadol do not alter the acute toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 81, p. 54–57, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.02.001.

GUTIÉRREZ, JoséMaría; LOMONTE, Bruno. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 33, n. 11, p. 1405–1424, 1995. DOI: 10.1016/0041-0101(95)00085-Z.

GYGI, Steven P.; CORTHALS, Garry L.; ZHANG, Yanni; ROCHON, Yvan; AEBERSOLD, Ruedi. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, *[S. l.]*, v. 97, n. 17, p. 9390–9395, 2000.

HATAKEYAMA, Daniela Miki. **Estudo e caracterização bioquímica e biológica do veneno de serpentes jovens e adultas da espécie *Bothrops moojeni***. 2019. Universidade de São Paulo, *[S. l.]*, 2019.

HERRERA, Cristina; BOLTON, Fiona; ARIAS, Ana Silvia; HARRISON, Robert A.; GUTIÉRREZ, José María. Analgesic effect of morphine and tramadol in standard toxicity assays in mice injected with venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 154, p. 35–41, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.09.012. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.09.012.

HERRERA, Cristina; ESCALANTE, Teresa; VOISIN, Mathieu-benoit; RUCAVADO, Alexandra. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI , PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases : Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. *[S. l.]*, p. 1–20, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003731.

HEYBORNE, William H.; MACKESSY, Stephen P. Identification and characterization of a taxon-specific three-finger toxin from the venom of the Green Vinesnake (*Oxybelis fulgidus*; Family Colubridae). **Biochimie**, *[S. l.]*, v. 95, n. 10, p. 1923–1932, 2013. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.06.025.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 26, n. 7, p. 615–627, 1988. DOI: 10.1016/0041-0101(88)90244-9.

IZIDORO, Luiz Fernando M. et al. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, *[S. l.]*, v. 14, n. 20, p. 7034–7043, 2006. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.06.025.

JIMÉNEZ-CHARRIS, Eliécer; MONTEALEGRE-SANCHEZ, Leonel; SOLANO-REDONDO, Luis; MORA-OBANDO, Diana; CAMACHO, Erika; CASTRO-HERRERA, Fernando; FIERRO-PÉREZ, Leonardo; LOMONTE, Bruno. Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 114, p. 287–299, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.11.016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.016.

JORGE, Roberta Jeane B. et al. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 114, p. 93–114, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.11.011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.011.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem J**, *[S. l.]*, v. 320 (Pt 2, p. 635–641, 1996. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8973578.

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.

KANG, Tse Siang et al. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, *[S. l.]*, v. 278, n. 23, p. 4544–4576, 2011. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x.

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; KOH, Cho Yeow. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 8, n. 10, p. 1–27, 2016. DOI: 10.3390/toxins8100284.

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

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.

KORDIŠ, Dušan; GUBENŠEK, Franc. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. **Gene**, *[S. l.]*, v. 261, n. 1, p. 43–52, 2000. DOI: 10.1016/S0378-1119(00)00490-X.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, *[S. l.]*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0.

LANARI, Laura C.; ROSSET, Sergio; GONZÁLEZ, María E.; LIRIA, Natalia; DE ROODT, Adolfo R. A study on the venom of *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron and Duméril, from different regions of Argentina. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 55, n. 8, p. 1415–1424, 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.01.015.

LANDUCCI, Elen C. T. et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A_2 homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 343, n. 2–3, p. 257–263, 1998. DOI: 10.1016/S0014-2999(97)01546-X.

LAUSTSEN, Andreas H.; LOMONTE, Bruno; LOHSE, Brian; FERNÁNDEZ, Julián; GUTIÉRREZ, José María. Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom through venomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 119, p. 126–142, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.02.002. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.002.

LAZAROVICI, Philip; MARCINKIEWICZ, Cezary; LELKES, Peter I. From Snake Venom's Disintegrins and C-Type Lectins to Anti-Platelet Drugs. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 11, n. 5, p. 1–15, 2019. DOI: 10.3390/toxins11050303.

LISTER, Callum et al. Catch a tiger snake by its tail: Differential toxicity, co-factor dependence and antivenom efficacy in a procoagulant clade of Australian venomous snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 202, n. June, p. 39–54, 2017. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.07.005.

LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José María. Phospholipases A_2 from viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage? **Acta Chimica Slovenica**, *[S. l.]*, v. 58, n. 4, p. 647–659, 2011.

LOPES, Daiana S.; FAQUIM-MAURO, Eliana; MAGALHÃES, Geraldo S.; LIMA, Iara C.; BALDO, Cristiani; FOX, Jay W.; MOURA-DA-SILVA, Ana Maria; CLISSA, Patricia B. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 60, n. 6, p. 1072–1084, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.07.004. Disponível em:

http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.004.

LÓPEZ, María S.; MANZANO, Adriana S.; PRIETO, Yanina A. Ontogenetic Variation in Head Morphology and Diet in Two Snakes (Viperidae) from Northeastern Argentina. **Journal of Herpetology**, *[S. l.]*, v. 47, n. 3, p. 406–412, 2013. DOI: 10.1670/12-007. Disponível em: http://www.bioone.org/doi/abs/10.1670/12-007.

LUNA, Milene Schmidt; VALENTE, Richard Hemmi; PERALES, Jonas; VIEIRA, Mônica Larucci; YAMANOUYE, Norma. Activation of *Bothrops jararaca* snake venom gland and venom production: A proteomic approach. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 94, p. 460–472, 2013. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.10.026. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.026.

MACKESSY, P.; HOLZER, M. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A_2. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 34, n. 96, p. 1149–1155, 1996.

MACKESSY, Stephen P. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. [s.l.] : CRC press, 2016.

MACKESSY, Stephen P.; SIXBERRY, Nicole M.; HEYBORNE, William H.; FRITTS, Thomas. Venom of the Brown Treesnake, *Boiga irregularis*: Ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 47, n. 5, p. 537–548, 2006. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.01.007.

MAMEDE, Carla Cristine Neves; DE SOUSA, Bruna Barbosa; PEREIRA, Déborah Fernanda Da Cunha; MATIAS, Mariana Santos; DE QUEIROZ, Mayara Ribeiro; DE MORAIS, Nadia Cristina Gomes; VIEIRA, Sâmela Alves Pereira Batista; STANZIOLA, Leonilda; DE OLIVEIRA, Fábio. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: Enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 117, p. 37–45, 2016. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.03.006.

MARTINS, Marcio; MARQUES, Otavio a V; SAZIMA, Ivan. Ecological and Phylogenetic Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers of the genus *Bothrops*. **Biology of the Vipers**, *[S. l.]*, v. 592, n. 1992, p. 307–328, 1996. Disponível em: http://jararacailhoa.org/conservacaoinsularis/bothrops_feeding.pdf.

MATSUI, Taei; FUJIMURA, Yoshihiro; TITANI, Koiti. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, *[S. l.]*, v. 1477, n. 1–2, p. 146–156, 2000. DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00268-X.

MCCLEARY, Ryan J. R.; SRIDHARAN, Sindhuja; DUNSTAN, Nathan L.; MIRTSCHIN, Peter J.; KINI, R. Manjunatha. Proteomic comparisons of venoms of long-term captive and recently wild-caught Eastern brown snakes (*Pseudonaja textilis*) indicate venom does not change due to captivity. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 144, p. 51–62, 2016. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.05.027. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391916302299.

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.

MÉNEZ, André. **Perspectives in molecular toxinology**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2002.

MIRANDA, Poliana Almeida. **Determinação da atividade hemorrágica da peçonha de serpentes *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro) e frações.** 2002. Universidade Federal de Uberlândia, *[S. l.]*, 2002. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

MODAHL, Cassandra M.; MUKHERJEE, Ashis K.; MACKESSY, Stephen P. An analysis of venom ontogeny and prey-specific toxicity in the Monocled Cobra (*Naja kaouthia*). **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 119, p. 8–20, 2016. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.04.049. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.04.049.

MORA-OBANDO, Diana; FERNÁNDEZ, Julián; MONTECUCCO, Cesare; GUTIÉRREZ, José María; LOMONTE, Bruno. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A_2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 9, n. 10, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109846.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, *[S. l.]*, v. 13, p. 2893–2905, 2007. DOI: 10.2174/138161207782023711.

MURAYAMA, Nobuhiro et al. Cloning and sequence analysis of a Bothrops jararaca cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *[S. l.]*, v. 94, n. 4, p. 1189–1193, 1997. DOI: 10.1073/pnas.94.4.1189.

NOGUEIRA, Cristiano; SAWAYA, Ricardo J.; MARTINS, Marcio. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, *[S. l.]*, v. 37, n. 4, p. 653–659, 2003.

NUNES, Simone De Fátima. Dieta e biologia reprodutiva da cruzeira, *Bothrops alternatus* (SERPENTES-VIPERIDAE), na regiao sul do Brasil. **Biologia**, *[S. l.]*, p. 68, 2006.

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.

ÖHLER, Michaela; GEORGIEVA, Dessislava; SEIFERT, Jana; VON BERGEN, Martin; ARNI, Raghuvir K.; GENOV, Nicolay; BETZEL, Christian. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **Journal of Proteome Research**, *[S. l.]*, v. 9, n. 5, p. 2422–2437, 2010. DOI: 10.1021/pr901128x.

OLIVEIRA, Ana K.; PAES LEME, Adriana F.; ASEGA, Amanda F.; CAMARGO, Antonio C. M.; FOX, Jay W.; SERRANO, Solange M. T. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. **Thrombosis and Haemostasis**, *[S. l.]*, v. 104, n. 3, p. 485–497, 2010. DOI: 10.1160/TH09-12-0855.

PAES LEME, Adriana F.; SHERMAN, Nicholas E.; SMALLEY, David M.; SIZUKUSA, Let??cia O.; OLIVEIRA, Ana K.; MENEZES, Milene C.; FOX, Jay W.; SERRANO, Solange M. T. Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: Insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma. **Journal of Proteome Research**, *[S. l.]*, v. 11, n. 1, p. 279–291, 2012. DOI: 10.1021/pr2006439.

PAWLAK, J. et al. Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. **Faseb J**, *[S. l.]*, v. 23, n. 2, p. 534–545, 2009. DOI: fj.08-113555 [pii]\r10.1096/fj.08-113555.

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.

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.

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.

REICHERT, E. *Bothrops jaracussu*. **Bl. Aquar.-u. Terrarienk.**, *[S. l.]*, v. 47, p. 228, 1936.

REX, Christopher J.; MACKESSY, Stephen P. Venom composition of adult Western Diamondback Rattlesnakes (*Crotalus atrox*) maintained under controlled diet and environmental conditions shows only minor changes. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 164, n. March, p. 51–60, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.03.027. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.027.

REY-SUÁREZ, Paola; LOMONTE, Bruno. Immunological cross-recognition and neutralization studies of *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* venoms by two therapeutic equine antivenoms. **Biologicals**, *[S. l.]*, v. 68, n. May, p. 40–45, 2020. DOI: 10.1016/j.biologicals.2020.08.011.

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.]*, v. 59, n. 1, p. 110–116, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.10.015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.015.

ROCHA, Marisa M. T.; FURTADO, Maria De F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, *[S. l.]*, v. 22, n. 2, p. 383–393, 2005.

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.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, Alexis; LUCENA, Sara; ALFONSO, Andrea; GOINS, Amber; WALLS, Robert; GUERRERO, Belsy; SUNTRAVAT, Montamas; SÁNCHEZ, Elda E. Biological and biochemical characterization of venom from the broad-banded copperhead (*Agkistrodon contortrix laticinctus*): isolation of two new dimeric disintegrins. **Anim Bio Leiden Neth**, *[S. l.]*, v. 66, n. 2, p. 173–187, 2016. DOI: 10.1163/15707563-00002495.Biological.

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.

SASA, M. Diet and snake venom evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation? **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 37, n. 2, p. 249–252, 1999. a. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00121-4.

SASA, Mahmood. Reply. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 37, p. 259–260, 1999. b.

SERINO-SILVA, Caroline et al. Purification and characterization of the first γ-phospholipase inhibitor (γPLI) from *Bothrops jararaca* snake serum. **PloS one**, *[S. l.]*, v. 13, n. 3, p. e0193105, 2018.

SERRANO, Solange M. T.; MAROUN, Rachid C. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.020.

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, Jean Carlos Ramos. **Tratado de animais selvagens-medicina veterinária**. [s.l.] : Editora Roca, 2007.

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 & Cellular Proteomics**, *[S. l.]*, v. 5, n. 1, p. 144–156, 2006.

SMILEY-WALTERS, Sarah A.; FARRELL, Terence M.; GIBBS, H. Lisle. Evaluating local adaptation of a complex phenotype: reciprocal tests of pigmy rattlesnake venoms on treefrog prey. **Oecologia**, *[S. l.]*, v. 184, n. 4, p. 739–748, 2017. DOI: 10.1007/s00442-017-3882-8.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the LYS-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 36, n. 3, p. 503–514, 1998. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00133-5.

SOARES, A M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; BORTOLETO, R. K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R. K.; WARD, R. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops pirajai* snake venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, *[S. l.]*, v. 387, n. 2, p. 188–96, 2001. DOI: 10.1006/abbi.2000.2244. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11370840.

SOARES, Andreimar M.; ANDRIÃO-ESCARSO, Sílvia H.; ANGULO, Yamileth; LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José M.; MARANGONI, Sérgio; TOYAMA, Marcos H.; ARNI, Raghuvir K.; GIGLIO, José R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, *[S. l.]*, v. 373, n. 1, p. 7–15, 2000. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.04.013.

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.

SOUSA, Leijiane F. et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.03.003. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391917300775.

SOUSA, Leijiane F. et al. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. **Toxins**, *[S. l.]*, v. 10, n. 10, 2018. DOI: 10.3390/toxins10100411.

STÁBELI, Rodrigo G. et al. Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. l.]*, v. 41, n. 2, p. 132–140, 2007. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006.

STÁBELI, Rodrigo G.; MARCUSSI, Silvana; CARLOS, Guilherme B.; PIETRO, Rosemeire C. L. R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, Heloísa S.; GIGLIO, José R.; OLIVEIRA, Eduardo B.; SOARES, Andreimar M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, *[S. l.]*, v. 12, n. 11, p. 2881–2886, 2004. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.03.049.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA,

A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, *[S. l.]*, v. 10, n. 4, p. 851–861, 2005. DOI: 10.1007/s10495-005-2945-1.

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.

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, 1983.

THOMAS, R. G.; POUGH, F. H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 17, n. 3, p. 221–228, 1979. DOI: 10.1016/0041-0101(79)90211-3.

TORT, Lluis. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, *[S. l.]*, v. 35, n. 12, p. 1366–1375, 2011. DOI: 10.1016/j.dci.2011.07.002. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; SERVICE, Agricultural Research. **USDA Natrional Database for Standart Reference**. 2018. Disponível em: http://www.ars.usda.gov/nutrientdata.

VENANCIO DE LIMA, Eduardo Oliveira et al. Snake venom color and L-amino acid oxidase: an evidence of long-term captive *Crotalus durissus terrificus* venom plasticity. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 193, n. December 2020, p. 73–83, 2021. DOI: 10.1016/j.toxicon.2021.01.006.

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.

WAGSTAFF, Simon C.; SANZ, Libia; JUÁREZ, Paula; HARRISON, Robert A.; CALVETE, Juan J. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of the ocellated carpet viper, *Echis ocellatus*. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 71, n. 6, p. 609–623, 2009. DOI: 10.1016/j.jprot.2008.10.003. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2008.10.003.

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.

WARRELL, David A. Snake venoms in science and clinical medicine 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, *[S. l.]*, v. 83, n. 6, p. 732–740, 1989.

WARRINGTON, Janet A.; NAIR, Archana; MAHADEVAPPA, Mamatha; TSYGANSKAYA, Maya. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. **Physiological Genomics**, *[S. l.]*, v. 2, n. 3, p. 143–147, 2000. DOI: 10.1152/physiolgenomics.2000.2.3.143.

WHITE, Julian; MEIER, Jurg. **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. [s.l.] : CRC Press, 2017.

WHO. **World Health Organization**. [s.d.]. Disponível em: http://www.who.int/snakebites/disease/en/.

WIEZEL, Gisele A.; SHIBAO, Priscila Y. T.; COLOGNA, Camila T.; MORANDI FILHO, Romualdo;

UEIRA-VIEIRA, Carlos; DE PAUW, Edwin; QUINTON, Loïc; ARANTES, Eliane C. In-Depth Venome of the Brazilian Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: An Integrative Approach Combining Its Venom Gland Transcriptome and Venom Proteome. **Journal of Proteome Research**, *[S. l.]*, v. 17, n. 11, p. 3941–3958, 2018. DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00610.

WÜSTER, W. **Venomous snake systematics: implications for snakebite treatment and toxinology.Toxicon**, 1996. DOI: 10.1016/0041-0101(96)83649-X.

WÜSTER, Wolfgang; DALTRY, Jennifer C.; THORPE, Roger S. Can diet explain intraspecific venom variation?: Reply. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 37, n. 2, p. 259–260, 1999. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00123-8.

XIE, Chunfang et al. Varespladib inhibits the phospholipase A_2 and coagulopathic activities of venom components from hemotoxic snakes. **Biomedicines**, *[S. l.]*, v. 8, n. 6, p. 1–17, 2020. DOI: 10.3390/biomedicines8060165.

ZELANIS, Andre et al. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Proteomics**, *[S. l.]*, v. 11, n. 21, p. 4218–4228, 2011.

ZELANIS, André; SERRANO, Solange M. T.; REINHOLD, Vernon N. N-glycome profiling of *Bothrops jararaca* newborn and adult venoms. **Journal of Proteomics**, *[S. l.]*, v. 75, n. 3, p. 774–782, 2012. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.09.017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.017.

ZELANIS, Andre; 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, 2010.

ZYCHAR, Bianca Cestari; DALE, Camila Squazoni; DEMARCHI, Denise Soares; GONÇALVES, Luis Roberto C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, *[S. l.]*, v. 55, n. 2–3, p. 227–234, 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.07.025.

APÊNDICES

Apêndice 1. Proteínas identificadas no veneno inicial (I), final 1 (F1) e final 2 (F2) de *B. moojeni* (Bm 1). A abundância relativa (%) das toxinas foi estimada por meio de quantificação *lable -free* obtida por espectrometria de massas considerando a média da intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína identificada. As proteínas com diferença estatística quanto a sua abundância relativa com fold change ≥ 1,5 or ≤ 0,67; p<0,05) estão en negrito. NI: não identificada. CTL: Lectina do tipo C; CRISP: *Cystein-rich secretory protein*; LAAO: L-aminoácido oxidase; PLA_2: Fosfolipase A_2; PLB: Fosfolipase B; SVMP: Metaloprotease do veneno de serpentes; SVSP: Serinoprotease do veneno de serpentes; VEGF: Fator de crescimento endotelial de venenos; VNGF: Fator de crescimento neural de venenos.

