

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EDUARDO OLIVEIRA VENANCIO DE LIMA

Caracterização do perfil coagulotóxico dos venenos de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus*

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EDUARDO OLIVEIRA VENANCIO DE LIMA

Caracterização do perfil coagulotóxico dos venenos de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus*

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Karen de Moraes Zani

Versão original

São Paulo

2023

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)

Lima, Eduardo Oliveira Venancio de
Caracterização do perfil coagulotóxico dos venenos
de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus* /
Eduardo Oliveira Venancio de Lima; orientadora
Karen de Moraes Zani. -- São Paulo, 2023.
105 p.

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

1. Veneno. 2. Serpentes do Nordeste. 3. Cascata
de Coagulação. 4. Tromboelastometria. I. Zani, Karen
de Moraes, orientador. II. Título.

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Karen De Moraes Zani

Área: Herpetologia

Equipe envolvida: Eduardo Oliveira Venancio De Lima - (executante);

Título da proposta: "Caracterização do perfil coagulotóxico de venenos de Bothrops erythromelas e Bothrops leucurus".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo, na reunião de 17/02/2023, **ANALISOU e APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.



Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Characterization of the coagulotoxic profile of Bothrops erythromelas and Bothrops leucurus venoms*", protocol number CEUAX 6712170223 (ID 000485), under the responsibility Karen De Moraes Zani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute of São Paulo, and was approved in the meeting of day February 17, 2023.

Certificamos que a proposta intitulada: "*Caracterização do perfil coagulotóxico de venenos de Bothrops erythromelas e Bothrops leucurus*", protocolado sob o CEUAX nº 6712170223, sob a responsabilidade de Karen De Moraes Zani, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 17 de fevereiro de 2023.



Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do perfil coagulotóxico de venenos de serpentes da família Viperidae de importância médica no Brasil

Pesquisador: KAREN DE MORAIS ZANI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43560620.0.0000.5493

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.652.287

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação de Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1525651.pdf, de 25/03/2021) e/ou do Projeto Detalhada (Projeto_24mar20_final.pdf, de 26/03/2020):

"O presente estudo propõe caracterização do perfil coagulotóxico de venenos individuais de espécies de serpentes dos gêneros Bothrops, Crotalus e Lachesis de maior importância médica em diferentes regiões brasileiras. Essa caracterização será realizada utilizando-se substratos cromogênicos, fibrinogênio humano e bovino (comerciais) e plasma humano. Este projeto foi submetido à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para obtenção de auxílio financeiro (processo 2020/08246-2) e encontra-se em fase de análise"

"O envenenamento por serpentes é classificado pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada responsável por aproximadamente 2,5 milhões de envenenamentos e 150 mil mortes por ano, especialmente em regiões rurais da África, Ásia, América Latina e Oceania. No Brasil, a família Viperidae representa o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos registrados. Dentre os efeitos resultantes desses acidentes, acredita-se que os distúrbios hemostáticos causados pelos venenos de uma grande variedade de espécies de serpentes desempenhem um papel central na

Endereço: Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3305

Bairro: Jd. Iris/Pirituba

CEP: 05.145-200

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3512-8412

Fax: (11)3512-8412

E-mail: cep.uniansp@anhanguera.com

Continuação do Parecer: 4.652.287

fisiopatologia do envenenamento e na captura da presa. Os venenos de serpentes, especialmente as que pertencem às famílias Elapidae e Viperidae, possuem diversas toxinas que interagem com a cascata de coagulação sanguínea e com o sistema fibrinolítico. Desde a década de 80, a maneira mais utilizada de avaliar a atividade coagulante dos venenos de serpentes é por meio da determinação de sua "Dose Mínima Coagulante" (DMC). Entretanto, uma nova abordagem para caracterizar a coagulotoxicidade dos venenos de serpentes está sendo empregada para caracterizar esse aspecto do envenenamento em diferentes espécies de serpentes, avaliando não apenas o tempo de coagulação como end point, mas também a velocidade de sua formação e sua resistência. Ainda, avalia a atividade dos venenos sobre componentes específicos do sistema hemostático e sua dependência do cálcio e de fosfolípidos.

Esses parâmetros permitem a caracterização de variações inter- e intraespecíficas relacionadas à atividade coagulante (ou anticoagulante) dos venenos de serpentes, mesmo que sutis. A variabilidade intraespecífica dos venenos de serpentes associada à sua diversidade funcional é particularmente crítica quando consideramos sua reatividade com o antiveneno. Por esse motivo, o entendimento das variações inter- e intraespecíficas do veneno das serpentes peçonhentas e sua ação no envenenamento humano é essencial para a produção e para a utilização eficiente dos soros antivenenos. Tendo em vista a complexidade do envenenamento causado por espécies de serpentes pertencentes à família Viperidae e a relevância dessas espécies para a saúde pública, a realização de um estudo multifacetado comparando o perfil coagulotóxico dos venenos dessas espécies e sua neutralização pelo antiveneno produzido é de extrema importância. Assim, o presente projeto propõe a caracterização do perfil coagulotóxico de venenos individuais de espécies de serpentes dos gêneros Bothrops, Crotalus e Lachesis de maior importância médica em diferentes regiões brasileiras."