			Abundância relativa (%)			**Inicial x Final 1**		**Final 1 x Final 2**		**Inicial x Final 2**	
Família da toxina	**Massa molecular (Da)**	**Número de acesso***	**Inicial**	**Final 1**	**Final 2**	***Fold change***	**Valor de p****	***Fold change***	**Valor de p****	***Fold change***	**Valor de p****
5' Nucleotidase	62041,48	A0A1L8D667	1,12%	1,04%	0,98%	0,92	0,06324	0,95	0,25832	0,88	0,06658
CTL	17558,42	A0A1L8D6E3	0,02%	0,00%	0,01%	**Ausente no F1**	**0,01096**	**Ausente no F1**	**0,01071**	**0,46**	**0,02933**
CTL	17436,27	A0A1L8D657	0,85%	0,28%	0,43%	**0,34**	**0,04580**	**1,52**	**0,01730**	0,51	0,06835
CTL	17427,22	A0A1L8D663	0,04%	0,00%	0,02%	**Ausente no F1**	**0,03867**	**Ausente no F1**	**0,17182**	0,56	0,29115
CTL	17473,51	A0A1L8D6G5	0,22%	0,05%	0,01%	**0,25**	**0,03705**	**0,13**	**0,01978**	**0,03**	**0,02451**
CTL	17568,39	A0A1L8D640	0,15%	0,06%	0,06%	**0,39**	**0,01992**	1,00	0,99017	**0,39**	**0,01068**
CTL	17481,35	A0A1L8D644	1,78%	1,20%	1,30%	0,67	0,04692	1,09	0,06950	0,73	0,04205
CTL	17555,35	A0A1L8D6B9	0,63%	0,28%	0,36%	**0,44**	**0,01380**	1,30	0,02121	**0,58**	**0,01147**
CTL	17360,52	A0A1L8D6C2	0,28%	0,06%	0,08%	**0,21**	**0,02739**	1,36	0,00921	**0,29**	**0,02937**
CTL	17295,57	A0A1L8D647	1,75%	2,35%	2,09%	1,35	0,10296	0,89	0,01803	1,20	0,16657
CTL	17203,30	A0A1L8D6H4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17711,07	A0A1L8D6F1	0,42%	0,33%	0,26%	0,78	0,37109	0,77	0,14542	0,61	0,16068
CTL	18486,46	A0A1L8D6E6	0,25%	0,42%	0,56%	**1,70**	**0,04050**	1,33	0,07375	**2,27**	**0,01072**
CTL	17948,16	A0A1L8D622	0,17%	0,14%	0,05%	0,84	0,62772	**0,31**	**0,01210**	0,26	0,21229

CTL	18006,24	A0A1L8D687	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17819,04	A0A1L8D624	0,51%	0,11%	0,16%	**0,22**	**0,03877**	1,42	0,08016	**0,32**	**0,05508**
CTL	17858,12	A0A1L8D632	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	18140,34	A0A1L8D630	0,25%	0,20%	0,43%	0,81	0,11271	**2,12**	**0,00934**	**1,71**	**0,01906**
CTL	19479,99	A0A1L8D619	1,64%	1,09%	1,42%	0,66	0,23055	1,30	0,03253	0,86	0,45226
CTL	17862,80	A0A1L8D6E0	0,08%	0,02%	0,00%	**0,20**	**0,01659**	**Ausente no F2**	**0,01080**	**Ausente no F2**	**0,01540**
CTL	18123,26	A0A1L8D609	0,00%	0,02%	0,02%	**Ausente no I**	**0,01564**	1,06	0,64531	**Ausente no I**	**0,07032**
CTL	19342,56	A0A1L8D638	0,18%	0,04%	0,09%	**0,25**	**0,00970**	2,11	0,07577	**0,54**	**0,03077**
CTL	17056,09	A0A2H4N3D3	0,22%	0,29%	0,14%	1,31	0,10634	**0,46**	**0,01926**	**0,61**	**0,05070**
CTL	18726,40	A0A1L8D636	0,65%	0,44%	0,47%	0,68	0,05488	1,05	0,18321	0,71	0,03904
CTL	17829,13	M1V359	0,43%	1,05%	1,56%	**2,44**	**0,04493**	1,48	0,03568	3,63	0,00869
CTL	18112,50	A0A1L8D634	0,01%	0,01%	0,01%	0,67	0,37566	1,63	0,30916	1,09	0,01680
CTL	17943,23	A0A1L8D6B3	0,09%	0,14%	0,13%	**1,67**	**0,03682**	0,89	0,25331	1,48	0,05228
CTL	19464,87	A0A1L8D623	0,26%	0,21%	0,14%	0,79	0,71490	0,66	0,53779	0,53	0,16433
CTL	17084,14	A0A1L8D629	0,19%	0,25%	0,30%	1,29	0,19385	1,22	0,20116	**1,57**	**0,00002**
CTL	17469,58	A0A1L8D6G9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cistatina	15799,18	A0A2H4N3F5	0,12%	0,03%	0,05%	**0,28**	**0,03727**	1,45	0,51540	0,41	0,18363
Cistatina	15547,84	A0A2H4N3E9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CRISP	27749,10	A0A2H4N3D5	1,90%	1,33%	1,40%	0,70	0,03329	1,05	0,29899	0,73	0,00346
CRISP	27683,86	F2Q6F6	0,49%	1,19%	0,88%	**2,45**	**0,02411**	0,74	0,10213	**1,82**	**0,03601**
Dynein axonemal	25542,26	C5H0U1	1,04%	1,16%	0,97%	1,12	0,10381	0,84	0,12462	0,94	0,44545
Endothelin convertin enzyme	21885,06	B8QCC5	0,10%	0,03%	0,04%	**0,31**	**0,05029**	1,38	0,27264	**0,43**	**0,00054**
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	40700,55	M9NCD2	0,30%	0,35%	0,23%	1,16	0,07162	0,67	0,01071	0,78	0,03384
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	41370,39	M9NCR9	1,51%	1,62%	0,76%	1,07	0,20674	0,47	0,37086	0,50	0,39091
Hialuronidase	53177,03	A0A2H4N3E2	1,59%	1,88%	1,65%	1,18	0,02495	0,88	0,23738	1,04	0,63211
Hialuronidase	53229,06	A0A2H4Z8F4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
LAAO	57239,59	A0A2H4N3D4	0,89%	2,15%	1,61%	**2,42**	**0,00631**	0,75	0,05404	**1,81**	**0,02989**
LAAO	57096,45	A0A0S1LJ33	1,87%	0,54%	0,63%	**0,29**	**0,04695**	1,15	0,11732	**0,33**	**0,04223**
LAAO	57060,40	A0A1L8D615	0,72%	0,85%	0,61%	1,18	0,06445	0,72	0,02353	0,85	0,12623
Fosfodiesterase	93284,97	A0A1L8D6B7	1,17%	0,99%	1,12%	0,85	0,17760	1,13	0,07954	0,96	0,58347

PLA_2-D49 ácida	16263,02	A0A1L8D5Z4	1,27%	1,42%	1,51%	1,12	0,29491	1,06	0,56787	1,19	0,07861
PLA_2-D49 ácida	16203,81	I2DAL5	0,79%	0,87%	0,73%	1,09	0,51090	0,84	0,16262	0,92	0,36272
PLA_2-D49 ácida	16232,89	I2DAL4	0,15%	0,22%	0,10%	1,43	0,35534	0,44	0,10719	0,63	0,21950
PLA_2-D49 ácida	16287,08	A0A1L8D6C4	0,42%	0,55%	0,71%	1,30	0,25694	1,28	0,20512	**1,66**	**0,00873**
PLA_2-D49 ácida	16123,80	M1TFP9	0,17%	0,14%	0,17%	0,79	0,40375	1,28	0,36625	1,01	0,50462
PLA_2-D49 ácida	16820,72	A8E2V5	0,30%	0,15%	0,13%	**0,50**	**0,00063**	0,91	0,26916	**0,45**	**0,02397**
PLA_2-D49 ácida	16313,25	A0A1L8D602	0,26%	0,18%	0,22%	0,69	0,07589	1,25	0,10586	0,86	0,28777
PLA_2-D49 ácida	14824,18	A0A2D1UXN7	0,26%	0,37%	0,37%	1,43	0,23523	1,00	0,96351	1,43	0,27554
PLA_2-D49 ácida	16768,66	A8E2V6	0,12%	0,12%	0,13%	0,99	0,98627	1,11	0,79398	1,10	0,22946
PLA_2-K49	16416,71	A0A1S5XW05	1,29%	1,97%	1,81%	1,53	0,09109	0,92	0,19240	1,40	0,17455
PLA_2-K49	16497,76	A0A2H4N391	3,00%	2,19%	2,56%	0,73	0,12398	1,17	0,38413	0,86	0,13957
PLA_2-K49	14648,45	I6L8L6	1,67%	2,11%	2,07%	1,26	0,21383	0,98	0,55670	1,23	0,30353
PLA_2-K49	16471,67	A0A1L8D605	0,17%	0,05%	0,02%	**0,29**	**0,02042**	**0,33**	**0,00423**	**0,10**	**0,01688**
PLA_2-K49	16413,77	A0A1L8D5Z7	3,45%	5,05%	4,67%	1,47	0,02167	0,92	0,27912	1,35	0,12090
PLA_2-K49	16636,11	I2DAL6	0,73%	1,29%	1,63%	1,77	0,05360	1,26	0,21348	**2,23**	**0,04840**
PLA_2-K49	16364,70	L7VGC1	0,54%	0,35%	0,54%	0,65	0,43077	1,54	0,36249	1,00	0,96488
PLA_2-K49	14303,08	A8E2V7	0,45%	0,88%	0,89%	**1,95**	**0,00113**	1,01	0,95480	1,98	0,25197
Inibidor de PLA_2	18713,14	A0A2H4N3E1	0,21%	0,30%	0,27%	1,45	0,60990	0,90	0,18419	1,31	0,69309
Inibidor de PLA2	37998,37	A0A2H4N3D8	0,17%	0,27%	0,24%	1,60	0,10351	0,88	0,13110	1,41	0,09072
PLB	64274,29	A0A2H4N395	1,52%	1,37%	1,13%	0,90	0,02620	0,83	0,01985	0,74	0,00174
SVMP - PI	25011,11	A0A2H4N390	1,63%	2,13%	2,15%	1,31	0,03207	1,01	0,45808	1,31	0,01841
SVMP - PI	46658,39	A0A1L8D5Y9	0,48%	1,25%	0,00%	**2,63**	**0,04314**	**Ausente no F2**	**0,01868**	Ausente no F2	0,02122
SVMP - PI	46811,75	A0A1L8D6A8	0,41%	1,06%	2,45%	**2,56**	**0,04900**	**2,32**	**0,02820**	**5,95**	**0,03478**
SVMP - PI	46668,55	A0A1L8D683	0,08%	0,08%	0,13%	1,10	0,73918	1,55	0,23627	**1,70**	**0,00185**
SVMP - PI	43610,02	A0A1L8D5Z8	1,10%	0,69%	0,77%	0,63	0,31587	1,11	0,75866	0,70	0,05736
SVMP - PI	46996,66	A0A1L8D5Y8	1,13%	0,74%	0,32%	0,66	0,35932	0,43	0,43610	0,28	0,08098
SVMP - PI	27582,97	E3UJL4	0,54%	0,45%	0,40%	0,84	0,24535	0,88	0,06222	0,74	0,18039
SVMP - PI	27623,07	E3UJL3	0,32%	0,69%	0,60%	**2,18**	**0,00297**	0,87	0,06612	**1,90**	**0,01677**
SVMP - PI	47312,40	Q1ZZ79	0,54%	0,80%	0,59%	1,48	0,02773	0,73	0,10074	1,08	0,29376

SVMP - PII	54822,06	A0A1L8D600	0,39%	0,90%	0,88%	2,28	0,29624	0,98	0,97335	2,24	0,17882
SVMP - PII	54387,81	A0A1L8D6A9	0,38%	0,25%	0,16%	0,66	0,19273	**0,64**	**0,01232**	0,42	0,12019
SVMP - PII	35980,95	E3UJM0	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PII	37862,46	Q7T1T5	3,03%	3,06%	2,42%	1,01	0,88934	0,79	0,00126	0,80	0,22342
SVMP - PII	54595,92	A0A1L8D5Z6	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PII	37509,63	E3UJL5	0,61%	0,62%	0,46%	1,02	0,68694	0,74	0,09282	0,76	0,00892
SVMP - PII	34727,18	E3UJL9	0,72%	0,14%	0,13%	**0,20**	**0,02707**	0,89	0,67251	0,18	0,05751
SVMP - PII	56628,59	A0A1L8D5Z3	1,07%	0,64%	0,76%	**0,60**	**0,04378**	1,18	0,26485	0,71	0,04518
SVMP - PII	54667,63	A0A1L8D5Z0	0,64%	0,72%	0,88%	1,13	0,02560	1,22	0,09252	1,38	0,06978
SVMP - PII	54991,95	A0A1L8D649	0,17%	0,13%	0,12%	0,79	0,10040	0,91	0,15401	0,72	0,11387
SVMP - PII	37768,58	E3UJL7	1,37%	0,67%	1,12%	**0,49**	**0,03379**	**1,66**	**0,02965**	0,82	0,04128
SVMP - PII	35237,65	E3UJL8	0,09%	0,18%	0,17%	2,01	0,07460	0,98	0,91575	1,98	0,11608
SVMP - PII	56077,46	A0A1L8D675	0,34%	0,45%	0,59%	1,31	0,03830	1,32	0,33480	1,73	0,19155
SVMP - PIII	70514,41	A0A0K2JNB8	0,20%	0,68%	0,85%	3,35	0,07161	1,24	0,08690	**4,17**	**0,03067**
SVMP - PIII	70271,33	A0A1L8D5X9	2,79%	2,05%	2,12%	0,74	0,18600	1,03	0,80505	0,76	0,01814
SVMP - PIII	27970,99	Q7T1T3	0,12%	0,07%	0,08%	0,61	0,46098	1,14	0,11590	0,70	0,52274
SVMP - PIII	69891,42	A0A1L8D641	0,45%	0,24%	0,41%	0,52	0,13128	**1,74**	**0,00914**	0,91	0,50839
SVMP - PIII	8371,70	C3UWN4	0,04%	0,04%	0,01%	0,91	0,73137	0,37	0,21870	**0,34**	**0,00674**
SVMP - PIII	70541,54	A0A1S6K7T1	1,00%	1,10%	1,15%	1,10	0,22823	1,05	0,07623	1,15	0,17667
SVMP - PIII	51303,84	E3UJL2	1,64%	1,70%	2,01%	1,04	0,49261	1,18	0,39928	1,22	0,41604
SVMP - PIII	70083,79	A0A1L8D5X6	1,95%	2,02%	2,44%	1,04	0,87569	1,21	0,08343	1,25	0,32914
SVMP - PIII	70899,14	A0A1L8D5V7	0,99%	1,22%	1,26%	1,23	0,14354	1,03	0,55903	1,26	0,03433
SVMP - PIII	70668,97	A0A1L8D5V8	1,26%	0,78%	0,90%	**0,62**	**0,02380**	1,15	0,14999	0,72	0,01942
SVMP - PIII	70133,74	A0A1L8D5X7	0,56%	0,39%	0,55%	0,70	0,30061	1,41	0,22240	0,98	0,95411
SVMP - PIII	70175,46	A0A1L8D5Z1	0,14%	0,57%	0,42%	**4,11**	**0,02302**	0,74	0,03205	**3,04**	**0,01830**
SVMP - PIII	69564,32	A0A1L8D5Y2	0,21%	0,14%	0,11%	0,68	0,59673	0,74	0,00777	0,50	0,45703
SVMP - PIII	70198,30	A0A1L8D691	1,40%	1,16%	1,01%	0,83	0,11635	0,87	0,05490	0,72	0,05083
SVMP - PIII	69882,26	A0A1L8D5X8	0,77%	0,54%	0,90%	0,70	0,13838	**1,66**	**0,01813**	1,17	0,28002
SVMP - PIII	71139,30	A0A1L8D5X1	0,45%	0,43%	0,40%	0,96	0,56779	0,93	0,35979	0,89	0,06639
SVMP - PIII	70839,89	A0A1L8D656	0,46%	0,60%	0,77%	1,29	0,16937	1,29	0,14664	1,65	0,00844
SVMP - PIII	69765,31	A0A1L8D689	0,58%	0,70%	0,76%	1,20	0,13888	1,09	0,04199	1,31	0,07888
SVMP - PIII	70656,69	A0A1L8D646	1,14%	1,37%	1,54%	1,20	0,03449	1,12	0,00477	1,35	0,01806

SVMP - PIII	69670,31	A0A1L8D5X3	1,53%	2,34%	2,13%	**1,53**	**0,01763**	0,91	0,00086	1,39	0,02369
SVMP - PIII	70734,91	A0A1L8D5W6	0,68%	1,10%	1,59%	1,62	0,27398	1,45	0,05928	2,36	0,10190
SVMP - PIII	70982,90	A0A1L8D677	0,67%	0,38%	0,31%	0,56	0,14124	0,82	0,43687	**0,46**	**0,01900**
SVMP - PIII	71010,12	A0A1L8D633	0,07%	0,27%	0,14%	**3,92**	**0,02554**	0,53	0,08002	2,06	0,07014
SVMP - PIII	9553,68	C3UWN2	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PIII	70572,85	A0A1L8D5X2	1,30%	1,13%	1,42%	0,87	0,39829	1,25	0,10910	1,09	0,37672
SVMP - PIII	70412,70	A0A1L8D682	0,27%	0,20%	0,27%	0,73	0,46019	1,36	0,49675	0,99	0,78804
SVMP - PIII	9538,66	C3UWN3	0,07%	0,04%	0,02%	0,57	0,05599	**0,51**	**0,04822**	**0,29**	**0,01547**
SVMP - PIII	70013,13	A0A1L8D6A0	1,25%	1,17%	1,36%	0,94	0,11496	1,17	0,09966	1,10	0,08965
SVMP - PIII	70266,39	A0A1L8D5Y6	0,44%	0,24%	0,15%	**0,54**	**0,00840**	0,61	0,06918	**0,33**	**0,01574**
SVMP - PIII	70054,30	A0A1L8D5Y7	0,15%	0,20%	0,09%	1,34	0,15515	0,47	0,06720	**0,62**	**0,01505**
SVMP - PIII	51806,57	E3UJL0	0,36%	0,26%	0,19%	0,73	0,02520	0,72	0,05202	**0,53**	**0,00794**
SVMP - PIII	51680,38	E3UJL1	0,98%	0,48%	0,24%	**0,49**	**0,00749**	**0,50**	**0,01042**	**0,24**	**0,00168**
SVMP - PIII	69862,22	A0A1L8D666	0,51%	0,32%	0,54%	0,62	0,43061	1,69	0,12550	1,05	0,83138
SVMP - PIII	69687,94	A0A1L8D5Y0	0,16%	0,50%	0,70%	**3,05**	**0,03685**	1,39	0,15245	**4,23**	**0,03314**
SVSP	28428,05	A0A1L8D5V4	1,43%	1,66%	1,53%	1,16	0,06033	0,93	0,11430	1,07	0,00735
SVSP	28948,42	A0A1L8D664	1,46%	1,65%	1,25%	1,13	0,12246	0,76	0,00593	0,86	0,10144
SVSP	28728,42	A0A1L8D5T9	2,22%	1,51%	1,54%	0,68	0,01001	1,02	0,50198	0,69	0,04291
SVSP	29027,74	A0A1L8D5R9	1,19%	1,55%	1,47%	1,30	0,00904	0,95	0,23195	1,24	0,05604
SVSP	28560,44	A0A1L8D674	1,00%	0,72%	0,78%	0,72	0,06593	1,08	0,17562	0,78	0,12623
SVSP	29337,44	A0A1L8D620	0,62%	0,53%	0,77%	0,86	0,00035	1,45	0,11436	1,25	0,17631
SVSP	29308,40	A0A1L8D5U9	0,73%	0,85%	0,53%	1,17	0,68111	**0,62**	**0,02673**	0,73	0,54255
SVSP	29421,56	A0A1L8D635	0,47%	0,33%	0,44%	0,70	0,44762	1,32	0,03283	0,93	0,83113
SVSP	28437,96	A0A1L8D658	0,90%	0,18%	0,16%	**0,19**	**0,00769**	0,92	0,05272	**0,18**	**0,00859**
SVSP	29207,00	A0A1L8D5V0	0,83%	0,83%	0,51%	0,99	0,85465	0,62	0,01598	0,62	0,05080
SVSP	28803,54	A0A1L8D5W4	1,19%	0,87%	0,76%	0,73	0,30748	0,88	0,06396	0,64	0,22543
SVSP	29171,08	A0A1L8D5U8	0,32%	0,33%	0,46%	1,03	0,12479	1,40	0,10574	1,44	0,10703
SVSP	29223,30	A0A1L8D5W3	0,58%	0,50%	0,62%	0,87	0,02326	1,22	0,13319	1,07	0,37315
SVSP	29067,67	A0A1L8D5U3	0,75%	0,76%	1,11%	1,01	0,72770	1,45	0,17277	1,47	0,12897
SVSP	28937,85	A0A1L8D626	0,58%	0,55%	0,45%	0,96	0,34423	0,81	0,14447	0,77	0,04854
SVSP	28953,03	A0A1L8D668	0,96%	0,76%	0,65%	0,79	0,00040	0,86	0,32217	0,68	0,12085
SVSP	29064,03	A0A1L8D610	0,48%	0,45%	0,41%	0,95	0,91462	0,91	0,31272	0,86	0,78513

SVSP	28684,37	A0A1L8D5V3	0,37%	1,15%	1,04%	**3,11**	**0,02940**	0,91	0,31125	**2,83**	**0,01816**
SVSP	28580,27	A0A1L8D5W5	0,14%	0,19%	0,11%	1,38	0,17776	**0,55**	**0,03395**	0,76	0,33999
TNF Receptor	24397,61	B9TWJ1	0,03%	0,03%	0,05%	0,98	0,88259	1,65	0,27951	1,63	0,35206
VEGF	16847,05	A0A1L8D651	1,22%	0,34%	0,29%	0,28	0,29983	0,85	0,13678	0,24	0,29156
VNGF	27652,89	A0A1L8D608	1,68%	1,73%	1,84%	1,03	0,61739	1,06	0,10303	1,10	0,24338
VNGF	21705,01	B8QCH4	0,25%	0,21%	0,19%	0,87	0,32953	0,86	0,08952	0,75	0,14192
Waprin	9138,53	A0A2H4N3F1	0,11%	0,10%	0,15%	0,89	0,68492	1,62	0,23065	1,44	0,00943
Waprin	10279,97	A0A2H4N3E0	0,04%	0,03%	0,04%	0,66	0,10475	1,35	0,02943	0,89	0,24474
Total de proteínas identificadas	**136**										

*De acordo com UniProtKB (www.uniprot.org)

**As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste t de Student e valores de $p<0,05$ foram considerados.

Apêndice 2. Proteínas identificadas no veneno inicial (I), final 1 (F1) e final 2 (F2) de *B. moojeni* (Bm 4). A abundância relativa (%) das toxinas foi estimada por meio de quantificação *lable -free* obtida por espectrometria de massas considerando a média da intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína identificada. As proteínas com diferença estatística quanto a sua abundância relativa com fold change ≥ 1,5 or ≤ 0,67; p<0,05) estão en negrito. NI: não identificada. CTL: Lectina do tipo C; CRISP: *Cystein-rich secretory protein*; LAAO: L-aminoácido oxidase; PLA_2: Fosfolipase A_2; PLB: Fosfolipase B; SVMP: Metaloprotease do veneno de serpentes; SVSP: Serinoprotease do veneno de serpentes; VEGF: Fator de crescimento endotelial de venenos; VNGF: Fator de crescimento neural de venenos.

			Abundância relativa (%)			Inicial x Final 1		Final 1 x Final 2		Inicial x Final 2	
Famílias de toxinas	**Massa Molecular (Da)**	**Número de acesso***	**Inicial**	**Final 1**	**Final 2**	***Fold change***	**Valor de p****	***Fold change***	**Valor de p****	***Fold change***	**Valor de p****
5' Nucleotidase	62041,48	A0A1L8D667	1,35%	1,42%	1,55%	1,05	0,41989	1,09	0,12913	1,14	0,10293
CTL	17558,42	A0A1L8D6E3	0,00%	0,00%	0,05%	NI	NI	**Ausente no F1**	**0,01208**	**Ausente no I**	**0,01208**
CTL	17436,27	A0A1L8D657	1,48%	1,42%	1,73%	0,96	0,47462	1,21	0,05334	1,16	0,08250
CTL	17427,22	A0A1L8D663	0,00%	0,03%	0,00%	**Ausente no I**	**0,04031**	**Ausente no F2**	**0,04031**	NI	NI
CTL	17473,51	A0A1L8D6G5	0,00%	0,00%	0,02%	NI	NI	**Ausente no F1**	**0,01146**	**Ausente no I**	**0,01146**
CTL	17568,39	A0A1L8D640	0,39%	0,26%	0,38%	0,67	0,06647	1,43	0,01770	0,96	0,52169
CTL	17481,35	A0A1L8D644	0,52%	0,43%	0,63%	0,82	0,03312	1,47	0,01885	1,20	0,06648
CTL	17555,35	A0A1L8D6B9	0,56%	0,61%	0,67%	1,07	0,10674	1,11	0,02892	1,19	0,05914
CTL	17360,52	A0A1L8D6C2	0,12%	0,16%	0,32%	1,32	0,17621	**1,95**	**0,03403**	2,57	0,06359
CTL	17295,57	A0A1L8D647	0,82%	0,79%	0,62%	0,97	0,75466	0,78	0,01943	0,76	0,21333
CTL	17203,30	A0A1L8D6H4	0,36%	0,48%	0,79%	1,35	0,16256	**1,65**	**0,03892**	2,23	0,07528
CTL	17711,07	A0A1L8D6F1	0,91%	0,83%	0,59%	0,90	0,04010	0,72	0,01164	**0,65**	**0,00249**
CTL	18486,46	A0A1L8D6E6	0,85%	0,65%	0,84%	0,77	0,01362	1,28	0,05941	0,99	0,69228
CTL	17948,16	A0A1L8D622	0,41%	0,43%	0,29%	1,05	0,48222	0,67	0,00755	0,70	0,09928
CTL	18006,24	A0A1L8D687	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17819,04	A0A1L8D624	0,31%	0,28%	0,32%	0,90	0,02409	1,17	0,07283	1,05	0,24568
CTL	17858,12	A0A1L8D632	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI

CTL	18140,34	A0A1L8D630	0,49%	0,15%	0,14%	**0,30**	**0,02836**	0,94	0,17258	**0,28**	**0,02333**
CTL	19479,99	A0A1L8D619	1,28%	1,13%	0,98%	0,88	0,16894	0,87	0,09977	0,77	0,13544
CTL	17862,80	A0A1L8D6E0	0,00%	0,03%	0,04%	Ausente no I	0,29170	1,43	0,51429	**Ausente no I**	**0,02042**
CTL	18123,26	A0A1L8D609	0,05%	0,09%	0,03%	1,95	0,05767	**0,37**	**0,03199**	0,71	0,05348
CTL	19342,56	A0A1L8D638	0,06%	0,07%	0,07%	1,14	0,65160	0,90	0,70513	1,03	0,00784
CTL	17056,09	A0A2H4N3D3	0,06%	0,06%	0,04%	1,06	0,22189	0,71	0,04851	0,75	0,11673
CTL	18726,40	A0A1L8D636	0,37%	0,40%	0,26%	1,10	0,10289	**0,64**	**0,00560**	0,70	0,02520
CTL	17829,13	M1V359	1,46%	0,91%	1,04%	**0,62**	**0,04881**	1,15	0,16599	0,72	0,11786
CTL	18112,50	A0A1L8D634	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17943,23	A0A1L8D6B3	0,35%	0,35%	0,11%	0,99	0,90669	0,32	0,13223	0,32	0,09746
CTL	19464,87	A0A1L8D623	1,29%	1,35%	0,84%	1,04	0,82891	0,63	0,23355	**0,65**	**0,00003**
CTL	17084,14	A0A1L8D629	0,07%	0,15%	0,24%	**2,00**	**0,00161**	**1,64**	**0,02468**	**3,28**	**0,01456**
CTL	17469,58	A0A1L8D6G9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cistatina	15799,18	A0A2H4N3F5	0,03%	0,04%	0,02%	1,30	0,19884	0,62	0,08148	0,81	0,11095
Cistatina	15547,84	A0A2H4N3E9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CRISP	27749,10	A0A2H4N3D5	2,48%	2,20%	2,38%	0,89	0,01680	1,08	0,04119	0,96	0,02479
CRISP	27683,86	F2Q6F6	0,50%	0,45%	0,69%	0,91	0,20178	**1,54**	**0,02723**	1,40	0,01426
Dynein axonemal	25542,26	C5H0U1	0,87%	1,10%	0,78%	1,27	0,13627	0,71	0,14843	0,90	0,17959
Endothelin convertin enzyme	21885,06	B8QCC5	0,33%	0,21%	0,16%	0,66	0,44647	0,76	0,04273	0,50	0,32111
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	40700,55	M9NCD2	0,24%	0,22%	0,21%	0,91	0,01353	0,99	0,57728	0,90	0,10990
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	41370,39	M9NCR9	1,20%	0,74%	0,65%	**0,62**	**0,00246**	0,88	0,08220	**0,54**	**0,01161**
Hialuronidase	53177,03	A0A2H4N3E2	2,46%	2,51%	2,08%	1,02	0,91769	0,83	0,39659	0,85	0,08543
Hialuronidase	53229,06	A0A2H4Z8F4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
LAAO	57239,59	A0A2H4N3D4	1,76%	0,82%	0,98%	**0,47**	**0,03962**	1,19	0,09677	**0,56**	**0,02795**
LAAO	57096,45	A0A0S1LJ33	0,78%	1,49%	1,28%	**1,91**	**0,04365**	0,86	0,12085	**1,64**	**0,01093**
LAAO	57060,40	A0A1L8D615	0,62%	0,58%	0,80%	0,94	0,14517	1,38	0,05485	1,29	0,09899

Fosfodiesterase	93284,97	A0A1L8D6B7	1,44%	2,08%	1,77%	1,44	0,05201	0,85	0,02387	1,23	0,12110
PLA_2 - D49 - ácida	16263,02	A0A1L8D5Z4	1,08%	1,24%	1,31%	1,16	0,06289	1,06	0,10906	1,22	0,01216
PLA_2 - D49 - ácida	16203,81	I2DAL5	0,54%	0,50%	0,37%	0,92	0,03517	0,74	0,01715	0,68	0,02140
PLA_2 - D49 - ácida	16232,89	I2DAL4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
PLA_2 - D49 - ácida	16287,08	A0A1L8D6C4	0,79%	0,81%	0,96%	1,03	0,24056	1,18	0,00386	1,22	0,03404
PLA_2 - D49 - ácida	16123,80	M1TFP9	0,08%	0,15%	0,13%	**1,94**	**0,02829**	0,84	0,03916	**1,63**	**0,02301**
PLA_2 - D49 - ácida	16820,72	A8E2V5	0,24%	0,13%	0,15%	**0,53**	**0,03777**	1,18	0,13808	0,62	0,08332
PLA_2 - D49 - ácida	16313,25	A0A1L8D602	0,21%	0,36%	0,21%	1,74	0,24974	0,58	0,07769	1,01	0,98701
PLA_2 - D49 - ácida	14824,18	A0A2D1UXN7	0,69%	0,49%	0,44%	0,71	0,02158	0,90	0,00791	**0,63**	**0,01573**
PLA_2 - D49 - ácida	16768,66	A8E2V6	0,06%	0,07%	0,08%	1,18	0,15026	1,08	0,40386	1,28	0,05277
PLA_2 - K49	16416,71	A0A1S5XW05	2,10%	2,08%	2,05%	0,99	0,71891	0,98	0,00849	0,97	0,39717
PLA_2 - K49	16497,76	A0A2H4N391	1,00%	1,24%	1,99%	1,24	0,10644	**1,60**	**0,00594**	**1,98**	**0,02125**
PLA_2 - K49	14648,45	I6L8L6	1,85%	2,12%	1,96%	1,15	0,13565	0,92	0,02298	1,06	0,29548
PLA_2 - K49	16471,67	A0A1L8D605	0,26%	0,41%	0,29%	1,55	0,07693	0,72	0,03373	1,11	0,23889
PLA_2 - K49	16413,77	A0A1L8D5Z7	4,03%	4,16%	3,79%	1,03	0,46339	0,91	0,32146	0,94	0,22567
PLA_2 - K49	16636,11	I2DAL6	0,19%	0,19%	0,20%	1,01	0,51031	1,06	0,06374	1,07	0,05198
PLA_2 - K49	16364,70	L7VGC1	1,11%	1,56%	1,56%	1,40	0,01046	1,00	0,99843	1,40	0,25948
PLA_2 - K49	14303,08	A8E2V7	1,83%	1,74%	1,63%	0,95	0,07273	0,94	0,38502	0,89	0,20289
PLA_2 Inhibitor	18713,14	A0A2H4N3E1	0,18%	0,18%	0,18%	1,00	0,99085	1,01	0,70079	1,01	0,87016
PLA_2 Inhibitor	37998,37	A0A2H4N3D8	0,13%	0,09%	0,14%	0,70	0,05066	**1,64**	**0,01456**	1,14	0,14830
PLB	64274,29	A0A2H4N395	1,08%	1,09%	0,97%	1,01	0,89057	0,89	0,13638	0,90	0,14474
SVMP - PI	25011,11	A0A2H4N390	2,81%	2,32%	1,94%	0,83	0,35449	0,84	0,05138	0,69	0,23340
SVMP - PI	46658,39	A0A1L8D5Y9	0,30%	0,00%	0,00%	**Ausente no F1**	**0,00939**	NI	NI	**Ausente no F2**	**0,00939**
SVMP - PI	46811,75	A0A1L8D6A8	0,42%	0,78%	0,79%	**1,87**	**0,02428**	1,01	0,75915	**1,88**	**0,04892**
SVMP - PI	46668,55	A0A1L8D683	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PI	43610,02	A0A1L8D5Z8	1,66%	1,78%	1,68%	1,07	0,07595	0,94	0,21046	1,01	0,59918
SVMP - PI	46996,66	A0A1L8D5Y8	0,98%	0,91%	1,21%	0,93	0,10475	1,33	0,00667	1,23	0,02366

SVMP - PI	27582,97	E3UJL4	1,06%	1,11%	0,95%	1,04	0,23755	0,86	0,09046	0,90	0,22305
SVMP - PI	27623,07	E3UJL3	0,00%	0,08%	0,35%	**Ausente no I**	**0,00607**	**4,62**	**0,04291**	**Ausente no I**	**0,03495**
SVMP - PI	47312,40	Q1ZZ79	1,26%	0,89%	1,36%	0,71	0,05680	**1,52**	**0,00457**	1,08	0,21594
SVMP - PII	54822,06	A0A1L8D600	1,53%	1,00%	0,38%	**0,66**	**0,02344**	**0,38**	**0,00103**	**0,25**	**0,01125**
SVMP - PII	54387,81	A0A1L8D6A9	0,05%	0,24%	0,14%	**5,07**	**0,00600**	0,60	0,07055	3,04	0,08189
SVMP - PII	35980,95	E3UJM0	0,77%	0,60%	0,00%	0,78	0,07560	**Ausente no F2**	**0,00384**	**Ausente no F2**	**0,01348**
SVMP - PII	37862,46	Q7T1T5	0,81%	0,89%	1,81%	1,09	0,21973	**2,04**	**0,00634**	**2,23**	**0,01127**
SVMP - PII	54595,92	A0A1L8D5Z6	0,19%	0,21%	0,00%	1,15	0,07927	**Ausente no F2**	**0,01550**	**Ausente no F2**	**0,00576**
SVMP - PII	37509,63	E3UJL5	1,43%	1,20%	1,04%	0,84	0,06381	0,86	0,05289	0,73	0,01503
SVMP - PII	34727,18	E3UJL9	0,13%	0,30%	0,12%	**2,33**	**0,02557**	**0,40**	**0,02734**	0,93	0,06323
SVMP - PII	56628,59	A0A1L8D5Z3	1,13%	1,06%	0,86%	0,94	0,18239	0,81	0,02671	0,77	0,06634
SVMP - PII	54667,63	A0A1L8D5Z0	0,13%	0,16%	0,23%	1,21	0,02500	1,48	0,02715	**1,80**	**0,02658**
SVMP - PII	54991,95	A0A1L8D649	0,23%	0,28%	0,18%	1,19	0,10443	**0,64**	**0,03458**	0,76	0,02016
SVMP - PII	37768,58	E3UJL7	0,51%	0,52%	0,44%	1,02	0,80054	0,85	0,08723	0,86	0,21165
SVMP - PII	35237,65	E3UJL8	0,15%	0,17%	0,19%	1,18	0,07530	1,08	0,07395	1,28	0,07484
SVMP - PII	56077,46	A0A1L8D675	0,65%	0,50%	0,62%	0,77	0,04120	1,24	0,06237	0,95	0,40343
SVMP - PIII	70514,41	A0A0K2JNB8	1,30%	1,50%	1,93%	1,15	0,06568	1,29	0,01424	1,49	0,01084
SVMP - PIII	70271,33	A0A1L8D5X9	2,05%	2,05%	2,07%	1,00	0,99555	1,01	0,18731	1,01	0,70685
SVMP - PIII	27970,99	Q7T1T3	0,78%	1,08%	2,28%	1,37	0,06074	**2,12**	**0,00129**	**2,91**	**0,01080**
SVMP - PIII	69891,42	A0A1L8D641	0,21%	0,31%	0,61%	1,47	0,00330	**1,98**	**0,03505**	**2,91**	**0,02559**
SVMP - PIII	8371,70	C3UWN4	0,00%	0,00%	0,03%	NI	NI	**Ausente no F1**	**0,00726**	**Ausente no I**	**0,00726**
SVMP - PIII	70541,54	A0A1S6K7T1	1,20%	1,06%	1,17%	0,88	0,15422	1,10	0,13298	0,97	0,22562
SVMP - PIII	51303,84	E3UJL2	0,82%	0,65%	0,52%	0,80	0,01543	0,79	0,08066	**0,63**	**0,04501**
SVMP - PIII	70083,79	A0A1L8D5X6	1,66%	1,57%	1,70%	0,95	0,00155	1,08	0,00558	1,02	0,01455
SVMP - PIII	70899,14	A0A1L8D5V7	0,77%	0,81%	0,75%	1,05	0,04600	0,93	0,10727	0,97	0,21632
SVMP - PIII	70668,97	A0A1L8D5V8	0,78%	0,82%	0,78%	1,06	0,34294	0,95	0,38898	1,00	0,49651
SVMP - PIII	70133,74	A0A1L8D5X7	0,43%	0,51%	0,61%	1,18	0,08657	1,20	0,12625	1,42	0,03527

SVMP - PIII	70175,46	A0A1L8D5Z1	0,36%	0,24%	0,34%	**0,65**	**0,00110**	1,45	0,01207	0,95	0,07453
SVMP - PIII	69564,32	A0A1L8D5Y2	0,64%	0,81%	0,74%	1,27	0,02813	0,91	0,25794	1,16	0,13551
SVMP - PIII	70198,30	A0A1L8D691	1,55%	1,52%	1,84%	0,98	0,01477	1,21	0,02414	1,19	0,02507
SVMP - PIII	69882,26	A0A1L8D5X8	1,33%	1,34%	2,19%	1,00	0,94554	**1,64**	**0,00708**	**1,64**	**0,03250**
SVMP - PIII	71139,30	A0A1L8D5X1	0,17%	0,26%	0,17%	1,49	0,06279	0,66	0,00937	0,99	0,87562
SVMP - PIII	70839,89	A0A1L8D656	0,28%	0,21%	0,38%	0,77	0,00826	1,79	0,05862	1,39	0,08768
SVMP - PIII	69765,31	A0A1L8D689	1,70%	1,88%	2,18%	1,10	0,08084	1,16	0,05285	1,28	0,00285
SVMP - PIII	70656,69	A0A1L8D646	1,09%	1,28%	1,30%	1,17	0,10634	1,02	0,52154	1,20	0,01162
SVMP - PIII	69670,31	A0A1L8D5X3	2,59%	2,21%	2,05%	0,85	0,09755	0,93	0,14618	0,79	0,02507
SVMP - PIII	70734,91	A0A1L8D5W6	0,76%	1,01%	1,21%	1,33	0,04296	1,20	0,02675	**1,60**	**0,03574**
SVMP - PIII	70982,90	A0A1L8D677	0,11%	0,07%	0,11%	0,66	0,02037	1,47	0,09921	0,97	0,58249
SVMP - PIII	71010,12	A0A1L8D633	0,17%	0,10%	0,17%	**0,57**	**0,00063**	1,80	0,05171	1,03	0,59459
SVMP - PIII	9553,68	C3UWN2	0,00%	0,03%	0,04%	**Ausente no I**	**0,00894**	1,41	0,22712	**Ausente no I**	0,07497
SVMP - PIII	70572,85	A0A1L8D5X2	0,38%	0,48%	0,12%	1,28	0,10248	**0,25**	**0,00782**	**0,32**	**0,03098**
SVMP - PIII	70412,70	A0A1L8D682	0,21%	0,30%	0,60%	1,45	0,01635	**1,98**	**0,00511**	**2,88**	**0,00782**
SVMP - PIII	9538,66	C3UWN3	0,01%	0,06%	0,04%	**4,30**	**0,01255**	0,61	0,11629	2,63	0,14293
SVMP - PIII	70013,13	A0A1L8D6A0	0,05%	0,04%	0,08%	0,76	0,20790	2,02	0,05160	**1,53**	**0,02246**
SVMP - PIII	70266,39	A0A1L8D5Y6	0,63%	0,77%	0,48%	1,22	0,22292	**0,63**	**0,03234**	0,76	0,15140
SVMP - PIII	70054,30	A0A1L8D5Y7	0,07%	0,06%	0,04%	0,77	0,01025	0,76	0,11676	0,59	0,05763
SVMP - PIII	51806,57	E3UJL0	0,19%	0,29%	0,25%	1,52	0,07080	0,85	0,02370	1,29	0,14398
SVMP - PIII	51680,38	E3UJL1	0,13%	0,13%	0,16%	1,01	0,86216	1,22	0,03179	1,24	0,12786
SVMP - PIII	69862,22	A0A1L8D666	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PIII	69687,94	A0A1L8D5Y0	0,40%	0,43%	0,48%	1,08	0,70686	1,12	0,58019	1,21	0,01757
SVSP	28428,05	A0A1L8D5V4	1,41%	1,28%	1,33%	0,91	0,08098	1,04	0,23629	0,95	0,03335
SVSP	28948,42	A0A1L8D664	1,79%	1,76%	1,55%	0,99	0,49374	0,88	0,00616	0,87	0,05511
SVSP	28728,42	A0A1L8D5T9	0,69%	0,54%	0,43%	0,78	0,16734	0,79	0,00591	0,62	0,09960
SVSP	29027,74	A0A1L8D5R9	0,92%	1,10%	1,15%	1,20	0,18882	1,04	0,52828	1,25	0,03235