"A caracterização do perfil coagulotóxico dos venenos em análise será realizada utilizando-se substratos cromogênicos, fibrinogênio humano comercial e plasma humano.

O plasma humano será obtido por meio da coleta de sangue de doadores voluntários (conforme descrito abaixo), que será realizada por enfermeiros e/ou técnicos de enfermagem do ambulatório do Instituto Butantan. O profissional que irá realizar a coleta fará a assepsia das mãos e sempre utilizará luvas descartáveis, que serão trocadas a cada doador. Os tubos em que o sangue será armazenado serão devidamente identificados. Em seguida, o profissional irá localizar a veia mais adequada para a coleta de sangue, apalpando o braço do doador e colocará o garrote no mesmo. O local da punção será desinfetado com álcool 70o e a punção venosa será realizada utilizando-se

Endereço: Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3305

Bairro: Jd. Iris/Pirituba

CEP: 05.145-200

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3512-8412

Fax: (11)3512-8412

E-mail: cep.uniansp@anhanguera.com

Continuação do Parecer: 4.652.287

escalpe (butterfly) 25G e seringas plásticas descartáveis. O garrote será retirado assim que o sangue fluir pelo escalpe. Serão coletados, no máximo, 30 mL de sangue por doador. Após a coleta, será imediatamente adicionado ao sangue o anticoagulante citrato de sódio 3,8%, na proporção de 1:10. O sangue será então centrifugado por 15 minutos a 1.200 g em temperatura ambiente para obtenção do plasma. O plasma obtido será alíquotado e armazenado a -70oC até a utilização.

Critério de Inclusão:

Indivíduos saudáveis, homens e mulheres, com idade entre 18 e 60 anos.

Critério de Exclusão:

Indivíduos que fazem ou fizeram uso de fármacos que possam interferir na coagulação sanguínea"

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:

O objetivo primário do presente estudo é a caracterização do perfil coagulotóxico de venenos individuais de espécies de serpentes dos gêneros Bothrops (B. alternatus, B. atrox, B. erythromelas, B. jararaca, B. jararacussu, B. leucurus, B. moojeni e B. neuwiedi), Crotlaus (C. durissus) e Lachesis (L. muta) de maior importância médica em diferentes regiões brasileiras."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

Possível formação de hematoma no local de coleta de sangue.

Benefícios:

Caso o participante apresente parâmetros de coagulação sanguínea alterados, o mesmo será notificado e orientado a consultar o serviço de saúde para investigação de possíveis problemas hemostáticos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Patrocinador: fomento em análise FAPESP.

Número de participantes incluídos: 100

Centro de pesquisa participante: UNIFESP

Previsão de início e encerramento do estudo: 01 junho 2021 com vigência de 2 anos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Endereço: Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3305

Bairro: Jd. Iris/Pirituba

CEP: 05.145-200

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3512-8412

Fax: (11)3512-8412

E-mail: cep.uniansp@anhanguera.com

Continuação do Parecer: 4.652.287

Recomendações:

Trata-se da análise das respostas ao Parecer CEP UNIAN nº 4.603.178 de 21 março de 2021.

1) No documento intitulado "TCLE.pdf" submetido em 22/02/2021, solicita-se que seja adicionado "garantia de que o participante da pesquisa receberá uma VIA do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" - res. 466/12, alínea (f), parágrafo 3, item IV).

Resposta: "No documento intitulado "TCLE.pdf" foi adicionado como item 9 do documento "Você receberá uma VIA do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido". PENDÊNCIA ATENDIDA

2) No documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1525651.pdf" de 22/02/2021 deve-se incluir os benefícios aos participantes da pesquisa - res. 466/12, item V.2.

Resposta: " Os benefícios aos participantes da pesquisa foram incluídos às informações básicas do projeto e ao TCLE (complemento ao item 2)." PENDÊNCIA ATENDIDA.

3) Incluir o currículo (.pdf) lattes dos pesquisadores envolvidos no projeto . (res 466/12, itens II.17 e III.2).

Resposta: "O currículo Lattes dos pesquisadores envolvidos no projeto foi incluído." PENDÊNCIA ATENDIDA.

4) Ajustar o cronograma de modo que a coleta de dados somente se inicie após a aprovação do projeto pela Comissão de ética. (res. 466.12).

Resposta: "O cronograma de execução foi ajustado para início em 1º de julho de 2021." PENDÊNCIA ATENDIDA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UNIAN, de acordo

Endereço: Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3305

Bairro: Jd. Iris/Pirituba

CEP: 05.145-200

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3512-8412

Fax: (11)3512-8412

E-mail: cep.uniansp@anhanguera.com

Continuação do Parecer: 4.652.287

com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

De acordo com o compromisso assumido pelo pesquisador no ato de submissão do projeto, fica estabelecido que o relatório parcial deverá ser entregue, via Plataforma Brasil, em junho de 2022 e o relatório final deverá ser entregue, via Plataforma Brasil, em setembro de 2023.