SVSP	28560,44	A0A1L8D674	1,03%	1,25%	1,34%	1,22	0,13589	1,07	0,34942	1,30	0,00579
SVSP	29337,44	A0A1L8D620	1,22%	1,32%	1,19%	1,08	0,01070	0,90	0,02119	0,98	0,12999
SVSP	29308,40	A0A1L8D5U9	0,91%	0,75%	0,45%	0,82	0,03801	**0,60**	**0,01693**	**0,50**	**0,02428**
SVSP	29421,56	A0A1L8D635	0,55%	0,49%	0,44%	0,90	0,05792	0,90	0,10309	0,81	0,07911
SVSP	28437,96	A0A1L8D658	0,14%	0,22%	0,13%	**1,52**	**0,01108**	**0,61**	**0,00851**	0,93	0,14416
SVSP	29207,00	A0A1L8D5V0	0,22%	0,20%	0,19%	0,91	0,56163	0,92	0,22250	0,83	0,29709
SVSP	28803,54	A0A1L8D5W4	2,16%	2,41%	2,35%	1,12	0,11165	0,97	0,11869	1,09	0,18281
SVSP	29171,08	A0A1L8D5U8	0,72%	0,76%	0,48%	1,05	0,18175	0,63	0,06114	0,66	0,04365
SVSP	29223,30	A0A1L8D5W3	0,12%	0,18%	0,19%	**1,60**	**0,02785**	1,02	0,85588	1,63	0,09106
SVSP	29067,67	A0A1L8D5U3	0,68%	0,93%	0,76%	1,36	0,10285	0,81	0,11437	1,10	0,50359
SVSP	28937,85	A0A1L8D626	0,47%	0,54%	0,46%	1,17	0,02046	0,84	0,02966	0,98	0,10892
SVSP	28953,03	A0A1L8D668	1,01%	1,13%	0,46%	1,12	0,05914	**0,41**	**0,02599**	**0,46**	**0,01839**
SVSP	29064,03	A0A1L8D610	0,45%	0,33%	0,33%	0,73	0,01848	0,99	0,76835	0,72	0,02331
SVSP	28684,37	A0A1L8D5V3	0,45%	0,26%	0,26%	0,57	0,07515	1,02	0,74905	0,58	0,11458
SVSP	28580,27	A0A1L8D5W5	0,17%	0,19%	0,18%	1,12	0,03648	0,93	0,25053	1,03	0,42392
TNF Receptor	24397,61	B9TWJ1	0,18%	0,15%	0,13%	0,83	0,06570	0,88	0,07683	0,72	0,06982
VEGF	16847,05	A0A1L8D651	0,14%	0,15%	0,16%	1,07	0,07714	1,09	0,28320	1,17	0,20338
VNGF	27652,89	A0A1L8D608	1,33%	1,23%	1,08%	0,93	0,19972	0,88	0,04149	0,82	0,05414
VNGF	21705,01	B8QCH4	0,35%	0,19%	0,30%	**0,53**	**0,01957**	1,56	0,05661	0,83	0,04704
Waprin	9138,53	A0A2H4N3F1	0,05%	0,12%	0,10%	**2,17**	**0,01718**	0,90	0,19087	**1,96**	**0,02257**
Waprin	10279,97	A0A2H4N3E0	0,13%	0,10%	0,05%	0,81	0,40907	0,47	0,34497	0,38	0,36513
Total de proteínas	136										

*De acordo com UniProtKB (www.uniprot.org)

**As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste t de Student e valores de $p<0,05$ foram considerados.

Apêndice 3. Proteínas identificadas no veneno inicial (I), final 1 (F1) e final 2 (F2) de *B. moojeni* (Bm 5). A abundância relativa (%) das toxinas foi estimada por meio de quantificação *lable -free* obtida por espectrometria de massas considerando a média da intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína identificada. As proteínas com diferença estatística quanto a sua abundância relativa com fold change ≥ 1,5 or ≤ 0,67; p<0,05) estão en negrito. NI: não identificada. CTL: Lectina do tipo C; CRISP: *Cystein-rich secretory protein*; LAAO: L-aminoácido oxidase; PLA_2: Fosfolipase A_2; PLB: Fosfolipase B; SVMP: Metaloprotease do veneno de serpentes; SVSP: Serinoprotease do veneno de serpentes; VEGF: Fator de crescimento endotelial de venenos; VNGF: Fator de crescimento neural de venenos.

			Abundância relativa (%)			**Inicial x Final 1**		**Final 1 x Final 2**		**Inicial x Final 2**	
Famílias de toxinas	**Massa Molecular (Da)**	**Número de acesso***	**Inicial**	**Final 1**	**Final 2**	***Fold change***	**Valor de p****	***Fold change***	**Valor de p****	***Fold change***	**Valor de p****
5' Nucleotidase	62041,48	A0A1L8D667	0,73%	0,95%	0,94%	1,30	0,09288	0,99	0,83709	1,29	0,01777
C-type lectin	17558,42	A0A1L8D6E3	0,00%	0,01%	0,00%	**Ausente no I**	**0,03928**	**Ausente no F2**	**0,03928**	NI	NI
C-type lectin	17436,27	A0A1L8D657	1,12%	0,68%	0,49%	**0,61**	**0,01687**	**0,72**	**0,01128**	0,44	0,01515
C-type lectin	17427,22	A0A1L8D663	0,07%	0,02%	0,02%	**0,22**	**0,04889**	**1,28**	**0,57564**	0,28	0,01628
C-type lectin	17473,51	A0A1L8D6G5	0,40%	0,01%	0,22%	**0,01**	**0,02146**	**39,05**	**0,01022**	**0,55**	**0,03458**
C-type lectin	17568,39	A0A1L8D640	0,17%	0,06%	0,05%	**0,35**	**0,00038**	0,95	0,01314	**0,33**	**0,00072**
C-type lectin	17481,35	A0A1L8D644	1,27%	1,07%	1,06%	0,85	0,11608	0,99	0,53645	0,84	0,06599
C-type lectin	17555,35	A0A1L8D6B9	1,24%	0,27%	0,35%	**0,22**	**0,00200**	1,29	0,01324	**0,28**	**0,00101**
C-type lectin	17360,52	A0A1L8D6C2	0,41%	0,08%	0,07%	**0,19**	**0,00017**	0,87	0,09306	**0,16**	**0,00281**
C-type lectin	17295,57	A0A1L8D647	1,71%	0,96%	0,91%	0,56	0,07392	0,94	0,64137	0,53	0,00405
C-type lectin	17203,30	A0A1L8D6H4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
C-type lectin	17711,07	A0A1L8D6F1	0,67%	0,40%	0,29%	0,60	0,05852	0,73	0,09094	0,44	0,01486
C-type lectin	18486,46	A0A1L8D6E6	0,99%	0,67%	0,64%	**0,68**	**0,01564**	0,95	0,30435	**0,65**	**0,01708**
C-type lectin	17948,16	A0A1L8D622	0,16%	0,06%	0,07%	0,36	0,01557	**1,13**	**0,20646**	0,41	0,00004
C-type lectin	18006,24	A0A1L8D687	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
C-type lectin	17819,04	A0A1L8D624	0,16%	0,07%	0,08%	**0,41**	**0,05366**	1,23	0,01341	**0,51**	**0,06651**
C-type lectin	17858,12	A0A1L8D632	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
C-type lectin	18140,34	A0A1L8D630	0,29%	0,22%	0,31%	0,77	0,04887	**1,40**	**0,02085**	**1,07**	**0,23123**

C-type lectin	19479,99	A0A1L8D619	0,77%	1,32%	0,96%	1,71	0,36032	0,73	0,48563	1,24	0,00102
C-type lectin	17862,80	A0A1L8D6E0	0,01%	0,00%	0,00%	**0,25**	**0,05834**	**0,71**	**0,77397**	**0,18**	**0,19972**
C-type lectin	18123,26	A0A1L8D609	0,15%	0,05%	0,06%	**0,34**	**0,02345**	1,13	0,33689	**0,38**	**0,00125**
C-type lectin	19342,56	A0A1L8D638	0,06%	0,07%	0,12%	**1,20**	**0,06574**	1,62	0,06196	**1,94**	**0,03496**
C-type lectin	17056,09	A0A2H4N3D3	0,18%	0,16%	0,16%	0,88	0,05944	**1,02**	**0,44185**	**0,89**	**0,13015**
C-type lectin	18726,40	A0A1L8D636	0,69%	0,39%	0,47%	0,57	0,07163	1,19	0,02932	0,68	0,10674
C-type lectin	17829,13	M1V359	1,70%	2,01%	1,74%	**1,18**	**0,11806**	0,87	0,01103	1,03	0,61601
C-type lectin	18112,50	A0A1L8D634	0,04%	0,00%	0,00%	Ausente no F1	0,03427	NI	NI	Ausente no F2	0,03427
C-type lectin	17943,23	A0A1L8D6B3	0,12%	0,11%	0,11%	**0,92**	**0,27752**	0,97	0,75695	0,89	0,23543
C-type lectin	19464,87	A0A1L8D623	0,27%	0,22%	0,26%	0,83	0,47158	1,18	0,67630	0,98	0,90481
C-type lectin	17084,14	A0A1L8D629	0,28%	0,22%	0,34%	0,78	0,05646	1,56	0,06577	**1,22**	**0,07523**
C-type lectin	17469,58	A0A1L8D6G9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cystatin	15799,18	A0A2H4N3F5	0,06%	0,02%	0,02%	**0,43**	**0,05964**	0,80	0,13019	0,35	0,03522
Cystatin	15547,84	A0A2H4N3E9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cysteine-rich (CRISP)	27749,10	A0A2H4N3D5	1,95%	1,56%	1,77%	0,80	0,04442	1,13	0,04183	0,90	0,13416
Cysteine-rich (CRISP)	27683,86	F2Q6F6	0,83%	0,84%	0,76%	**1,01**	**0,91997**	0,90	0,01328	**0,91**	**0,57998**
Dynein axonemal	25542,26	C5H0U1	1,23%	1,25%	1,39%	1,02	0,30355	1,11	0,09312	1,13	0,12380
Endothelin convertin enzyme	21885,06	B8QCC5	0,06%	0,05%	0,06%	**0,74**	**0,19702**	1,33	0,13310	**0,98**	**0,91267**
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	40700,55	M9NCD2	0,28%	0,25%	0,23%	0,90	0,23878	0,89	0,34810	0,81	0,06554
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	41370,39	M9NCR9	0,46%	1,87%	1,86%	4,08	0,02964	1,00	0,93036	4,07	0,00493
Hyaluronidase	53177,03	A0A2H4N3E2	2,46%	2,50%	1,96%	1,02	0,24417	0,78	0,02323	0,80	0,04731
Hyaluronidase	53229,06	A0A2H4Z8F4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
LAAO	57239,59	A0A2H4N3D4	0,69%	0,93%	1,26%	**1,35**	**0,06971**	1,35	0,02133	**1,83**	**0,04191**
LAAO	57096,45	A0A0S1LJ33	1,12%	1,42%	1,36%	**1,27**	**0,06610**	0,96	0,33046	**1,21**	**0,17010**
LAAO	57060,40	A0A1L8D615	0,41%	0,46%	0,54%	1,13	0,24160	1,18	0,04895	1,32	0,12683
Phosphodiesterase	93284,97	A0A1L8D6B7	1,51%	1,05%	1,04%	0,70	0,02774	1,00	0,87779	0,69	0,00649

PLA_2 - D49 - ácida	16263,02	A0A1L8D5Z4	1,10%	1,55%	1,41%	1,41	0,02915	0,91	0,11459	1,29	0,00736
PLA_2 - D49 - ácida	16203,81	I2DAL5	0,69%	0,78%	0,85%	1,14	0,08563	1,10	0,20348	1,25	0,13899
PLA_2 - D49 - ácida	16232,89	I2DAL4	0,05%	0,06%	0,11%	1,26	0,11556	1,83	0,01204	2,30	0,01328
PLA_2 - D49 - ácida	16287,08	A0A1L8D6C4	0,43%	0,66%	0,73%	1,55	0,00486	1,10	0,08087	**1,71**	**0,02230**
PLA_2 - D49 - ácida	16123,80	M1TFP9	0,14%	0,16%	0,14%	1,15	0,22673	0,92	0,23505	1,05	0,21191
PLA_2 - D49 - ácida	16820,72	A8E2V5	0,10%	0,09%	0,06%	**0,98**	**0,60669**	0,68	0,16184	**0,67**	**0,09390**
PLA_2 - D49 - ácida	16313,25	A0A1L8D602	0,16%	0,22%	0,19%	1,39	0,11683	0,88	0,02917	1,23	0,17569
PLA_2 - D49 - ácida	14824,18	A0A2D1UXN7	0,32%	0,35%	0,46%	1,12	0,40031	1,28	0,03809	1,44	0,09695
PLA_2 - D49 - ácida	16768,66	A8E2V6	0,09%	0,10%	0,07%	1,09	0,77233	0,70	0,40365	0,77	0,04131
PLA_2 - K49	16416,71	A0A1S5XW05	1,78%	2,22%	2,05%	1,25	0,00273	0,92	0,03586	1,15	0,02702
PLA_2 - K49	16497,76	A0A2H4N391	2,26%	3,03%	2,72%	1,34	0,07199	0,90	0,13226	1,20	0,20765
PLA_2 - K49	14648,45	I6L8L6	1,61%	1,83%	1,60%	1,14	0,03033	0,87	0,01595	0,99	0,33666
PLA_2 - K49	16471,67	A0A1L8D605	0,07%	0,03%	0,03%	**0,48**	**0,02846**	**1,01**	**0,76898**	**0,48**	**0,05036**
PLA_2 - K49	16413,77	A0A1L8D5Z7	3,20%	5,16%	4,45%	1,61	0,12689	0,86	0,17544	1,39	0,09879
PLA_2 - K49	16636,11	I2DAL6	1,47%	1,85%	1,58%	1,26	0,06342	0,85	0,13529	**1,07**	**0,11733**
PLA_2 - K49	16364,70	L7VGC1	0,55%	0,50%	0,69%	0,91	0,04250	1,38	0,07017	1,26	0,10840
PLA_2 - K49	14303,08	A8E2V7	1,47%	1,39%	1,61%	**0,95**	**0,27650**	1,16	0,05384	1,10	0,07599
PLA_2 Inhibitor	18713,14	A0A2H4N3E1	0,08%	0,27%	0,34%	3,32	0,14640	1,27	0,00485	4,22	0,10772
PLA_2 Inhibitor	37998,37	A0A2H4N3D8	0,21%	0,22%	0,25%	1,06	0,17705	1,13	0,00727	1,20	0,04855
PLB	64274,29	A0A2H4N395	1,30%	1,34%	1,26%	1,03	0,22443	0,94	0,34661	0,97	0,43802
SVMP - PI	25011,11	A0A2H4N390	1,96%	2,19%	2,32%	1,11	0,16453	1,06	0,33658	1,18	0,03447
SVMP - PI	46658,39	A0A1L8D5Y9	0,00%	0,00%	1,39%	NI	NI	**Ausente no F1**	**0,00318**	Ausente no I	0,00318
SVMP - PI	46811,75	A0A1L8D6A8	1,73%	1,53%	0,78%	**0,89**	**0,04461**	**0,51**	**0,00864**	**0,45**	**0,00234**
SVMP - PI	46668,55	A0A1L8D683	0,02%	0,03%	0,01%	1,26	0,02670	0,44	0,09754	**0,56**	**0,13777**
SVMP - PI	43610,02	A0A1L8D5Z8	0,34%	0,58%	0,91%	1,69	0,01498	1,57	0,11860	2,65	0,06323
SVMP - PI	46996,66	A0A1L8D5Y8	0,53%	0,28%	0,31%	0,52	0,00073	1,11	0,25367	0,58	0,03568
SVMP - PI	27582,97	E3UJL4	0,29%	0,38%	0,31%	1,28	0,02713	0,82	0,07848	1,05	0,44939

SVMP - PI	27623,07	E3UJL3	0,38%	0,39%	0,47%	**1,04**	**0,14556**	1,20	0,07740	**1,25**	**0,04531**
SVMP - PI	47312,40	Q1ZZ79	0,89%	0,68%	0,84%	0,76	0,09202	1,24	0,15703	0,94	0,11538
SVMP - PII	54822,06	A0A1L8D600	1,13%	1,83%	0,85%	1,62	0,08298	0,46	0,03630	0,75	0,07878
SVMP - PII	54387,81	A0A1L8D6A9	0,22%	0,11%	0,13%	0,49	0,03193	**1,21**	**0,14297**	0,59	0,00297
SVMP - PII	35980,95	E3UJM0	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PII	37862,46	Q7T1T5	2,96%	2,96%	2,60%	1,00	0,99194	0,88	0,12471	0,88	0,09668
SVMP - PII	54595,92	A0A1L8D5Z6	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PII	37509,63	E3UJL5	1,22%	0,79%	0,85%	0,64	0,01398	1,07	0,17410	0,69	0,04383
SVMP - PII	34727,18	E3UJL9	0,43%	0,28%	0,45%	**0,64**	**0,11963**	1,63	0,16009	1,04	0,43394
SVMP - PII	56628,59	A0A1L8D5Z3	1,47%	1,09%	1,21%	**0,75**	**0,17092**	1,10	0,51940	0,82	0,04338
SVMP - PII	54667,63	A0A1L8D5Z0	0,48%	0,55%	0,57%	1,15	0,01549	1,04	0,56780	1,20	0,17916
SVMP - PII	54991,95	A0A1L8D649	0,10%	0,18%	0,19%	1,71	0,01158	1,10	0,06779	1,88	0,02236
SVMP - PII	37768,58	E3UJL7	1,45%	1,34%	1,22%	**0,92**	**0,43618**	**0,91**	**0,05057**	0,84	0,26560
SVMP - PII	35237,65	E3UJL8	0,34%	0,32%	0,23%	0,93	0,33154	0,74	0,19610	0,68	0,07587
SVMP - PII	56077,46	A0A1L8D675	0,70%	0,83%	0,92%	1,19	0,02890	1,10	0,30363	1,32	0,14340
SVMP - PIII	70514,41	A0A0K2JNB8	0,33%	0,07%	1,10%	0,20	0,39851	16,37	0,00158	**3,28**	**0,16072**
SVMP - PIII	70271,33	A0A1L8D5X9	2,23%	2,34%	2,23%	1,05	0,19605	0,95	0,30158	1,00	0,83288
SVMP - PIII	27970,99	Q7T1T3	0,62%	0,45%	0,83%	0,73	0,05570	1,84	0,03102	1,35	0,01226
SVMP - PIII	69891,42	A0A1L8D641	0,56%	0,34%	0,26%	0,61	0,07532	**0,78**	**0,01292**	0,47	0,05264
SVMP - PIII	8371,70	C3UWN4	0,04%	0,03%	0,02%	0,62	0,09001	0,63	0,02179	**0,39**	**0,04913**
SVMP - PIII	70541,54	A0A1S6K7T1	1,26%	1,55%	0,94%	1,23	0,69518	0,61	0,39562	0,75	0,23431
SVMP - PIII	51303,84	E3UJL2	2,22%	1,69%	1,85%	0,76	0,10497	1,10	0,29217	0,83	0,01084
SVMP - PIII	70083,79	A0A1L8D5X6	1,71%	1,68%	1,98%	0,98	0,45434	1,18	0,09464	1,16	0,05171
SVMP - PIII	70899,14	A0A1L8D5V7	1,08%	0,52%	0,53%	0,48	0,11677	1,02	0,34458	0,49	0,12394
SVMP - PIII	70668,97	A0A1L8D5V8	0,65%	0,98%	1,08%	**1,51**	**0,03054**	1,10	0,03976	1,66	0,01469
SVMP - PIII	70133,74	A0A1L8D5X7	0,60%	0,49%	0,67%	0,82	0,19398	1,37	0,39698	1,12	0,59532
SVMP - PIII	70175,46	A0A1L8D5Z1	0,48%	0,50%	0,52%	**1,05**	**0,20259**	1,04	0,28489	**1,08**	**0,02920**

SVMP - PIII	69564,32	A0A1L8D5Y2	0,21%	0,19%	0,20%	0,88	0,23012	1,07	0,34637	0,94	0,08568
SVMP - PIII	70198,30	A0A1L8D691	1,64%	1,59%	1,42%	0,97	0,26176	0,89	0,03725	0,87	0,08863
SVMP - PIII	69882,26	A0A1L8D5X8	0,55%	0,39%	0,51%	0,71	0,00830	**1,33**	**0,01080**	0,94	0,08473
SVMP - PIII	71139,30	A0A1L8D5X1	0,31%	0,38%	0,40%	1,24	0,12556	1,05	0,42190	1,30	0,00448
SVMP - PIII	70839,89	A0A1L8D656	0,48%	0,52%	0,56%	1,09	0,28865	1,07	0,35405	1,16	0,02305
SVMP - PIII	69765,31	A0A1L8D689	0,73%	0,51%	0,54%	0,70	0,06580	1,06	0,35921	0,74	0,14153
SVMP - PIII	70656,69	A0A1L8D646	1,31%	1,22%	1,26%	0,93	0,34208	1,03	0,60424	0,96	0,05782
SVMP - PIII	69670,31	A0A1L8D5X3	2,11%	2,27%	2,21%	**1,07**	**0,44170**	0,97	0,56286	1,05	0,34689
SVMP - PIII	70734,91	A0A1L8D5W6	1,05%	1,16%	1,16%	1,10	0,05552	1,00	0,97441	1,10	0,18068
SVMP - PIII	70982,90	A0A1L8D677	0,12%	0,25%	0,21%	2,12	0,05387	0,84	0,15276	**1,78**	**0,00927**
SVMP - PIII	71010,12	A0A1L8D633	0,12%	0,18%	0,19%	**1,53**	**0,05844**	1,08	0,02717	1,65	0,04271
SVMP - PIII	9553,68	C3UWN2	0,05%	0,08%	0,06%	1,64	0,00070	0,85	0,40009	1,40	0,26745
SVMP - PIII	70572,85	A0A1L8D5X2	0,86%	0,97%	1,17%	1,13	0,04900	1,21	0,16710	1,36	0,09224
SVMP - PIII	70412,70	A0A1L8D682	0,20%	0,23%	0,24%	1,15	0,10739	1,06	0,37559	1,22	0,05637
SVMP - PIII	9538,66	C3UWN3	0,04%	0,05%	0,05%	1,09	0,21660	**1,14**	**0,29453**	**1,24**	**0,11385**
SVMP - PIII	70013,13	A0A1L8D6A0	0,45%	0,48%	0,58%	1,05	0,29610	1,22	0,08236	1,29	0,00761
SVMP - PIII	70266,39	A0A1L8D5Y6	0,66%	0,55%	0,54%	**0,84**	**0,03565**	0,97	0,44971	**0,81**	**0,10303**
SVMP - PIII	70054,30	A0A1L8D5Y7	0,15%	0,15%	0,22%	1,05	0,68802	1,45	0,07232	**1,51**	**0,04071**
SVMP - PIII	51806,57	E3UJL0	0,30%	0,19%	0,16%	0,62	0,04825	0,85	0,02287	**0,53**	**0,03421**
SVMP - PIII	51680,38	E3UJL1	0,42%	0,32%	0,28%	**0,76**	**0,08986**	**0,88**	**0,03362**	**0,67**	**0,05631**
SVMP - PIII	69862,22	A0A1L8D666	0,21%	0,41%	0,55%	1,91	0,15054	1,34	0,33224	2,55	0,06336
SVMP - PIII	69687,94	A0A1L8D5Y0	0,60%	0,51%	0,41%	**0,84**	**0,09489**	0,82	0,51215	**0,69**	**0,25695**
SVSP	28428,05	A0A1L8D5V4	1,80%	1,87%	1,86%	1,04	0,40420	1,00	0,71537	1,04	0,32658
SVSP	28948,42	A0A1L8D664	1,27%	1,39%	1,31%	1,09	0,08627	0,94	0,37827	1,03	0,46820
SVSP	28728,42	A0A1L8D5T9	2,87%	2,35%	2,16%	0,82	0,13966	0,92	0,21834	0,75	0,04714
SVSP	29027,74	A0A1L8D5R9	1,17%	1,04%	0,96%	0,88	0,04128	0,92	0,34752	0,82	0,16465
SVSP	28560,44	A0A1L8D674	0,77%	0,67%	0,76%	0,87	0,03700	1,12	0,25215	0,98	0,65185

SVSP	29337,44	A0A1L8D620	0,64%	0,53%	0,58%	0,83	0,19456	1,09	0,26306	0,90	0,13919
SVSP	29308,40	A0A1L8D5U9	0,71%	0,82%	0,86%	1,16	0,11866	**1,05**	**0,22598**	1,22	0,02485
SVSP	29421,56	A0A1L8D635	0,57%	0,73%	0,56%	1,28	0,07458	0,77	0,05438	0,98	0,28392
SVSP	28437,96	A0A1L8D658	0,20%	0,27%	0,40%	**1,39**	**0,08472**	1,48	0,11633	**2,05**	**0,04261**
SVSP	29207,00	A0A1L8D5V0	0,39%	0,44%	0,34%	1,12	0,09673	**0,78**	**0,05588**	0,88	0,01435
SVSP	28803,54	A0A1L8D5W4	0,11%	0,15%	0,16%	1,43	0,06934	1,07	0,09661	1,53	0,07451
SVSP	29171,08	A0A1L8D5U8	0,38%	0,64%	0,61%	1,71	0,07176	0,95	0,49373	1,63	0,00173
SVSP	29223,30	A0A1L8D5W3	0,44%	0,34%	0,39%	0,77	0,18120	1,16	0,05061	0,89	0,31563
SVSP	29067,67	A0A1L8D5U3	1,25%	0,72%	0,72%	0,58	0,01734	1,01	0,51638	0,58	0,02293
SVSP	28937,85	A0A1L8D626	0,62%	0,60%	0,55%	0,96	0,11406	0,93	0,28553	0,89	0,14653
SVSP	28953,03	A0A1L8D668	0,39%	0,37%	0,45%	0,96	0,75689	1,21	0,13901	1,17	0,15752
SVSP	29064,03	A0A1L8D610	0,42%	0,37%	0,34%	0,89	0,68691	0,90	0,38182	0,81	0,40744
SVSP	28684,37	A0A1L8D5V3	0,79%	0,94%	0,78%	**1,19**	**0,11040**	0,83	0,27666	**0,99**	**0,85238**
SVSP	28580,27	A0A1L8D5W5	0,13%	0,09%	0,14%	0,68	0,03717	**1,60**	**0,21702**	1,09	0,59243
TNF Receptor	24397,61	B9TWJ1	0,04%	0,02%	0,02%	0,61	0,36293	0,94	0,87163	0,57	0,09735
VEGF	16847,05	A0A1L8D651	0,69%	0,24%	0,24%	0,35	0,02004	0,97	0,37102	0,34	0,02609
VNGF	27652,89	A0A1L8D608	1,41%	1,63%	1,59%	1,16	0,03450	0,98	0,05740	1,13	0,02957
VNGF	21705,01	B8QCH4	0,17%	0,09%	0,08%	0,56	0,01233	0,89	0,08691	0,49	0,02132
Waprin	9138,53	A0A2H4N3F1	0,00%	0,01%	0,01%	Ausente no I	0,50000	1,21	0,40282	Ausente no I	0,00792
Waprin	10279,97	A0A2H4N3E0	0,03%	0,05%	0,05%	1,63	0,00411	0,88	0,60857	1,43	0,36934
Total de proteínas	**137**										

*De acordo com UniProtKB (www.uniprot.org)

**As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste t de Student e valores de $p<0,05$ foram considerados.

Apêndice 4. Proteínas identificadas no veneno inicial (I), final 1 (F1) e final 2 (F2) de *B. moojeni* (Bm 7). A abundância relativa (%) das toxinas foi estimada por meio de quantificação *lable -free* obtida por espectrometria de massas considerando a média da intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína identificada. As proteínas com diferença estatística quanto a sua abundância relativa com fold change ≥ 1,5 or ≤ 0,67; p<0,05) estão en negrito. NI: não identificada. CTL: Lectina do tipo C; CRISP: *Cystein-rich secretory protein*; LAAO: L-aminoácido oxidase; PLA_2: Fosfolipase A_2; PLB: Fosfolipase B; SVMP: Metaloprotease do veneno de serpentes; SVSP: Serinoprotease do veneno de serpentes; VEGF: Fator de crescimento endotelial de venenos; VNGF: Fator de crescimento neural de venenos.

			Abundância relativa (%)			**Inicial x Final 1**		**Final 1 x Final 2**		**Inicial x Final 2**	
Famílias de toxinas	**Massa molecular (Da)**	**Número de acesso***	**Inicial**	**Final 1**	**Final 2**	**Fold change**	**Valor de p****	**Fold change**	**Valor de p****	**Fold change**	**Valor de p****
5' Nucleotidase	62041,48	A0A1L8D667	1,22%	1,43%	1,44%	1,18	0,21517	1,00	0,81088	1,18	0,17002
CTL	17558,42	A0A1L8D6E3	0,07%	0,70%	1,08%	9,69	0,12174	1,55	0,19933	**14,98**	**0,00028**
CTL	17436,27	A0A1L8D657	1,17%	0,97%	1,05%	0,83	0,49377	1,08	0,77457	0,90	0,02684
CTL	17427,22	A0A1L8D663	0,53%	0,24%	0,00%	0,46	0,08074	0,00	0,10201	**0,00**	**0,00379**
CTL	17473,51	A0A1L8D6G5	0,06%	0,00%	0,00%	**Ausente no F1**	**0,00652**	NI	NI	**Ausente no F2**	**0,00652**
CTL	17568,39	A0A1L8D640	0,38%	0,39%	0,30%	1,01	0,95417	0,78	0,48281	0,79	0,07652
CTL	17481,35	A0A1L8D644	1,10%	1,08%	1,42%	0,98	0,95538	1,31	0,36577	1,29	0,05935
CTL	17555,35	A0A1L8D6B9	0,43%	0,25%	0,34%	0,58	0,10053	1,37	0,20804	0,79	0,01504
CTL	17360,52	A0A1L8D6C2	0,94%	0,92%	1,48%	0,98	0,95894	1,60	0,20648	**1,57**	**0,04022**
CTL	17295,57	A0A1L8D647	0,77%	0,85%	0,64%	1,10	0,74074	0,76	0,43413	0,84	0,13110
CTL	17203,30	A0A1L8D6H4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17711,07	A0A1L8D6F1	0,04%	0,05%	0,06%	1,04	0,87234	1,22	0,54584	1,27	0,06011
CTL	18486,46	A0A1L8D6E6	0,16%	0,37%	0,39%	2,28	0,13175	1,07	0,69971	**2,43**	**0,00410**
CTL	17948,16	A0A1L8D622	0,56%	0,48%	0,34%	0,86	0,64463	0,70	0,51855	0,61	0,05182
CTL	18006,24	A0A1L8D687	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17819,04	A0A1L8D624	0,10%	0,08%	0,12%	0,85	0,74300	1,46	0,47693	1,24	0,05714
CTL	17858,12	A0A1L8D632	0,26%	0,49%	0,30%	1,89	0,30282	0,61	0,36632	1,16	0,05273
CTL	18140,34	A0A1L8D630	0,29%	0,16%	0,19%	0,54	0,10622	1,23	0,34535	**0,66**	**0,01101**
CTL	19479,99	A0A1L8D619	2,42%	1,39%	1,57%	0,57	0,11747	1,13	0,59378	**0,65**	**0,02741**

CTL	17862,80	A0A1L8D6E0	0,02%	0,02%	0,02%	1,08	0,51182	1,14	0,49448	1,24	0,14989
CTL	18123,26	A0A1L8D609	0,16%	0,15%	0,15%	0,94	0,21616	1,00	0,89524	0,93	0,02307
CTL	19342,56	A0A1L8D638	0,15%	0,14%	0,19%	0,94	0,93370	1,38	0,58178	1,29	0,12313
CTL	17056,09	A0A2H4N3D3	0,07%	0,06%	0,06%	0,91	0,60904	1,03	0,85665	0,93	0,28304
CTL	18726,40	A0A1L8D636	0,54%	0,66%	0,69%	1,23	0,00221	1,04	0,17275	1,28	0,03351
CTL	17829,13	M1V359	0,17%	0,14%	0,13%	0,82	0,18155	0,93	0,64753	0,76	0,08122
CTL	18112,50	A0A1L8D634	0,00%	0,04%	0,00%	Ausente no I	0,27688	0,00	0,27688	NI	NI
CTL	17943,23	A0A1L8D6B3	0,48%	0,25%	0,42%	0,52	0,35149	1,65	0,29804	0,86	0,46158
CTL	19464,87	A0A1L8D623	2,75%	3,04%	3,22%	1,10	0,37009	1,06	0,55031	1,17	0,01379
CTL	17084,14	A0A1L8D629	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17469,58	A0A1L8D6G9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cistatina	15799,18	A0A2H4N3F5	0,03%	0,00%	0,00%	Ausente no F1	0,08838	NI	NI	Ausente no F2	0,08838
Cistatina	15547,84	A0A2H4N3E9	0,00%	0,02%	0,00%	Ausente no I	0,50000	Ausente no F2	0,50000	NI	NI
CRISP	27749,10	A0A2H4N3D5	1,82%	2,30%	2,53%	1,26	0,19467	1,10	0,36803	1,39	0,00314
CRISP	27683,86	F2Q6F6	1,49%	1,36%	1,04%	0,92	0,65858	0,76	0,34640	0,70	0,04199
Dynein axonemal	25542,26	C5H0U1	0,52%	0,60%	0,60%	1,16	0,24418	1,00	0,90641	1,16	0,07446
Endothelin convertin enzyme	21885,06	B8QCC5	0,26%	0,24%	0,28%	0,91	0,83883	1,16	0,67421	1,06	0,48715
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	40700,55	M9NCD2	0,42%	0,43%	0,48%	1,03	0,82362	1,13	0,43318	1,16	0,01438
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	41370,39	M9NCR9	0,65%	0,88%	0,60%	1,34	0,36252	0,68	0,30873	0,91	0,06923
Hialuronidase	53177,03	A0A2H4N3E2	3,06%	2,35%	2,68%	0,77	0,00048	1,14	0,07711	0,88	0,06872
Hialuronidase	53229,06	A0A2H4Z8F4	0,00%	0,27%	0,00%	**Ausente o I**	**0,01092**	**Ausente o F2**	**0,01092**	NI	NI
LAAO	57239,59	A0A2H4N3D4	2,00%	2,06%	2,28%	1,03	0,70813	1,11	0,36112	1,14	0,03203
LAAO	57096,45	A0A0S1LJ33	0,41%	0,43%	0,53%	1,04	0,64918	1,24	0,18254	1,29	0,01585
LAAO	57060,40	A0A1L8D615	1,39%	1,44%	1,02%	1,04	0,93427	0,70	0,48994	0,73	0,02429
Fosfodiesterase	93284,97	A0A1L8D6B7	1,37%	1,50%	1,57%	1,09	0,70071	1,05	0,81573	1,15	0,13874
PLA$_2$-D49 ácida	16263,02	A0A1L8D5Z4	0,93%	1,00%	0,99%	1,07	0,31221	0,99	0,82690	1,06	0,10596
PLA$_2$-D49 ácida	16203,81	I2DAL5	0,74%	0,86%	0,86%	1,16	0,02066	1,00	0,92479	1,16	0,07388
PLA$_2$-D49 ácida	16232,89	I2DAL4	0,04%	0,00%	0,00%	**Ausente no F1**	**0,00939**	NI	NI	**Ausente no F2**	**0,00939**
PLA$_2$-D49 ácida	16287,08	A0A1L8D6C4	0,66%	0,46%	0,45%	0,70	0,00149	0,98	0,17263	0,69	0,01092
PLA$_2$-D49 ácida	16123,80	M1TFP9	0,08%	0,06%	0,08%	0,75	0,10971	1,42	0,05506	1,07	0,12982
PLA$_2$-D49 ácida	16820,72	A8E2V5	0,16%	0,20%	0,23%	1,27	0,34690	1,15	0,51793	1,46	0,04900
PLA$_2$-D49 ácida	16313,25	A0A1L8D602	0,38%	0,61%	0,19%	1,59	0,66246	0,30	0,45830	**0,48**	**0,01636**
PLA$_2$-D49 ácida	14824,18	A0A2D1UXN7	0,38%	0,34%	0,40%	0,89	0,77283	1,17	0,69113	1,04	0,04072

PLA_2-D49 ácida	16768,66	A8E2V6	0,06%	0,08%	0,04%	1,35	0,15598	0,49	0,05718	**0,66**	**0,04858**
PLA_2-K49	16416,71	A0A1S5XW05	2,55%	1,68%	1,71%	**0,66**	**0,02252**	1,02	0,51560	0,67	0,00149
PLA_2-K49	16497,76	A0A2H4N391	2,04%	2,09%	2,05%	1,03	0,54742	0,98	0,19524	1,01	0,86987
PLA_2-K49	14648,45	I6L8L6	1,45%	1,32%	1,13%	0,91	0,59110	0,85	0,41661	0,78	0,06651
PLA_2-K49	16471,67	A0A1L8D605	0,04%	0,04%	0,04%	1,00	0,97292	1,12	0,23492	1,12	0,01766
PLA_2-K49	16413,77	A0A1L8D5Z7	4,18%	4,04%	4,57%	0,97	0,81319	1,13	0,36682	1,09	0,13891
PLA_2-K49	16636,11	I2DAL6	1,62%	1,77%	1,76%	1,09	0,35025	1,00	0,94384	1,09	0,09599
PLA_2-K49	16364,70	L7VGC1	0,65%	0,71%	0,71%	1,10	0,78454	0,99	0,93278	1,09	0,64157
PLA_2-K49	14303,08	A8E2V7	1,22%	1,60%	2,01%	1,31	0,44068	1,25	0,03347	1,64	0,22687
Inibidor de PLA_2	18713,14	A0A2H4N3E1	0,28%	0,33%	0,28%	1,20	0,32753	0,85	0,43197	1,02	0,73266
Inibidor de PLA2	37998,37	A0A2H4N3D8	0,07%	0,14%	0,17%	1,99	0,27509	1,25	0,46737	**2,50**	**0,00703**
PLB	64274,29	A0A2H4N395	1,38%	1,37%	1,15%	1,00	0,97338	0,84	0,54509	0,84	0,15323
SVMP - PI	25011,11	A0A2H4N390	0,68%	0,71%	0,66%	1,04	0,83506	0,94	0,81257	0,97	0,78081
SVMP - PI	46658,39	A0A1L8D5Y9	0,10%	0,10%	0,11%	0,98	0,96757	1,09	0,76108	1,08	0,18660
SVMP - PI	46811,75	A0A1L8D6A8	0,41%	0,26%	0,37%	0,65	0,19149	1,39	0,19352	0,90	0,18632
SVMP - PI	46668,55	A0A1L8D683	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PI	43610,02	A0A1L8D5Z8	1,80%	1,43%	1,61%	0,79	0,41172	1,12	0,62497	0,89	0,07547
SVMP - PI	46996,66	A0A1L8D5Y8	0,55%	0,71%	0,57%	1,27	0,35244	0,81	0,39371	1,03	0,14804
SVMP - PI	27582,97	E3UJL4	1,08%	0,89%	1,10%	0,83	0,14992	1,23	0,27443	1,01	0,80370
SVMP - PI	27623,07	E3UJL3	0,33%	0,32%	0,13%	0,95	0,40104	**0,41**	**0,00523**	**0,39**	**0,03263**
SVMP - PI	47312,40	Q1ZZ79	1,03%	1,12%	1,31%	1,08	0,71281	1,17	0,49528	1,27	0,00006
SVMP - PII	54822,06	A0A1L8D600	2,66%	2,07%	1,32%	0,78	0,12317	0,64	0,08151	**0,50**	**0,00920**
SVMP - PII	54387,81	A0A1L8D6A9	0,81%	0,17%	0,34%	**0,21**	**0,01541**	**2,00**	**0,01375**	**0,43**	**0,01603**
SVMP - PII	35980,95	E3UJM0	0,08%	0,00%	0,51%	**Ausente no F1**	**0,01247**	Ausente no F1	-	**6,47**	**0,00228**
SVMP - PII	37862,46	Q7T1T5	1,60%	1,61%	1,62%	1,01	0,78233	1,00	0,01121	1,01	0,64606
SVMP - PII	54595,92	A0A1L8D5Z6	0,00%	0,00%	0,26%	NI	NI	Ausente no F1	-	Ausente no F1	-
SVMP - PII	37509,63	E3UJL5	1,35%	1,67%	1,54%	1,24	0,11252	0,92	0,23355	1,14	0,01774
SVMP - PII	34727,18	E3UJL9	0,28%	0,22%	0,29%	0,77	0,29396	1,35	0,23522	1,04	0,14679
SVMP - PII	56628,59	A0A1L8D5Z3	0,46%	0,39%	0,37%	0,86	0,06480	0,94	0,19683	0,80	0,00337
SVMP - PII	54667,63	A0A1L8D5Z0	1,13%	0,99%	0,43%	0,87	0,80731	0,44	0,49220	**0,38**	**0,00863**
SVMP - PII	54991,95	A0A1L8D649	0,09%	0,06%	0,09%	0,69	0,31733	1,35	0,08796	0,93	0,69411
SVMP - PII	37768,58	E3UJL7	0,48%	0,49%	0,46%	1,02	0,86592	0,93	0,50424	0,95	0,12472