Segue o modelo para elaboração de relatório (<https://www.pgsskroton.com.br/unian/ce-unian/cep-unian>)

Lembrando que é responsabilidade do pesquisador acompanhar todos os trâmites de seu projeto na Plataforma Brasil, independente de qualquer mensagem enviada pelo sistema.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1525651.pdf	25/03/2021 11:50:36		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	25/03/2021 11:50:13	KAREN DE MORAIS ZANI	Aceito
Outros	Resposta.pdf	25/03/2021 11:47:56	KAREN DE MORAIS ZANI	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_2.pdf	22/02/2021 09:16:03	KAREN DE MORAIS ZANI	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_pesquisa.pdf	10/08/2020 10:11:19	KAREN DE MORAIS ZANI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_24mar20_final.pdf	26/03/2020 08:37:22	KAREN DE MORAIS ZANI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3305

Bairro: Jd. Iris/Pirituba

CEP: 05.145-200

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3512-8412

Fax: (11)3512-8412

E-mail: cep.uniansp@anhanguera.com

Continuação do Parecer: 4.652.287

Não

SAO PAULO, 15 de Abril de 2021

Assinado por:
Susana Nogueira Diniz
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3305

Bairro: Jd. Iris/Pirituba

CEP: 05.145-200

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3512-8412

Fax: (11)3512-8412

E-mail: cep.uniansp@anhanguera.com



Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Ciência, Tecnologia
e Insumos Estratégicos de Saúde
Instituto Butantan



São Paulo, 28 de fevereiro de 2023

Eu, Karen de Moraes Zani, portadora do CPF: 227.314.208-04, declaro que o protocolo intitulado “Caracterização do perfil coagulotóxico de venenos de serpentes da família Viperidae de importância médica do Brasil (CAAE: 43560620.0.0000.5493)” da comissão de ética da Plataforma Brasil, contempla o trabalho de mestrado desenvolvido pelo aluno Eduardo Oliveira Venancio de Lima, portador do CPF: 447.113.818-99, intitulado “Caracterização do perfil coagulotóxico de venenos de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus*”. Dessa forma, solicitamos que a Comissão do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia considere o certificado emitido Pela Plataforma Brasil.

Eduardo Oliveira V. de Lima

Eduardo Oliveira Venancio de Lima
Aluno de Mestrado
Laboratório de Herpetologia
Instituto Butantan

Karen de Moraes Zani

Karen de Moraes Zani
Pesquisadora de Laboratório Plena
Laboratório de Herpetologia
Instituto Butantan

À todos que fizeram esse sonho possível!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a toda minha família por todo apoio durante minha jornada. Mãe, minha Maria, sem a senhora eu nada seria, tudo que conquistei até hoje foi graças a senhora e a sua criação, que mesmo com toda dificuldade conseguiu educar muito bem seus três filhos. Falando neles, preciso agradecer meus irmãos, Elaine e Guilherme, vocês também foram essenciais para minha formação como ser humano. Agradeço também o meu padrasto Antônio Carlos, saiba que nesse pouco tempo que temos contato, você foi mais presente do que meu pai durante toda minha vida, então obrigado.

À minha companheira, Brendha, a mulher que pretendo passar minha vida toda ao lado. Obrigado por me aguentar durante esse período difícil, sei que vai aguentar por muito mais tempo. Obrigado pelos momentos felizes, pelas conversas, pelo apoio emocional, com toda certeza sem você tudo isso seria mais difícil.

À minha orientadora, Dra. Karen de Moraes Zani, por acreditar em mim e por me formar como pesquisador. Sei que tive minhas dificuldades no começo, mas graças a você consegui concluir mais uma etapa da minha vida acadêmica. Obrigado pela orientação, que muitas vezes ultrapassou apenas a parte profissional.

A todos os meus colegas do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pelos ensinamentos e reflexões durante a discussão de artigo ou na execução de um experimento. Esse ambiente inclusivo e amigável só foi possível pela incrível gestão da Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo e da Dra. Karen de Moraes Zani, vocês conseguiram criar um grupo coeso e receptivo, a ponto de que as amizades construídas no Laboratório transcendem o profissional.

Aos meus amigos, Caroline, Daniela, Juan, Lídia, Luccas, Victor e Weslei, vocês sempre me ajudaram nas dificuldades, e sempre riram comigo nos momentos de alegria. Agradeço por cada palavra, cada conselho, cada risada e até mesmo por cada “ofensa”. Quero levar vocês para sempre comigo, pessoas incríveis que não são encontradas em todo lugar. Como falar de amizade e não lembrar de você, Adriano, que apesar de não me auxiliar diretamente durante o Mestrado, sem ele a Graduação teria sido muito mais difícil, obrigado por tudo, você é peça essencial do Edu de hoje.

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

Ao Dr. Daniel Rodrigues Stuginski, ao Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna, e ao Giovanni Perez Machado da Silveira, todos do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela coleta do material biológico.

Ao Dr. Benedito Carlos Prezoto do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, pelo auxílio na execução dos experimentos de tromboelastometria.

Também agradeço a todos os doadores voluntários de sangue, sem vocês os ensaios de tromboelastometria não se realizariam.