SVMP - PII	35237,65	E3UJL8	0,40%	0,43%	0,41%	1,06	0,59576	0,95	0,61947	1,01	0,43606
SVMP - PII	56077,46	A0A1L8D675	1,01%	1,00%	1,14%	0,99	0,93037	1,13	0,24053	1,12	0,25081
SVMP - PIII	70514,41	A0A0K2JNB8	0,08%	0,10%	0,12%	1,31	0,12850	1,14	0,35172	1,50	0,05849
SVMP - PIII	70271,33	A0A1L8D5X9	1,95%	2,08%	2,02%	1,07	0,49088	0,97	0,63238	1,04	0,30166
SVMP - PIII	27970,99	Q7T1T3	0,33%	0,75%	0,96%	**2,26**	**0,04351**	1,28	0,09618	**2,89**	**0,00277**
SVMP - PIII	69891,42	A0A1L8D641	0,45%	0,53%	0,26%	1,18	0,04073	**0,50**	**0,03056**	**0,59**	**0,02613**
SVMP - PIII	8371,70	C3UWN4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
SVMP - PIII	70541,54	A0A1S6K7T1	0,58%	0,60%	0,62%	1,02	0,10660	1,04	0,45014	1,06	0,36361
SVMP - PIII	51303,84	E3UJL2	0,83%	1,44%	1,02%	1,74	0,28908	0,71	0,42670	1,24	0,09567
SVMP - PIII	70083,79	A0A1L8D5X6	0,27%	0,51%	0,54%	1,91	0,07925	1,05	0,45089	**2,00**	**0,02544**
SVMP - PIII	70899,14	A0A1L8D5V7	0,91%	0,83%	0,75%	0,91	0,66324	0,91	0,62885	0,83	0,07633
SVMP - PIII	70668,97	A0A1L8D5V8	0,96%	0,81%	1,07%	0,85	0,45802	1,32	0,24200	1,12	0,11361
SVMP - PIII	70133,74	A0A1L8D5X7	0,28%	0,27%	0,28%	0,94	0,70595	1,06	0,63769	0,99	0,97471
SVMP - PIII	70175,46	A0A1L8D5Z1	0,39%	0,43%	0,48%	1,10	0,34236	1,12	0,13546	1,23	0,09196
SVMP - PIII	69564,32	A0A1L8D5Y2	1,00%	1,02%	1,27%	1,03	0,85104	1,24	0,45806	1,27	0,15063
SVMP - PIII	70198,30	A0A1L8D691	1,05%	0,93%	0,72%	0,89	0,41709	0,77	0,08228	0,68	0,11648
SVMP - PIII	69882,26	A0A1L8D5X8	0,43%	0,45%	0,50%	1,05	0,82857	1,10	0,63394	1,15	0,11886
SVMP - PIII	71139,30	A0A1L8D5X1	0,13%	0,14%	0,12%	1,14	0,11248	0,80	0,11971	0,91	0,13149
SVMP - PIII	70839,89	A0A1L8D656	0,39%	0,48%	0,53%	1,24	0,16180	1,11	0,32264	1,37	0,02607
SVMP - PIII	69765,31	A0A1L8D689	0,46%	0,38%	0,62%	0,82	0,05597	**1,64**	**0,04086**	1,35	0,03328
SVMP - PIII	70656,69	A0A1L8D646	1,33%	1,41%	1,53%	1,06	0,10235	1,08	0,10335	1,15	0,10295
SVMP - PIII	69670,31	A0A1L8D5X3	2,14%	2,71%	2,45%	1,26	0,02077	0,91	0,12350	1,14	0,06399
SVMP - PIII	70734,91	A0A1L8D5W6	0,47%	0,45%	0,54%	0,95	0,54514	1,20	0,38411	1,15	0,32266
SVMP - PIII	70982,90	A0A1L8D677	0,30%	0,14%	0,13%	**0,46**	**0,02329**	0,92	0,53949	**0,42**	**0,02527**
SVMP - PIII	71010,12	A0A1L8D633	0,37%	0,38%	0,31%	1,04	0,68607	0,82	0,12292	0,85	0,14000
SVMP - PIII	9553,68	C3UWN2	0,00%	0,01%	0,01%	Ausente no I	0,13971	1,07	0,82038	Ausente no I	-
SVMP - PIII	70572,85	A0A1L8D5X2	0,03%	0,09%	0,08%	2,81	0,21636	0,83	0,58825	**2,32**	**0,01198**
SVMP - PIII	70412,70	A0A1L8D682	0,30%	0,34%	0,37%	1,16	0,08752	1,07	0,37466	1,24	0,07381
SVMP - PIII	9538,66	C3UWN3	0,03%	0,03%	0,01%	1,12	0,87392	0,45	0,44507	**0,50**	**0,04438**
SVMP - PIII	70013,13	A0A1L8D6A0	0,08%	0,11%	0,06%	1,47	0,12099	0,57	0,10877	0,84	0,07356
SVMP - PIII	70266,39	A0A1L8D5Y6	1,27%	1,41%	1,33%	1,11	0,09493	0,95	0,18560	1,05	0,38215
SVMP - PIII	70054,30	A0A1L8D5Y7	0,17%	0,15%	0,20%	0,93	0,54395	1,29	0,20225	1,20	0,02644
SVMP - PIII	51806,57	E3UJL0	0,93%	0,70%	1,15%	0,75	0,39578	1,64	0,24712	1,24	0,06126
SVMP - PIII	51680,38	E3UJL1	0,00%	0,22%	0,06%	**Ausente no I**	**0,04225**	0,28	0,05835	Ausente no I	-

SVMP - PIII	69862,22	A0A1L8D666	0,21%	0,25%	0,23%	1,21	0,66001	0,91	0,81470	1,11	0,16728
SVMP - PIII	69687,94	A0A1L8D5Y0	0,20%	0,24%	0,28%	1,17	0,70614	1,16	0,64343	1,36	0,05275
SVSP	28428,05	A0A1L8D5V4	1,75%	1,24%	1,23%	0,71	0,11497	0,99	0,90001	0,70	0,02291
SVSP	28948,42	A0A1L8D664	1,45%	0,97%	0,73%	0,67	0,30810	0,75	0,47638	**0,51**	**0,03109**
SVSP	28728,42	A0A1L8D5T9	0,75%	0,47%	0,25%	0,62	0,40131	0,53	0,45948	**0,33**	**0,02634**
SVSP	29027,74	A0A1L8D5R9	1,02%	1,03%	1,03%	1,01	0,94369	1,00	0,99993	1,01	0,50216
SVSP	28560,44	A0A1L8D674	0,62%	1,07%	0,70%	1,72	0,33299	0,66	0,40346	1,13	0,07586
SVSP	29337,44	A0A1L8D620	0,72%	0,75%	0,77%	1,04	0,85793	1,03	0,86848	1,07	0,24866
SVSP	29308,40	A0A1L8D5U9	1,30%	1,15%	0,98%	0,88	0,11096	0,85	0,20062	0,75	0,05738
SVSP	29421,56	A0A1L8D635	0,32%	0,44%	0,47%	1,37	0,09940	1,06	0,41810	1,45	0,01227
SVSP	28437,96	A0A1L8D658	0,06%	0,10%	0,11%	1,66	0,08211	1,09	0,29878	**1,81**	**0,00346**
SVSP	29207,00	A0A1L8D5V0	2,91%	2,79%	2,60%	0,96	0,62065	0,93	0,56938	0,89	0,07328
SVSP	28803,54	A0A1L8D5W4	0,55%	0,68%	0,66%	1,24	0,09880	0,97	0,03216	1,20	0,11186
SVSP	29171,08	A0A1L8D5U8	1,05%	0,95%	0,80%	0,90	0,57848	0,84	0,51523	0,76	0,02563
SVSP	29223,30	A0A1L8D5W3	0,14%	0,15%	0,12%	1,06	0,00739	0,82	0,10486	0,88	0,15242
SVSP	29067,67	A0A1L8D5U3	0,25%	0,44%	0,31%	1,74	0,25982	0,71	0,43486	1,23	0,23470
SVSP	28937,85	A0A1L8D626	0,44%	0,40%	0,38%	0,91	0,57498	0,95	0,69147	0,86	0,13503
SVSP	28953,03	A0A1L8D668	1,48%	1,80%	1,88%	1,22	0,70463	1,04	0,49168	1,27	0,67756
SVSP	29064,03	A0A1L8D610	0,27%	0,49%	0,48%	**1,83**	**0,01767**	0,97	0,10554	**1,78**	**0,02537**
SVSP	28684,37	A0A1L8D5V3	0,16%	0,16%	0,11%	1,04	0,89982	0,69	0,45279	0,72	0,09643
SVSP	28580,27	A0A1L8D5W5	0,48%	0,37%	0,34%	0,77	0,00624	0,91	0,52364	0,70	0,14641
TNF Receptor	24397,61	B9TWJ1	0,22%	0,12%	0,17%	0,55	0,15789	1,33	0,44844	0,74	0,10064
VEGF	16847,05	A0A1L8D651	0,46%	0,47%	0,44%	1,02	0,92608	0,94	0,67161	0,96	0,43290
VNGF	27652,89	A0A1L8D608	1,04%	1,39%	1,36%	1,34	0,06691	0,98	0,72853	1,31	0,06628
VNGF	21705,01	B8QCH4	0,28%	0,25%	0,40%	0,88	0,78943	1,62	0,32930	1,42	0,03956
Waprin	9138,53	A0A2H4N3F1	0,08%	0,09%	0,09%	1,18	0,48468	0,96	0,72326	1,13	0,31038
Waprin	10279,97	A0A2H4N3E0	0,38%	0,27%	0,34%	0,72	0,56845	1,24	0,36527	0,89	0,72301
Total de proteínas	**139**										

*De acordo com UniProtKB (www.uniprot.org)

**As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste t de Student e valores de $p<0,05$ foram considerados.

Apêndice 5. Proteínas identificadas no veneno inicial (I), final 1 (F1) e final 2 (F2) de *B. moojeni* (Bm 8). A abundância relativa (%) das toxinas foi estimada por meio de quantificação *lable -free* obtida por espectrometria de massas considerando a média da intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína identificada. As proteínas com diferença estatística quanto a sua abundância relativa com fold change ≥ 1,5 or ≤ 0,67; p<0,05) estão en negrito. NI: não identificada. CTL: Lectina do tipo C; CRISP: *Cystein-rich secretory protein*; LAAO: L-aminoácido oxidase; PLA_2: Fosfolipase A_2; PLB: Fosfolipase B; SVMP: Metaloprotease do veneno de serpentes; SVSP: Serinoprotease do veneno de serpentes; VEGF: Fator de crescimento endotelial de venenos; VNGF: Fator de crescimento neural de venenos.

			Abundância relativa (%)			**Inicial x Final 1**		**Final 1 x Final 2**		**Inicial x Final 2**	
Famílias de toxinas	**Massa molecular (Da)**	**Número de acesso***	**Inicial**	**Final 1**	**Final 2**	**Fold change**	**Valor de p****	**Fold change**	**Valor de p****	**Fold change**	**Valor de p****
5' Nucleotidase	62041,48	A0A1L8D667	1,12%	1,25%	1,42%	1,12	0,01740	1,13	0,21715	1,27	0,11516
CTL	17558,42	A0A1L8D6E3	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17436,27	A0A1L8D657	0,65%	0,52%	0,40%	0,80	0,15089	0,76	0,52204	0,61	0,36828
CTL	17427,22	A0A1L8D663	0,06%	0,14%	0,00%	**2,52**	**0,02874**	**Ausente no F2**	**0,01461**	**0,00**	**0,00687**
CTL	17473,51	A0A1L8D6G5	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17568,39	A0A1L8D640	0,25%	0,19%	0,15%	0,74	0,07485	0,80	0,19448	**0,59**	**0,02417**
CTL	17481,35	A0A1L8D644	0,53%	0,51%	0,46%	0,96	0,07661	0,91	0,39760	0,87	0,27802
CTL	17555,35	A0A1L8D6B9	0,70%	0,43%	0,51%	**0,62**	**0,02261**	1,19	0,19858	0,74	0,12383
CTL	17360,52	A0A1L8D6C2	0,60%	0,25%	0,12%	**0,42**	**0,00329**	**0,49**	**0,02201**	**0,20**	**0,00835**
CTL	17295,57	A0A1L8D647	1,79%	1,13%	1,11%	**0,63**	**0,00024**	0,99	0,45132	**0,62**	**0,01241**
CTL	17203,30	A0A1L8D6H4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17711,07	A0A1L8D6F1	0,46%	0,51%	0,62%	1,09	0,33509	1,23	0,14246	1,34	0,00252
CTL	18486,46	A0A1L8D6E6	0,76%	0,89%	0,98%	1,18	0,09661	1,10	0,32078	1,30	0,07588
CTL	17948,16	A0A1L8D622	0,54%	0,53%	0,45%	1,00	0,85167	0,85	0,06607	0,85	0,00066
CTL	18006,24	A0A1L8D687	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI

CTL	17819,04	A0A1L8D624	0,05%	0,02%	0,05%	0,45	0,20016	2,23	0,07846	1,01	0,90187
CTL	17858,12	A0A1L8D632	0,00%	0,00%	0,02%	NI	NI	Ausente e F1	0,14446	Ausente no I	0,14446
CTL	18140,34	A0A1L8D630	0,61%	0,63%	0,86%	1,03	0,60764	1,36	0,10479	1,41	0,16241
CTL	19479,99	A0A1L8D619	0,61%	0,69%	0,90%	1,14	0,12341	1,30	0,03368	1,47	0,05998
CTL	17862,80	A0A1L8D6E0	0,48%	0,47%	0,51%	0,98	0,86607	1,08	0,22833	1,06	0,47738
CTL	18123,26	A0A1L8D609	0,01%	0,01%	0,02%	0,85	0,28074	1,51	0,12614	1,27	0,03185
CTL	19342,56	A0A1L8D638	0,06%	0,06%	0,05%	0,89	0,30764	0,96	0,68279	0,86	0,02598
CTL	17056,09	A0A2H4N3D3	0,59%	0,34%	0,42%	**0,58**	**0,04870**	1,22	0,09373	0,71	0,02816
CTL	18726,40	A0A1L8D636	0,25%	0,19%	0,09%	0,76	0,43254	0,49	0,07074	0,38	0,15003
CTL	17829,13	M1V359	0,62%	0,75%	1,31%	1,21	0,01555	1,74	0,05296	**2,11**	**0,04595**
CTL	18112,50	A0A1L8D634	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17943,23	A0A1L8D6B3	0,10%	0,08%	0,25%	0,73	0,50118	3,25	0,41908	2,37	0,40086
CTL	19464,87	A0A1L8D623	0,23%	0,23%	0,17%	0,98	0,85290	0,76	0,18368	0,75	0,00562
CTL	17084,14	A0A1L8D629	0,02%	0,00%	0,00%	**0,00**	**0,00314**	NI	NI	**0,00**	**0,00314**
CTL	17469,58	A0A1L8D6G9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cistatina	15799,18	A0A2H4N3F5	0,01%	0,00%	0,00%	0,00	0,50000	NI	NI	0,00	0,50000
Cistatina	15547,84	A0A2H4N3E9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CRISP	27749,10	A0A2H4N3D5	2,42%	2,35%	2,40%	0,97	0,04832	1,02	0,60287	0,99	0,76883
CRISP	27683,86	F2Q6F6	0,79%	0,77%	0,61%	0,97	0,15236	0,80	0,01687	0,78	0,03640
Dynein axonemal	25542,26	C5H0U1	1,36%	1,17%	1,12%	0,85	0,02684	0,96	0,01556	0,82	0,02473
Endothelin convertin enzyme	21885,06	B8QCC5	0,12%	0,10%	0,35%	0,85	0,17743	**3,49**	**0,01199**	**2,98**	**0,02636**
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	40700,55	M9NCD2	0,29%	0,24%	0,22%	0,83	0,22471	0,94	0,00864	0,78	0,17710
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	41370,39	M9NCR9	0,80%	0,69%	0,42%	0,86	0,06400	**0,61**	**0,01505**	**0,52**	**0,00773**
Hialuronidase	53177,03	A0A2H4N3E2	2,09%	1,34%	1,68%	**0,64**	**0,00192**	1,25	0,51683	0,80	0,44580
Hialuronidase	53229,06	A0A2H4Z8F4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
LAAO	57239,59	A0A2H4N3D4	1,86%	1,81%	3,23%	0,97	0,64528	1,78	0,06636	**1,74**	**0,03374**

LAAO	57096,45	A0A0S1LJ33	1,09%	1,03%	0,00%	0,94	0,38786	**Ausente no F2**	**0,02221**	**Ausente no F2**	**0,00436**
LAAO	57060,40	A0A1L8D615	0,45%	0,35%	0,40%	0,78	0,07425	1,13	0,22528	0,88	0,06377
Fosfodiesterase	93284,97	A0A1L8D6B7	1,98%	1,99%	1,92%	1,00	0,30874	0,97	0,18258	0,97	0,22577
PLA_2-D49 ácida	16263,02	A0A1L8D5Z4	1,02%	1,03%	0,88%	1,01	0,62515	0,86	0,04835	0,87	0,02537
PLA_2-D49 ácida	16203,81	I2DAL5	0,76%	0,77%	0,90%	1,01	0,29533	1,17	0,05032	1,19	0,03073
PLA_2-D49 ácida	16232,89	I2DAL4	0,02%	0,02%	0,05%	1,04	0,71079	**2,81**	**0,03140**	**2,91**	**0,00636**
PLA_2-D49 ácida	16287,08	A0A1L8D6C4	0,56%	0,38%	0,45%	0,69	0,13372	1,17	0,27885	0,80	0,03869
PLA_2-D49 ácida	16123,80	M1TFP9	0,04%	0,07%	0,04%	**1,90**	**0,03623**	**0,66**	**0,00078**	1,24	0,12977
PLA_2-D49 ácida	16820,72	A8E2V5	0,26%	0,28%	0,17%	1,08	0,16241	0,60	0,12020	0,65	0,11081
PLA_2-D49 ácida	16313,25	A0A1L8D602	0,26%	0,19%	0,24%	0,72	0,04173	1,28	0,03659	0,92	0,05472
PLA_2-D49 ácida	14824,18	A0A2D1UXN7	0,54%	0,47%	0,49%	0,87	0,23546	1,05	0,63634	0,91	0,07509
PLA_2-D49 ácida	16768,66	A8E2V6	0,14%	0,14%	0,16%	0,97	0,13739	1,15	0,33307	1,12	0,37043
PLA_2-K49	16416,71	A0A1S5XW05	1,59%	1,68%	1,63%	1,06	0,20191	0,97	0,34963	1,03	0,01231
PLA_2-K49	16497,76	A0A2H4N391	1,71%	1,89%	1,82%	1,11	0,06801	0,96	0,40231	1,06	0,37979
PLA_2-K49	14648,45	I6L8L6	2,15%	2,40%	1,97%	1,12	0,11580	0,82	0,06949	0,92	0,00091
PLA_2-K49	16471,67	A0A1L8D605	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
PLA_2-K49	16413,77	A0A1L8D5Z7	3,45%	3,99%	3,06%	1,16	0,32714	0,77	0,09311	0,89	0,26245
PLA_2-K49	16636,11	I2DAL6	1,76%	2,51%	2,28%	1,43	0,38325	0,91	0,21525	1,30	0,44411
PLA_2-K49	16364,70	L7VGC1	0,23%	0,24%	0,31%	1,05	0,14388	1,28	0,00275	1,35	0,01956
PLA_2-K49	14303,08	A8E2V7	1,32%	1,54%	1,68%	1,17	0,46354	1,09	0,32545	1,27	0,41437
Inibidor de PLA_2	18713,14	A0A2H4N3E1	0,20%	0,14%	0,19%	0,71	0,21459	1,37	0,01069	0,97	0,81133
Inibidor de PLA2	37998,37	A0A2H4N3D8	0,12%	0,14%	0,21%	1,20	0,03080	**1,53**	**0,01585**	**1,83**	**0,01943**
PLB	64274,29	A0A2H4N395	1,39%	1,45%	1,26%	1,05	0,20302	0,87	0,25154	0,91	0,42930
SVMP - PI	25011,11	A0A2H4N390	2,82%	2,60%	3,37%	0,92	0,19011	1,29	0,58304	1,20	0,69684
SVMP - PI	46658,39	A0A1L8D5Y9	1,46%	1,84%	0,00%	1,26	0,03108	**Ausente no F2**	**0,00069**	**Ausente no F2**	**0,00708**
SVMP - PI	46811,75	A0A1L8D6A8	1,65%	1,46%	3,56%	0,88	0,08245	**2,44**	**0,01250**	**2,15**	**0,00542**
SVMP - PI	46668,55	A0A1L8D683	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI

SVMP - PI	43610,02	A0A1L8D5Z8	1,58%	1,34%	0,97%	0,84	0,22852	0,73	0,10093	**0,61**	**0,03625**
SVMP - PI	46996,66	A0A1L8D5Y8	0,57%	0,53%	0,47%	0,93	0,04570	0,89	0,23496	0,82	0,12231
SVMP - PI	27582,97	E3UJL4	0,39%	0,38%	0,55%	0,99	0,57787	1,43	0,04442	1,42	0,06703
SVMP - PI	27623,07	E3UJL3	0,38%	0,31%	0,10%	0,82	0,29640	0,31	0,05022	**0,25**	**0,03761**
SVMP - PI	47312,40	Q1ZZ79	1,03%	1,00%	1,14%	0,97	0,20633	1,14	0,17731	1,11	0,27489
SVMP - PII	54822,06	A0A1L8D600	0,56%	0,54%	1,26%	0,96	0,28692	2,35	0,05253	**2,24**	**0,04353**
SVMP - PII	54387,81	A0A1L8D6A9	0,41%	0,48%	0,33%	1,17	0,09856	0,69	0,02230	0,80	0,12252
SVMP - PII	35980,95	E3UJM0	0,00%	0,00%	0,13%	NI	NI	Ausente no F1	0,06805	Ausente no I	0,06805
SVMP - PII	37862,46	Q7T1T5	3,58%	3,62%	3,88%	1,01	0,65947	1,07	0,29904	1,08	0,14431
SVMP - PII	54595,92	A0A1L8D5Z6	0,12%	0,07%	0,08%	**0,57**	**0,01396**	1,28	0,13410	0,73	0,06060
SVMP - PII	37509,63	E3UJL5	0,70%	0,75%	0,66%	1,08	0,10945	0,88	0,10899	0,95	0,10829
SVMP - PII	34727,18	E3UJL9	0,19%	0,25%	0,21%	1,31	0,07203	0,84	0,27006	1,10	0,55878
SVMP - PII	56628,59	A0A1L8D5Z3	0,78%	0,71%	0,66%	0,91	0,14556	0,93	0,33411	0,84	0,06211
SVMP - PII	54667,63	A0A1L8D5Z0	0,61%	0,61%	0,76%	1,00	0,98997	1,25	0,09063	1,25	0,16040
SVMP - PII	54991,95	A0A1L8D649	0,07%	0,06%	0,05%	0,95	0,42245	0,75	0,49089	0,71	0,37636
SVMP - PII	37768,58	E3UJL7	0,53%	0,33%	0,22%	**0,62**	**0,02059**	0,67	0,08796	**0,42**	**0,01729**
SVMP - PII	35237,65	E3UJL8	0,17%	0,13%	0,16%	0,79	0,06185	1,18	0,10912	0,93	0,35204
SVMP - PII	56077,46	A0A1L8D675	0,61%	0,56%	0,70%	0,92	0,25324	1,25	0,11428	1,15	0,03530
SVMP - PIII	70514,41	A0A0K2JNB8	3,20%	3,40%	3,26%	1,06	0,02548	0,96	0,21771	1,02	0,46314
SVMP - PIII	70271,33	A0A1L8D5X9	2,02%	2,15%	2,02%	1,07	0,17560	0,94	0,06465	1,00	0,99386
SVMP - PIII	27970,99	Q7T1T3	0,23%	0,21%	0,09%	0,93	0,29408	**0,42**	**0,01917**	**0,39**	**0,01735**
SVMP - PIII	69891,42	A0A1L8D641	0,00%	0,08%	0,16%	Ausente no I	0,05509	**1,96**	**0,00540**	**Ausente no I**	**0,03080**
SVMP - PIII	8371,70	C3UWN4	0,04%	0,05%	0,06%	1,11	0,14834	1,18	0,13690	1,31	0,03309
SVMP - PIII	70541,54	A0A1S6K7T1	0,67%	0,79%	0,97%	1,18	0,00131	1,23	0,04909	1,45	0,03021
SVMP - PIII	51303,84	E3UJL2	1,36%	2,26%	2,57%	1,66	0,09967	1,14	0,71100	1,90	0,25232
SVMP - PIII	70083,79	A0A1L8D5X6	0,57%	0,57%	0,41%	1,00	0,89505	0,71	0,09512	0,71	0,06523
SVMP - PIII	70899,14	A0A1L8D5V7	1,23%	1,30%	1,32%	1,05	0,03526	1,02	0,61773	1,07	0,26271

SVMP - PIII	70668,97	A0A1L8D5V8	0,64%	0,57%	0,75%	0,89	0,05332	1,32	0,06641	1,17	0,14134
SVMP - PIII	70133,74	A0A1L8D5X7	0,49%	0,45%	0,36%	0,93	0,10956	0,79	0,05640	0,74	0,01410
SVMP - PIII	70175,46	A0A1L8D5Z1	0,18%	0,19%	0,58%	1,09	0,44885	**2,98**	**0,02037**	**3,25**	**0,00229**
SVMP - PIII	69564,32	A0A1L8D5Y2	0,44%	0,42%	0,44%	0,94	0,02876	1,06	0,04690	1,00	0,81555
SVMP - PIII	70198,30	A0A1L8D691	1,17%	1,10%	1,20%	0,94	0,04632	1,09	0,05263	1,02	0,07269
SVMP - PIII	69882,26	A0A1L8D5X8	0,40%	0,55%	0,46%	1,38	0,26260	0,85	0,08169	1,17	0,54280
SVMP - PIII	71139,30	A0A1L8D5X1	1,30%	1,41%	1,31%	1,09	0,01728	0,93	0,20364	1,01	0,76842
SVMP - PIII	70839,89	A0A1L8D656	0,82%	0,65%	0,69%	0,79	0,05562	1,06	0,17273	0,83	0,11851
SVMP - PIII	69765,31	A0A1L8D689	0,49%	0,76%	0,58%	1,56	0,20769	0,77	0,48362	1,20	0,43425
SVMP - PIII	70656,69	A0A1L8D646	1,38%	1,32%	1,40%	0,96	0,30460	1,06	0,45571	1,01	0,68616
SVMP - PIII	69670,31	A0A1L8D5X3	3,38%	3,58%	3,17%	1,06	0,02464	0,89	0,17184	0,94	0,33479
SVMP - PIII	70734,91	A0A1L8D5W6	1,01%	1,07%	1,22%	1,07	0,23401	1,14	0,09654	1,21	0,01208
SVMP - PIII	70982,90	A0A1L8D677	0,09%	0,07%	0,08%	0,84	0,08554	1,03	0,22094	0,86	0,06048
SVMP - PIII	71010,12	A0A1L8D633	0,05%	0,04%	0,12%	0,86	0,02466	**2,73**	**0,01045**	**2,35**	**0,01399**
SVMP - PIII	9553,68	C3UWN2	0,03%	0,03%	0,00%	0,93	0,13424	**Ausente no F2**	**0,02946**	**Ausente no F2**	**0,03739**
SVMP - PIII	70572,85	A0A1L8D5X2	0,48%	0,46%	0,36%	0,95	0,50551	0,78	0,17090	0,74	0,03107
SVMP - PIII	70412,70	A0A1L8D682	0,29%	0,28%	0,23%	0,98	0,60326	0,79	0,04451	0,78	0,03124
SVMP - PIII	9538,66	C3UWN3	0,05%	0,04%	0,03%	0,68	0,02240	0,85	0,18554	**0,58**	**0,02865**
SVMP - PIII	70013,13	A0A1L8D6A0	0,90%	0,99%	0,64%	1,10	0,07199	**0,65**	**0,00339**	0,71	0,02004
SVMP - PIII	70266,39	A0A1L8D5Y6	0,56%	0,64%	0,60%	1,14	0,16255	0,94	0,30437	1,07	0,01376
SVMP - PIII	70054,30	A0A1L8D5Y7	0,11%	0,10%	0,16%	0,89	0,06147	**1,66**	**0,02785**	1,47	0,01975
SVMP - PIII	51806,57	E3UJL0	0,38%	0,33%	0,34%	0,86	0,36427	1,02	0,83332	0,88	0,05058
SVMP - PIII	51680,38	E3UJL1	0,20%	0,25%	0,11%	1,27	0,27522	0,46	0,11130	**0,58**	**0,00446**
SVMP - PIII	69862,22	A0A1L8D666	0,37%	0,51%	0,42%	1,39	0,23636	0,82	0,06623	1,14	0,46107
SVMP - PIII	69687,94	A0A1L8D5Y0	0,29%	0,13%	0,45%	0,46	0,14477	**3,40**	**0,00414**	1,57	0,14625
SVSP	28428,05	A0A1L8D5V4	1,94%	1,98%	1,80%	1,02	0,07259	0,91	0,21114	0,93	0,24927
SVSP	28948,42	A0A1L8D664	1,54%	1,54%	1,11%	1,00	0,88019	0,72	0,02899	0,72	0,00096

SVSP	28728,42	A0A1L8D5T9	2,03%	2,06%	1,48%	1,01	0,30434	0,72	0,03286	0,73	0,02023
SVSP	29027,74	A0A1L8D5R9	0,92%	0,89%	0,85%	0,97	0,37488	0,95	0,31988	0,92	0,03170
SVSP	28560,44	A0A1L8D674	0,96%	0,79%	0,57%	0,83	0,13160	0,72	0,05437	**0,60**	**0,02605**
SVSP	29337,44	A0A1L8D620	0,41%	0,36%	0,39%	0,86	0,54365	1,10	0,68613	0,95	0,05455
SVSP	29308,40	A0A1L8D5U9	0,86%	0,93%	0,58%	1,08	0,12560	**0,62**	**0,02973**	0,67	0,00471
SVSP	29421,56	A0A1L8D635	0,37%	0,40%	0,27%	1,09	0,12162	0,69	0,04148	0,75	0,01302
SVSP	28437,96	A0A1L8D658	0,81%	0,69%	0,86%	0,85	0,17818	1,24	0,13541	1,06	0,01904
SVSP	29207,00	A0A1L8D5V0	0,34%	0,24%	0,22%	0,70	0,34357	0,93	0,30681	0,65	0,26902
SVSP	28803,54	A0A1L8D5W4	0,35%	0,36%	0,31%	1,05	0,22563	0,84	0,15609	0,88	0,12532
SVSP	29171,08	A0A1L8D5U8	0,28%	0,55%	0,62%	1,98	0,05006	1,12	0,08338	**2,22**	**0,02417**
SVSP	29223,30	A0A1L8D5W3	0,20%	0,19%	0,17%	0,94	0,10228	0,88	0,21192	0,83	0,10918
SVSP	29067,67	A0A1L8D5U3	0,36%	0,36%	0,22%	1,02	0,05572	**0,60**	**0,04003**	**0,61**	**0,03937**
SVSP	28937,85	A0A1L8D626	0,37%	0,40%	0,33%	1,09	0,14065	0,82	0,04693	0,89	0,20590
SVSP	28953,03	A0A1L8D668	0,80%	0,81%	0,72%	1,02	0,33415	0,89	0,12508	0,90	0,08321
SVSP	29064,03	A0A1L8D610	0,52%	0,47%	0,43%	0,90	0,30807	0,91	0,11267	0,82	0,13393
SVSP	28684,37	A0A1L8D5V3	0,37%	0,39%	0,80%	1,06	0,19234	**2,05**	**0,01672**	**2,18**	**0,02601**
SVSP	28580,27	A0A1L8D5W5	0,15%	0,10%	0,15%	0,65	0,10723	**1,52**	**0,01765**	0,99	0,90317
TNF Receptor	24397,61	B9TWJ1	0,04%	0,04%	0,03%	0,99	0,95008	0,82	0,03730	0,81	0,34444
VEGF	16847,05	A0A1L8D651	0,47%	0,17%	0,15%	0,37	0,09444	0,88	0,22802	0,32	0,10330
VNGF	27652,89	A0A1L8D608	0,82%	0,78%	0,82%	0,95	0,01673	1,05	0,29922	1,00	0,94142
VNGF	21705,01	B8QCH4	0,06%	0,06%	0,16%	0,92	0,00499	**2,71**	**0,01522**	**2,50**	**0,01628**
Waprin	9138,53	A0A2H4N3F1	0,02%	0,02%	0,00%	**1,50**	**0,04395**	**Ausente no F2**	**0,00972**	**Ausente no F2**	**0,00749**
Waprin	10279,97	A0A2H4N3E0	0,15%	0,06%	0,08%	0,44	0,22184	1,26	0,81638	0,56	0,25982
Total de proteínas	**135**										

*De acordo com UniProtKB (www.uniprot.org)

**As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste t de Student e valores de $p<0,05$ foram considerados.

Apêndice 6. Proteínas identificadas no veneno inicial (I), final 1 (F1) e final 2 (F2) de *B. moojeni* (Bm 9). A abundância relativa (%) das toxinas foi estimada por meio de quantificação *lable -free* obtida por espectrometria de massas considerando a média da intensidade dos três peptídeos mais intensos de cada proteína identificada. As proteínas com diferença estatística quanto a sua abundância relativa com fold change ≥ 1,5 or ≤ 0,67; p<0,05) estão en negrito. NI: não identificada. CTL: Lectina do tipo C; CRISP: *Cystein-rich secretory protein*; LAAO: L-aminoácido oxidase; PLA_2: Fosfolipase A_2; PLB: Fosfolipase B; SVMP: Metaloprotease do veneno de serpentes; SVSP: Serinoprotease do veneno de serpentes; VEGF: Fator de crescimento endotelial de venenos; VNGF: Fator de crescimento neural de venenos.

			Abundância relativa (%)			Inicial x Final 1		Final 1 x Final 2		Inicial x Final 2	
Famílias de toxinas	**Massa molecular (Da)**	**Número de acesso***	**Inicial**	**Final 1**	**Final 2**	***Fold change***	**Valor de p****	***Fold change***	**Valor de p****	***Fold change***	**Valor de p****
5' Nucleotidase	62041,48	A0A1L8D667	1,42%	1,70%	1,55%	1,20	0,02155	0,91	0,25433	1,09	0,24595
CTL	17558,42	A0A1L8D6E3	0,05%	0,01%	0,28%	**0,27**	**0,02186**	**19,55**	**0,01760**	**5,32**	**0,02423**
CTL	17436,27	A0A1L8D657	1,24%	0,65%	0,61%	**0,52**	**0,03005**	0,94	0,40864	0,49	0,05627
CTL	17427,22	A0A1L8D663	0,29%	0,10%	0,00%	**0,33**	**0,00778**	**Ausente no F2**	**0,00206**	**Ausente no F2**	**0,00451**
CTL	17473,51	A0A1L8D6G5	0,03%	0,02%	0,05%	**0,58**	**0,04304**	**3,15**	**0,01203**	**1,84**	**0,00338**
CTL	17568,39	A0A1L8D640	0,54%	0,43%	0,23%	0,79	0,00825	0,54	0,07599	**0,43**	**0,04509**
CTL	17481,35	A0A1L8D644	1,19%	0,90%	0,39%	0,75	0,05077	**0,44**	**0,00610**	**0,33**	**0,02255**
CTL	17555,35	A0A1L8D6B9	0,33%	0,34%	0,38%	1,04	0,22109	1,10	0,10954	1,15	0,13975
CTL	17360,52	A0A1L8D6C2	0,50%	0,26%	0,24%	**0,53**	**0,02220**	0,92	0,53238	0,49	0,07962
CTL	17295,57	A0A1L8D647	1,38%	0,99%	1,08%	0,72	0,01311	1,09	0,11790	0,78	0,01957
CTL	17203,30	A0A1L8D6H4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17711,07	A0A1L8D6F1	0,04%	0,04%	0,60%	0,94	0,31184	**15,66**	**0,03361**	**14,67**	**0,03220**
CTL	18486,46	A0A1L8D6E6	0,58%	0,41%	0,06%	0,71	0,01079	**0,15**	**0,00497**	**0,10**	**0,00021**
CTL	17948,16	A0A1L8D622	0,46%	0,22%	0,56%	**0,48**	**0,02903**	**2,54**	**0,01617**	1,22	0,12093
CTL	18006,24	A0A1L8D687	0,00%	0,00%	0,32%	NI	NI	**Ausente no F1**	**0,03205**	**Ausente no I**	**0,03205**
CTL	17819,04	A0A1L8D624	0,39%	0,35%	0,21%	0,91	0,36884	0,59	0,36633	0,54	0,24223
CTL	17858,12	A0A1L8D632	0,09%	0,00%	0,00%	**Ausente no F1**	**0,00499**	NI	NI	**Ausente no F2**	**0,00499**
CTL	18140,34	A0A1L8D630	0,18%	0,74%	0,27%	**4,13**	**0,00314**	0,36	0,07003	1,49	0,32748
CTL	19479,99	A0A1L8D619	1,17%	1,70%	0,99%	1,45	0,19054	0,58	0,05103	0,84	0,32760