Á todos os profissionais do Laboratório de Herpetologia pela manutenção dos laboratórios de pesquisa e pelo biotério, sem vocês os trabalhos realizados nesse local não se realizariam.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (130742/2021-0).

RESUMO

LIMA, EOV. **Caracterização do perfil coagulotóxico dos venenos de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus***. 2023. 105 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são as responsáveis por causar a maior parte dos envenenamentos, e seus sintomas são principalmente a ação hemorrágica, inflamação aguda e distúrbios na coagulação. Apesar de historicamente o potencial coagulante dos venenos de serpentes ter sido analisado apenas pelo tempo de formação do coágulo, sabe-se que eles podem atuar em diversos pontos da cascata de coagulação. Tendo em vista esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil coagulotóxico dos venenos de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus* e o potencial neutralizante do soro antibotrópico. Para isso, foram realizados testes de análise do perfil proteico, imunorreconhecimento, análise das atividades enzimáticas, ação do veneno sobre fatores específicos da cascata de coagulação, tromboelastometria e inibição das atividades pelo soro antibotrópico. A análise do perfil proteico apresentou padrão característico para cada espécie, evidenciando que as *B. erythromelas* têm maior concentração de metaloproteases em seus venenos enquanto as *B. leucurus* têm fosfolipases A_2 em abundância. As amostras de veneno de *B. erythromelas* foram melhor reconhecidas pelo soro antibotrópico quando comparadas com as amostras de *B. leucurus*. Não houve diferenças entre as amostras de *B. erythromelas* e *B. leucurus* em relação as atividades enzimáticas testadas, porém o soro antibotrópico apresentou melhor inibição da atividade proteolítica das amostras de *B. erythromelas*. As amostras de *B. leucurus* tiveram maior atividade trombina-símile, e foram melhor neutralizadas pelo soro antibotrópico na ativação de Fator X. O veneno de *B. erythromelas* mostrou tendência de ser mais pró-coagulante sobre o plasma do que os venenos de *B. leucurus*, e o *pool* de veneno de ambas as espécies se mostrou mais pró-coagulante do que a média dos indivíduos. Por fim, o soro antibotrópico inibiu melhor o potencial coagulante das amostras de *B. leucurus* do que das amostras de *B. erythromelas*. Conclui-se que apesar dos venenos utilizados neste trabalho se mostrarem pró-coagulantes, possuem diferenças com relação à sua capacidade coagulante sobre a cascata de coagulação plasmática.

Palavras-chave: Veneno; Serpentes do Nordeste; Cascata de coagulação; Tromboelastometria.

ABSTRACT

LIMA, EOV. **Characterization of the coagulotoxic profile of *Bothrops erythromelas* and *Bothrops leucurus* venoms**. 2023. 105 p. Dissertation (Master's in biotechnology) – Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

In Brazil, snakes of the genus *Bothrops* are responsible for most cases of envenomation, and the symptoms are mainly hemorrhagic action, acute inflammation and coagulation disorders. Although historically the coagulant potential of snake venoms has been analyzed only by the time of clot formation, it is known that they may act at several stages in the coagulation cascade. Bearing these aspects in mind, the objective of this work was to characterize the coagulotoxic profile of *Bothrops erythromelas* and *Bothrops leucurus* venoms and the neutralizing potential of antiothropic serum. To this end, tests were carried out to analyze the protein profile, immunorecognition, analysis of enzymatic activities, action of the venom on specific factors of the coagulation cascade, thromboelastometry and inhibition of activities by the antiothropic serum. The analysis of the protein profile showed a specific pattern for each species, showing that *B. erythromelas* has a high concentration of metalloproteases in their venoms, while *B. leucurus* has phospholipases A₂ in abundance. *B. erythromelas* venom samples were better recognized by antiothropic serum when compared to *B. leucurus* samples. There were no differences between the samples of *B. erythromelas* and *B. leucurus* in relation to the enzymatic activities analyzed, however the antiothropic serum showed better inhibition of the proteolytic activity of the samples of *B. erythromelas*. *B. leucurus* samples had higher thrombin-like activity and were better neutralized by antiothropic serum in activating Factor X. *B. erythromelas* venom presented a tendency to be more procoagulant on plasma than *B. leucurus* venoms, and the venom pool of both species was more procoagulant than the average of the individuals. Finally, antiothropic serum inhibited the coagulant potential of *B. leucurus* samples better than *B. erythromelas* samples. It is concluded that although the venoms used in this work are shown to be procoagulant, they have differences regarding their coagulant capacity on the plasmatic coagulation cascade.

Keyword: Venom; Snakes of the Northeast; coagulation cascade; Thromboelastometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica das serpentes. As manchas representam a distribuição de *B. erythromelas* (verde) e de *B. leucurus* (amarelo). Mapa confeccionado em programa QGis (v. 3.10.1) e as serpentes foram fotografadas pelo colaborador Dr. Sávio Sant'Anna.27

Figura 2 - Perfil proteico das amostras de veneno em eletroforese em gel de poli(acrilamida contendo SDS (15%)). Foram aplicados 20 µg de proteína de veneno por canaleta. Cada linha representa o perfil proteico individual de cada espécime utilizado, separado por espécie. As amostras foram analisadas em condições redutoras (com adição do agente 2-Mercaptoetanol) e não redutoras. O marcador de massa molecular (BioRad) está na primeira linha de cada gel.3939

Figura 3 - Perfil cromatográfico das amostras de veneno. As amostras de veneno foram aplicadas (75µg) em equipamento Jasco para análise de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) em coluna C18 (Teknokroma) e a leitura foi mensurada em A415nm. As legendas das figuras são apresentadas com a sigla de cada espécie (Be - *B. erythromelas*, Bl - *B. leucurus* e Bj - *B. jararaca*) acompanhada da sua numeração. As amostras foram eluídas por meio de um gradiente descontínuo de acetonitrila 99,9% contendo TFA 0,1% (solução B) (representado pela linha tracejada).4242

Figura 4 - Western blotting das amostras de veneno. Foram aplicados 20 µg de proteína de veneno por canaleta em um gel de poli(acrilamida contendo SDS (15%)). Logo após a corrida as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, incubadas com o soro antibotrópico e em seguida com um anticorpo contra imunoglobulinas equinas (*anti-horse*). As membranas então foram reveladas e escaneadas. Cada linha representa o perfil de imunorreconhecimento individual de cada espécime utilizado, separado por espécie. As amostras foram analisadas em condições redutoras (com adição do agente 2-Mercaptoetanol) e não-redutoras. O marcador de massa molecular (BioRad) está na primeira linha de cada membrana.47

Figura 5 - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). As amostras de veneno foram incubadas (10 µg) em placas de 96 poços durante a noite. Depois as placas foram lavadas e incubadas com soro antibotrópico, em seguida com anticorpo contra

imunoglobulinas equinas (*anti-horse*) e então a reação foi revelada e realizada a leitura a 425 nm em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices). A figura mostra a absorvância das amostras de *B. erythromelas* (a), *B. leucurus* (b) e do pool de *B. jararaca* (c). Além disso, a figura também mostra a comparação da média das espécies de *B. erythromelas* e de *B. leucurus* (d). Foi realizado o teste t para análise estatística (GraphPad Prism v. 8.0.1) (* p < 0,0001).....499

Figura 6 - Atividade fosfolipásica das amostras de veneno. As amostras de venenos foram aplicadas (20 µg) em placas de 96 poços juntamente com o substrato sintético ácido 4-nitro-3-[octanoyloxy] benzoico (NOBA). A placa foi incubada a 37°C por 60 min e as leituras foram mensuradas por leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices).....511

Figura 7 - Atividade proteolítica das amostras de veneno sobre a azocaseína. As amostras de veneno (10 µg) foram incubadas com a azocaseína por 90 min a 37 °C. Depois desse período foi adicionado 200 µL de ácido tricloroacético (5%) e em seguida as amostras foram centrifugadas. A leitura do sobrenadante foi realizada em leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices). A atividade inibitória pelo soro antibotrópico foi realizada com a pré-incubação das amostras de veneno com o soro antibotrópico por 30 min a 37 °C. As legendas representam as amostras sem a ação do soro antibotrópico (Ven) e sob a ação do soro antibotrópico (Ven+SAB). A figura mostra a atividade proteolítica de *B. erythromelas* (a), *B. leucurus* (b), do pool de *B. jararaca* (c) e da comparação entre as médias de *B. erythromelas* e *B. leucurus* (d). Foi realizado o teste t para avaliar o potencial inibitório e a para a comparação entre as médias de *B. erythromelas* e *B. leucurus*. As diferenças de p < 0,0001 foram consideradas significativas e marcadas com *.....52

Figura 8 - Atividade de trombina-símile das amostras de veneno. Os venenos (5 µg) e a mistura veneno + soro antibotrópico (5 µg + 10 µL), foram aplicados em placas de 96 poços e incubados a 37 °C por 30 min. Em seguida foi adicionado o substrato cromogênico (S-2238), e incubados a 37 °C por 5 min. A leitura foi mensurada com o leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices). Os valores são expressos pela média das absorvâncias e seu desvio padrão. Foi realizada a análise pelo teste t para avaliar as diferenças apresentadas. A figura mostra a absorvância de *B. erythromelas* (a), *B. leucurus* (b), do pool de *B. jararaca* (c) e da comparação entre a média de *B.*

erythromelas e *B. leucurus* (d). As diferenças de $p < 0,0001$ foram consideradas significativas e marcadas com *.54

Figura 9 - Ativação de Fator X. As amostras de veneno (25 µg) e a mistura veneno + soro antibotrópico (25 µg + 5 µL) foram aplicados em placas de 96 poços e incubadas a 37°C por 30 min. Em seguida foi adicionado o substrato cromogênico (S-2765), CaCl₂ 10 mM e o Fator X bovino (Sigma). A placa então foi incubada a 37°C por 10 min e a leitura foi realizada em leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices). Os valores são expressos pela média das absorbâncias e seu desvio padrão. Foi realizada a análise pelo teste *t* para avaliar as diferenças apresentadas. A figura mostra a absorbância de *B. erythromelas* (a), *B. leucurus* (b), do pool de *B. jararaca* (c) e da comparação entre a média de *B. erythromelas* e *B. leucurus* (d). As diferenças de $p < 0,0001$ foram consideradas significativas e marcadas com *.55