CTL	17862,80	A0A1L8D6E0	0,06%	0,05%	0,00%	0,85	0,77381	Ausente no F2	0,24920	**Ausente no F2**	**0,03306**
CTL	18123,26	A0A1L8D609	0,08%	0,07%	0,43%	0,89	0,15562	6,13	0,47273	5,47	0,47818
CTL	19342,56	A0A1L8D638	0,10%	0,07%	0,00%	0,71	0,01697	**Ausente no F2**	**0,01807**	**Ausente no F2**	**0,01775**
CTL	17056,09	A0A2H4N3D3	0,15%	0,07%	0,15%	**0,46**	**0,01819**	2,22	0,14040	1,03	0,83724
CTL	18726,40	A0A1L8D636	0,50%	0,27%	0,54%	**0,55**	**0,00566**	2,01	0,16130	1,10	0,60978
CTL	17829,13	M1V359	0,87%	1,29%	0,12%	1,47	0,00677	**0,10**	**0,00480**	**0,14**	**0,00371**
CTL	18112,50	A0A1L8D634	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17943,23	A0A1L8D6B3	0,45%	0,95%	0,30%	2,11	0,08741	**0,31**	**0,00853**	0,66	0,29627
CTL	19464,87	A0A1L8D623	1,68%	0,93%	0,39%	**0,55**	**0,00149**	**0,42**	**0,01073**	**0,23**	**0,00533**
CTL	17084,14	A0A1L8D629	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CTL	17469,58	A0A1L8D6G9	0,00%	0,00%	0,15%	Ausente no I e F1	#DIV/0!	Ausente no I e F1	0,45085	Ausente no I e F1	0,45085
Cistatina	15799,18	A0A2H4N3F5	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Cistatina	15547,84	A0A2H4N3E9	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
CRISP	27749,10	A0A2H4N3D5	2,24%	2,45%	1,41%	1,09	0,04546	**0,57**	**0,03504**	**0,63**	**0,03240**
CRISP	27683,86	F2Q6F6	1,13%	0,63%	0,66%	**0,56**	**0,02362**	1,05	0,20504	**0,58**	**0,03846**
Dynein axonemal	25542,26	C5H0U1	1,08%	0,76%	0,43%	0,70	0,08148	**0,57**	**0,02167**	**0,40**	**0,02972**
Endothelin convertin enzyme	21885,06	B8QCC5	0,28%	0,30%	0,17%	1,05	0,36831	0,59	0,11955	0,62	0,19075
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	40700,55	M9NCD2	0,37%	0,43%	0,49%	1,15	0,02698	1,15	0,02072	1,32	0,02371
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	41370,39	M9NCR9	0,67%	0,60%	1,45%	0,90	0,10945	2,40	0,24567	2,15	0,25701
Hialuronidase	53177,03	A0A2H4N3E2	2,38%	3,08%	2,46%	1,30	0,02985	0,80	0,01213	1,03	0,31625
Hialuronidase	53229,06	A0A2H4Z8F4	0,00%	0,00%	0,00%	NI	NI	NI	NI	NI	NI
LAAO	57239,59	A0A2H4N3D4	1,99%	2,54%	1,15%	1,28	0,07551	0,45	0,07801	0,58	0,07966
LAAO	57096,45	A0A0S1LJ33	0,51%	0,58%	2,14%	1,13	0,14388	3,71	0,09110	4,18	0,08160
LAAO	57060,40	A0A1L8D615	0,64%	1,16%	0,73%	**1,82**	**0,00303**	0,63	0,05465	1,14	0,23087
Fosfodiesterase	93284,97	A0A1L8D6B7	1,26%	1,47%	3,05%	1,16	0,08524	**2,07**	**0,02433**	**2,41**	**0,01159**

PLA_2-D49 ácida	16263,02	A0A1L8D5Z4	1,30%	1,32%	0,38%	1,01	0,31912	**0,28**	**0,00195**	**0,29**	**0,00869**
PLA_2-D49 ácida	16203,81	I2DAL5	0,83%	1,25%	0,53%	**1,50**	**0,00324**	**0,43**	**0,01220**	**0,64**	**0,03382**
PLA_2-D49 ácida	16232,89	I2DAL4	0,01%	0,05%	0,24%	**5,19**	**0,02364**	**4,97**	**0,00686**	**25,80**	**0,00969**
PLA_2-D49 ácida	16287,08	A0A1L8D6C4	0,50%	0,46%	0,50%	0,93	0,01923	1,10	0,26747	1,02	0,75911
PLA_2-D49 ácida	16123,80	M1TFP9	0,09%	0,09%	0,23%	1,00	0,98481	**2,56**	**0,03089**	**2,56**	**0,02690**
PLA_2-D49 ácida	16820,72	A8E2V5	0,21%	0,13%	0,36%	0,64	0,07111	**2,67**	**0,01290**	1,70	0,05698
PLA_2-D49 ácida	16313,25	A0A1L8D602	0,24%	0,37%	0,15%	1,56	0,05866	**0,40**	**0,02249**	**0,62**	**0,03117**
PLA_2-D49 ácida	14824,18	A0A2D1UXN7	0,33%	0,18%	0,90%	**0,55**	**0,01509**	**5,02**	**0,00531**	**2,75**	**0,01057**
PLA_2-D49 ácida	16768,66	A8E2V6	0,05%	0,11%	0,06%	2,18	0,05119	**0,54**	**0,03142**	1,18	0,15685
PLA_2-K49	16416,71	A0A1S5XW05	2,20%	2,01%	2,82%	0,92	0,21272	1,40	0,09700	1,28	0,06185
PLA_2-K49	16497,76	A0A2H4N391	1,27%	1,79%	0,13%	1,41	0,05019	**0,07**	**0,01159**	**0,11**	**0,00620**
PLA_2-K49	14648,45	I6L8L6	2,05%	2,39%	2,81%	1,17	0,05835	1,18	0,12756	1,37	0,04517
PLA_2-K49	16471,67	A0A1L8D605	0,00%	0,03%	0,00%	**Ausente no I**	**0,00772**	**Ausente no F2**	**0,00772**	NI	NI
PLA_2-K49	16413,77	A0A1L8D5Z7	4,47%	5,44%	2,35%	1,22	0,07479	**0,43**	**0,04019**	**0,53**	**0,02428**
PLA_2-K49	16636,11	I2DAL6	1,99%	2,30%	1,68%	1,16	0,43839	0,73	0,16552	0,84	0,18108
PLA_2-K49	16364,70	L7VGC1	0,19%	0,57%	0,70%	**3,07**	**0,00078**	1,23	0,02208	**3,78**	**0,00623**
PLA_2-K49	14303,08	A8E2V7	1,42%	1,79%	1,42%	1,26	0,02647	0,79	0,16672	1,00	0,98467
Inibidor de PLA_2	18713,14	A0A2H4N3E1	0,26%	0,29%	0,12%	1,12	0,56788	0,41	0,13950	0,47	0,32321
Inibidor de PLA2	37998,37	A0A2H4N3D8	0,17%	0,21%	0,09%	1,23	0,07101	**0,44**	**0,02253**	**0,54**	**0,00154**
PLB	64274,29	A0A2H4N395	1,05%	1,05%	1,23%	1,00	0,90961	1,17	0,04373	1,17	0,06331
SVMP - PI	25011,11	A0A2H4N390	2,30%	2,32%	3,53%	1,01	0,98853	1,52	0,32425	**1,53**	**0,04280**
SVMP - PI	46658,39	A0A1L8D5Y9	0,29%	0,00%	0,00%	**Ausente no F1**	**0,01730**	NI	NI	**Ausente no F2**	**0,01730**
SVMP - PI	46811,75	A0A1L8D6A8	0,69%	0,61%	0,57%	0,88	0,04590	0,94	0,61539	0,83	0,31079
SVMP - PI	46668,55	A0A1L8D683	0,00%	0,03%	0,00%	**Ausente no I**	**0,01394**	**Ausente no F2**	**0,01394**	NI	NI
SVMP - PI	43610,02	A0A1L8D5Z8	1,78%	0,78%	1,72%	**0,44**	**0,01367**	**2,21**	**0,00723**	0,97	0,34046
SVMP - PI	46996,66	A0A1L8D5Y8	0,54%	0,46%	0,49%	0,86	0,13523	1,06	0,29034	0,91	0,04502
SVMP - PI	27582,97	E3UJL4	0,83%	0,79%	0,59%	0,96	0,00929	0,75	0,14674	0,72	0,12346

SVMP - PI	27623,07	E3UJL3	0,19%	0,26%	0,00%	1,36	0,03386	**Ausente no F2**	**0,00268**	**Ausente no F2**	**0,00863**
SVMP - PI	47312,40	Q1ZZ79	1,01%	0,87%	2,07%	0,86	0,14253	2,37	0,05406	**2,04**	**0,04203**
SVMP - PII	54822,06	A0A1L8D600	1,37%	2,08%	3,26%	1,51	0,08074	1,57	0,15038	2,37	0,12474
SVMP - PII	54387,81	A0A1L8D6A9	0,24%	0,22%	1,37%	0,92	0,27155	**6,28**	**0,00234**	**5,79**	**0,00707**
SVMP - PII	35980,95	E3UJM0	0,00%	0,00%	0,34%	NI	NI	Ausente no F1	0,19749	Ausente no I	0,19749
SVMP - PII	37862,46	Q7T1T5	1,31%	0,98%	0,11%	0,74	0,32449	**0,11**	**0,00191**	0,08	0,09718
SVMP - PII	54595,92	A0A1L8D5Z6	0,13%	0,16%	0,41%	1,23	0,05990	**2,57**	**0,00949**	**3,16**	**0,00212**
SVMP - PII	37509,63	E3UJL5	0,57%	0,48%	0,48%	0,85	0,06408	1,00	0,88514	0,85	0,13963
SVMP - PII	34727,18	E3UJL9	0,07%	0,04%	0,14%	0,60	0,12573	**3,14**	**0,04093**	1,87	0,11742
SVMP - PII	56628,59	A0A1L8D5Z3	0,94%	0,59%	4,57%	**0,64**	**0,02751**	7,69	0,13898	4,88	0,15402
SVMP - PII	54667,63	A0A1L8D5Z0	0,91%	0,13%	0,43%	**0,14**	**0,04279**	**3,40**	**0,03644**	0,47	0,09203
SVMP - PII	54991,95	A0A1L8D649	0,25%	0,25%	0,20%	1,00	0,97810	0,79	0,22796	0,79	0,19348
SVMP - PII	37768,58	E3UJL7	0,43%	0,25%	0,16%	**0,58**	**0,00009**	**0,63**	**0,01280**	**0,36**	**0,00434**
SVMP - PII	35237,65	E3UJL8	0,21%	0,17%	0,06%	0,83	0,03985	**0,34**	**0,00277**	**0,28**	**0,00717**
SVMP - PII	56077,46	A0A1L8D675	0,65%	0,44%	0,42%	0,68	0,12514	0,95	0,59780	**0,65**	**0,04090**
SVMP - PIII	70514,41	A0A0K2JNB8	0,07%	0,09%	0,19%	1,20	0,02865	**2,27**	**0,01217**	**2,72**	**0,01408**
SVMP - PIII	70271,33	A0A1L8D5X9	2,04%	2,11%	1,27%	1,03	0,38728	**0,60**	**0,03526**	**0,62**	**0,00124**
SVMP - PIII	27970,99	Q7T1T3	1,00%	0,58%	0,74%	**0,58**	**0,04435**	1,28	0,58165	0,74	0,46468
SVMP - PIII	69891,42	A0A1L8D641	0,14%	0,20%	0,34%	1,42	0,06013	**1,69**	**0,01663**	**2,41**	**0,00632**
SVMP - PIII	8371,70	C3UWN4	0,01%	0,00%	0,00%	Ausente no F1	0,21590	NI	NI	Ausente no F2	0,21590
SVMP - PIII	70541,54	A0A1S6K7T1	0,99%	0,94%	1,05%	0,95	0,28326	1,12	0,07754	1,06	0,11796
SVMP - PIII	51303,84	E3UJL2	1,45%	1,54%	0,89%	1,06	0,93435	0,58	0,34048	0,62	0,46587
SVMP - PIII	70083,79	A0A1L8D5X6	1,20%	0,96%	0,67%	0,80	0,03730	0,69	0,29855	0,56	0,18908
SVMP - PIII	70899,14	A0A1L8D5V7	0,48%	0,63%	1,69%	1,30	0,01772	**2,70**	**0,04132**	**3,51**	**0,03852**
SVMP - PIII	70668,97	A0A1L8D5V8	0,68%	0,54%	0,59%	0,80	0,00948	1,09	0,15880	0,87	0,10780
SVMP - PIII	70133,74	A0A1L8D5X7	0,34%	0,31%	1,21%	0,90	0,00864	3,88	0,46834	3,51	0,47992
SVMP - PIII	70175,46	A0A1L8D5Z1	0,31%	0,46%	0,14%	1,47	0,00148	**0,30**	**0,04631**	0,45	0,08385

SVMP - PIII	69564,32	A0A1L8D5Y2	0,70%	0,29%	0,69%	**0,41**	**0,01017**	**2,42**	**0,01662**	1,00	0,64175
SVMP - PIII	70198,30	A0A1L8D691	0,69%	0,52%	0,73%	0,74	0,00506	1,42	0,12208	1,05	0,55341
SVMP - PIII	69882,26	A0A1L8D5X8	0,49%	0,54%	0,57%	1,10	0,12540	1,06	0,05240	1,16	0,05700
SVMP - PIII	71139,30	A0A1L8D5X1	0,08%	0,20%	0,18%	2,41	0,03587	0,93	0,79619	2,25	0,28393
SVMP - PIII	70839,89	A0A1L8D656	0,48%	0,59%	0,39%	1,24	0,03748	0,66	0,31159	0,82	0,59177
SVMP - PIII	69765,31	A0A1L8D689	0,44%	0,41%	0,37%	0,95	0,69870	0,91	0,26582	0,86	0,28020
SVMP - PIII	70656,69	A0A1L8D646	1,33%	1,31%	1,38%	0,98	0,39302	1,06	0,65276	1,04	0,77673
SVMP - PIII	69670,31	A0A1L8D5X3	2,76%	3,20%	0,29%	1,16	0,01601	**0,09**	**0,00994**	**0,10**	**0,01461**
SVMP - PIII	70734,91	A0A1L8D5W6	0,63%	0,74%	1,42%	1,17	0,04000	**1,94**	**0,04990**	**2,27**	**0,03788**
SVMP - PIII	70982,90	A0A1L8D677	0,12%	0,15%	0,06%	1,29	0,02871	0,38	0,13085	0,49	0,18524
SVMP - PIII	71010,12	A0A1L8D633	0,17%	0,17%	0,14%	0,96	0,30907	0,83	0,63094	0,80	0,59206
SVMP - PIII	9553,68	C3UWN2	0,03%	0,05%	0,00%	**1,73**	**0,03781**	**Ausente no F2**	**0,01544**	**Ausente no F2**	**0,00084**
SVMP - PIII	70572,85	A0A1L8D5X2	0,30%	0,28%	0,00%	0,91	0,06600	**Ausente no F2**	**0,01564**	**Ausente no F2**	**0,02021**
SVMP - PIII	70412,70	A0A1L8D682	0,34%	0,37%	0,55%	1,11	0,08245	1,47	0,03274	**1,64**	**0,04154**
SVMP - PIII	9538,66	C3UWN3	0,04%	0,02%	0,11%	**0,44**	**0,03388**	**6,13**	**0,00959**	**2,70**	**0,02386**
SVMP - PIII	70013,13	A0A1L8D6A0	0,41%	0,33%	0,19%	0,82	0,03942	0,58	0,20279	0,47	0,14726
SVMP - PIII	70266,39	A0A1L8D5Y6	0,83%	0,59%	0,79%	0,71	0,03682	1,34	0,09618	0,95	0,48957
SVMP - PIII	70054,30	A0A1L8D5Y7	0,04%	0,02%	0,00%	0,63	0,31676	**Ausente no F2**	**0,01349**	Ausente no F2	0,11691
SVMP - PIII	51806,57	E3UJL0	0,46%	0,23%	0,53%	**0,50**	**0,03106**	**2,31**	**0,00669**	1,16	0,07094
SVMP - PIII	51680,38	E3UJL1	0,16%	0,10%	0,08%	0,60	0,05067	0,79	0,17083	**0,48**	**0,00213**
SVMP - PIII	69862,22	A0A1L8D666	0,39%	0,41%	0,14%	1,06	0,02687	**0,35**	**0,03040**	**0,37**	**0,03076**
SVMP - PIII	69687,94	A0A1L8D5Y0	0,56%	0,59%	0,00%	1,05	0,02869	**Ausente no F2**	**0,02230**	**Ausente no F2**	**0,02198**
SVSP	28428,05	A0A1L8D5V4	1,33%	1,52%	0,59%	1,15	0,07296	**0,39**	**0,02481**	**0,44**	**0,01210**
SVSP	28948,42	A0A1L8D664	1,34%	1,06%	2,05%	0,79	0,00301	1,94	0,12223	1,53	0,16896
SVSP	28728,42	A0A1L8D5T9	0,43%	0,76%	0,73%	1,77	0,44874	0,97	0,93350	1,71	0,07332
SVSP	29027,74	A0A1L8D5R9	0,98%	0,95%	0,64%	0,97	0,09166	0,67	0,25155	0,65	0,23892
SVSP	28560,44	A0A1L8D674	0,88%	0,46%	1,41%	**0,52**	**0,02638**	**3,07**	**0,00661**	**1,60**	**0,00905**

SVSP	29337,44	A0A1L8D620	1,62%	1,68%	2,52%	1,04	0,03332	1,49	0,03246	**1,56**	**0,02756**
SVSP	29308,40	A0A1L8D5U9	1,24%	1,23%	0,46%	0,99	0,67154	**0,38**	**0,02756**	**0,37**	**0,04342**
SVSP	29421,56	A0A1L8D635	0,37%	0,48%	0,92%	1,30	0,03273	**1,92**	**0,04675**	**2,50**	**0,03089**
SVSP	28437,96	A0A1L8D658	0,06%	0,10%	0,31%	**1,69**	**0,03703**	3,11	0,06954	5,24	0,06429
SVSP	29207,00	A0A1L8D5V0	1,69%	2,30%	2,06%	1,36	0,04673	0,89	0,60546	1,22	0,42295
SVSP	28803,54	A0A1L8D5W4	2,67%	2,52%	0,45%	0,94	0,22407	**0,18**	**0,01125**	**0,17**	**0,00596**
SVSP	29171,08	A0A1L8D5U8	1,50%	1,45%	1,40%	0,97	0,46811	0,96	0,59158	0,93	0,20018
SVSP	29223,30	A0A1L8D5W3	0,14%	0,15%	0,25%	1,02	0,28926	**1,73**	**0,01962**	**1,77**	**0,01111**
SVSP	29067,67	A0A1L8D5U3	0,18%	0,08%	0,49%	**0,45**	**0,03815**	6,09	0,08532	2,72	0,12413
SVSP	28937,85	A0A1L8D626	0,58%	0,37%	0,98%	**0,63**	**0,02598**	2,67	0,07069	1,70	0,12052
SVSP	28953,03	A0A1L8D668	1,73%	1,36%	1,81%	0,79	0,05237	1,33	0,03370	1,05	0,05516
SVSP	29064,03	A0A1L8D610	0,39%	0,38%	0,23%	0,96	0,47801	**0,62**	**0,04004**	**0,59**	**0,02021**
SVSP	28684,37	A0A1L8D5V3	0,55%	0,62%	1,50%	1,12	0,12055	2,42	0,54675	2,70	0,52837
SVSP	28580,27	A0A1L8D5W5	0,22%	0,36%	0,65%	**1,62**	**0,01425**	**1,82**	**0,02238**	**2,95**	**0,01980**
TNF Receptor	24397,61	B9TWJ1	0,14%	0,13%	0,17%	0,95	0,24797	1,31	0,15460	1,25	0,22806
VEGF	16847,05	A0A1L8D651	0,35%	0,32%	0,31%	0,91	0,20817	0,96	0,16398	0,88	0,10789
VNGF	27652,89	A0A1L8D608	1,41%	1,50%	0,63%	1,06	0,09403	0,42	0,06367	0,45	0,08090
VNGF	21705,01	B8QCH4	0,19%	0,38%	0,24%	**2,05**	**0,00584**	**0,63**	**0,00997**	1,30	0,00478
Waprin	9138,53	A0A2H4N3F1	0,12%	0,08%	0,14%	0,66	0,09250	1,76	0,15002	1,16	0,26717
Waprin	10279,97	A0A2H4N3E0	0,11%	0,07%	0,00%	**0,61**	**0,03734**	**Ausente no F2**	**0,02174**	**Ausente no F2**	**0,00111**
Total de proteínas	**139**										

*De acordo com UniProtKB (www.uniprot.org)

**As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste t de Student e valores de $p<0,05$ foram considerados.