Figura 10 - Atividade fibrinogenolítica dos pools de B. erythromelas, B. leucurus e B. jararaca. As amostras de veneno (ven), a mistura veneno + soro antibotrópico (ven+SAB) e a mistura veneno + EDTA (ven+EDTA) foram incubadas a 37°C por 2 min. Em seguida, foram adicionados à mistura 200µL de fibrinogênio humano (2 mg/mL) e incubados a 37°C. Alíquotas de 15 µL foram retiradas do ensaio em intervalos fixos de 5 min (t1), 30 min (t2) e 90 min (t3) e adicionadas ao tampão de amostra contendo o agente redutor 2-Mercaptoetanol. As amostras foram então analisadas por meio de SDS-PAGE (12%).57

Figura 11 - Determinação da Dose Pro-Coagulante 50% dos pools de veneno de B. erythromelas e B. leucurus. Foram analisadas 6 doses dos pools de venenos em equipamento de tromboelastometria (ROTEM), juntamente com o CaCl₂ (20 µL), o plasma humano (260 µL) e solução salina (quantidade suficiente para completar 360 µL). Os ensaios foram realizados pelo teste de ativação por contato (INTEM).....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade fibrinogenolítica das amostras de veneno. Escala de degradação das cadeias de fibrinogênio apresentada pela sigla das cadeias (alfa - α , beta - β e gama - γ) seguido pelo número, sendo 5 a cadeia menos degradada e 0 a cadeia completamente degradada.59

Tabela 2 - Dose Pro-Coagulante 50% (DP50) das amostras de veneno. Médias dos valores de DP50 expressos em ng/mL e seu respectivo desvio padrão. Ao final da coluna de Be (*B. erythromelas*) e Bl (*B. leucurus*), é apresentada a média dos indivíduos. As figuras referentes à definição da DE50 se encontram no Apêndice B.61

Tabela 3 - Dose Efetiva 50% das amostras de veneno. É apresentada a média dos valores da quantidade de soro antibotrópico (expressa em μL). Ao final da coluna de Be (*B. erythromelas*) e Bl (*B. leucurus*), é apresentada a média dos indivíduos. As figuras referentes à definição da DE50 se encontram no Apêndice C.63

LISTA DE SIGLAS

B. alternatus - *Bothrops alternatus*

B. erythromelas - *Bothrops erythromelas*

B. jararaca - *Bothrops jararaca*

B. jararacussu - *Bothrops jararacussu*

B. leucurus - *Bothrops leucurus*

B. moojeni - *Bothrops moojeni*

B. neuwiedi - *Bothrops neuwiedi*

Be - *Bothrops erythromelas*

Bj - *Bothrops jararaca*

Bl - *Bothrops leucurus*

BSA - Soroalbumina bovina

CaCl₂ - Cloreto de Cálcio

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

CFT - Tempo de formação da rede de fibrina

CT - Tempo de coagulação

CTL - Lectinas do tipo C

DE50 - Dose Efetiva 50%

DMC - Dose Mínima Coagulante

DP50 - Dose Pró-coagulante 50%

EDTA - Ácido Etilnodiamino Tetra-Acético

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

FX - Fator X

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

HCl - Ácido clorídrico

IDH - Índice de Desenvolvimento Humano

kDa - Quilo Dalton

mg - Miligrama

min - Minuto

mL - Mililitros

mM - Milimolar

Na₂CO₃ - Carbonato de sódio

NaCl - Cloreto de Sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

ng - Nano grama

nm - Nanômetros

NOBA - Ácido 4-nitro-3 [octanoyloxy] benzoico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PLA₂ - Fosfolipase A₂

PNAD - Pesquisa Nacional por Amostra Domiciliar

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance em Fase Reversa

SAB - Soro Antibotrópico

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de Poliacrilamida contendo SDS

SUS - Sistema Único de Saúde

SVMP - Metaloproteases

SVSP - Serinoproteases

TFA - Ácido trifluoroacético

U - Unidade

V - Volts

Ven - Veneno

μL – Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	32
2.1. <i>Objetivo geral</i>	32
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. <i>Material biológico (venenos e plasma)</i>	33
3.2. <i>Caracterização do perfil proteico das amostras de veneno.....</i>	33
3.2.1. <i>Dosagem de proteínas</i>	33
3.2.2. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....</i>	33
3.2.3. <i>Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....</i>	34
3.3. <i>Caracterização do perfil de imunorreconhecimento das amostras de veneno ...</i>	34
3.3.1. <i>Western blotting</i>	34
3.3.2. <i>ELISA</i>	35
3.4. <i>Determinação das atividades enzimáticas</i>	35
3.4.1. <i>Determinação da atividade enzimática de fosfolipases A₂.....</i>	35
3.4.2. <i>Atividade proteolítica sobre a azocaseína</i>	36
3.5. <i>Caracterização do perfil coagulotóxico.....</i>	36
3.5.1 <i>Atividade trombina-símile</i>	36
3.5.2. <i>Ativação do Fator X.....</i>	36
3.5.3. <i>Degradação do fibrinogênio</i>	37
3.5.4. <i>Tromboelastometria</i>	37
3.6. <i>Soroneutralização</i>	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. <i>Análise do perfil proteico das amostras de veneno</i>	39
4.2. <i>Análise de imunorreconhecimento das amostras de veneno pelo soro antibotrópico.....</i>	46
4.3. <i>Análise das atividades enzimáticas.....</i>	50
4.4. <i>Caracterização do perfil coagulotóxico.....</i>	53
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
APÊNDICES	85

1. INTRODUÇÃO

Um dos mecanismos mais fascinantes da evolução foi o surgimento de organismos peçonhentos. A técnica de envenenamento é muito eficiente para enfraquecer o adversário, seja ele predador ou presa. Existem cerca de 100.000 espécies diferentes de seres peçonhentos, que estão distribuídos em diversos filos, como cordados, equinodermas, moluscos, anelídeos, artrópodes e cnidários. Dentre esses animais, as peçonhas mais estudadas são as dos cordados, mais especificamente, das serpentes. A atenção maior que a comunidade científica atribui aos venenos de serpentes deve-se ao seu elevado risco contra a saúde humana (CALVETE, 2009).

Apesar de fascinantes, a picada por serpentes peçonhentas é um problema de saúde pública, sendo classificada como uma doença tropical negligenciada pela OMS (Organização mundial de Saúde) (WHO, 2023). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2023), em 2021 foram registrados 29.340 casos de acidentes ofídicos, que resultaram em 143 óbitos (dados mais recentes disponibilizados, em consulta realizada em 06 de fevereiro de 2023). O baixo número de óbitos, em comparação ao elevado número de acidentes, é resultado da eficácia da soroterapia, sendo este o único tratamento disponível para o envenenamento por animais peçonhentos (GUTIÉRREZ et al., 2017). Além disso, estima-se que no Brasil mais de 50% dos acidentes ofídicos sejam causados por serpentes não-peçonhentas (KASTURIRATNE et al., 2008).

Em território nacional, existem apenas quatro gêneros de serpentes peçonhentas medicamente importantes, que são as *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Dessas serpentes, a que mais causa acidentes são as serpentes do gênero *Bothrops*, com aproximadamente 90,5% dos acidentes em território brasileiro durante o ano (BRASIL, 2023). Esse elevado número de acidentes pode ser devido a ampla distribuição geográfica das espécies pertencentes a esse gênero, que pode se espalhar por quase todo o território brasileiro (CARDOSO et al., 2009).

Esses acidentes não ocorrem de forma igualitária por todo território brasileiro, a região do país com a maior incidência de acidentes ofídicos (número de casos/100.000 habitantes) é a Norte (48,8), seguida da Centro-Oeste (18,2), Nordeste (12,4), Sul (8,1) e Sudeste (6,2). Porém, o número de óbitos não segue esse padrão,

sendo a região Nordeste a primeira (com 40 óbitos), seguida da Norte (24), Sudeste (20), Centro-Oeste (12) e Sul (8) (BRASIL, 2023).

O envenenamento por picada de serpentes acomete principalmente pessoas que vivem em zonas rurais (WHO, 2023). De acordo com o PNAD (Pesquisa Nacional por Amostra Domiciliar) de 2015, 15,28% da população brasileira vive em zonas rurais, sendo no Nordeste a maior concentração de pessoas que vivem dessa maneira, representando que 26,88% da população nordestina pertence a área rurais (IBGE, 2015).

Observando o IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) das regiões do Brasil, o Nordeste apresenta o pior índice, com o valor médio de 0,659, sendo que nenhum estado nordestino apresenta valor maior que 0,7 (IBGE, 2010). Unindo esses fatores apresentados, é possível afirmar que o Nordeste é a região mais vulnerável a picadas de serpentes que podem evoluir para casos mais sérios, seguindo a definição apresentada pela OMS (WHO, 2023) e corroborando os dados apresentados acima provenientes do Ministério da Saúde (IBGE, 2015).

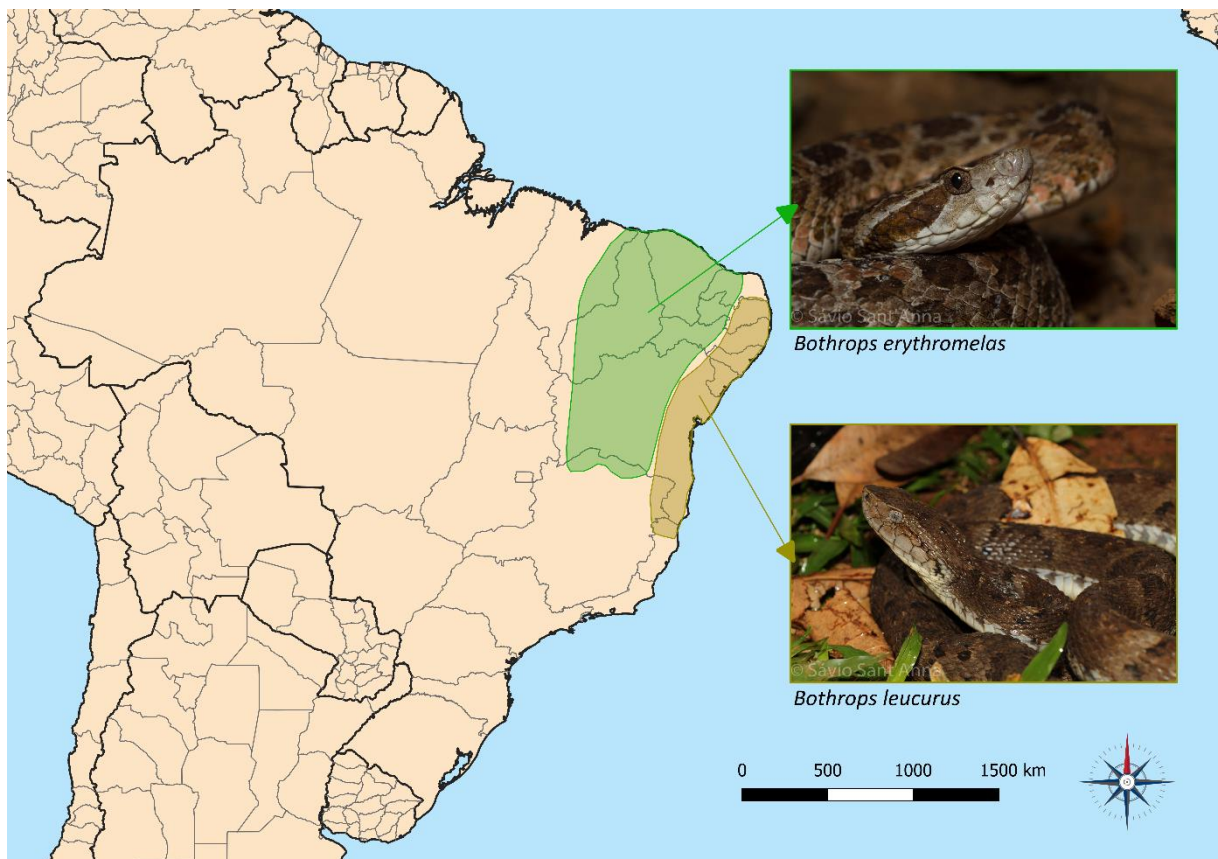
Apesar da OMS afirmar que o tratamento com o soro antiofídico é custoso, em território brasileiro ele é produzido por algumas instituições governamentais (Instituto Butantan em São Paulo, Instituto Vital Brazil no Rio de Janeiro, Fundação Ezequiel Dias em Minas Gerais e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos no Paraná) e amplamente distribuído de forma gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Atualmente o tratamento com soro antiofídico é o único tratamento para esse problema de saúde, por isso existe grande investigação para implementar e melhorar a eficácia do tratamento já existente (SANTOS-FILHO, 2012).

O soro antiofídico (utilizado para tratamento de acidentes causados por animais do gênero *Bothrops*) é feito a partir de um *pool* de venenos de 5 espécies desse gênero (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (INSTITUTO BUTANTAN, 2022), sendo que dessas 5 apenas as espécies *B. moojeni* e *B. neuwiedi* se distribuem pelo nordeste brasileiro (CARDOSO et al., 2009).

Porém, no Nordeste brasileiro também existem serpentes do gênero *Bothrops* que não estão contemplados no *pool* de venenos citado acima, que são as *B. erythromelas* e *B. leucurus* (Figura 1). As *B. erythromelas*, conhecidas também como jararaca-da-seca, ocupam as regiões da caatinga e possuem pequeno porte (cerca de 50 cm de comprimento). Já as *B. leucurus* ocupam as zonas de mata, desde a Paraíba até norte do Espírito Santo, e têm porte avantajado (chegando até 1,7 m de

comprimento). Esses fatores combinados levam a acreditar que a *B. leucurus* seja a espécie de serpente com maior importância médica do nordeste brasileiro (MELGAREJO, 2009).

Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica das serpentes. As manchas representam a distribuição de *B. erythromelas* (verde) e de *B. leucurus* (amarelo). Mapa confeccionado em programa QGis (v. 3.10.1) e as serpentes foram fotografadas pelo colaborador Dr. Sávio Sant'Anna.



As toxinas que compõem os venenos de serpentes são importantes para a digestão dos alimentos, uma vez que estes são ingeridos inteiros (CHIPPAUX et al., 1991; MEBS, 2001). As principais funções dessas toxinas são imobilizar, paralisar e matar a presa, para que a mesma possa ser ingerida de maneira segura (RICHARDS; BARLOW; WÜSTER, 2012). O estudo dos venenos de serpentes constitui uma área da pesquisa biomédica importante, principalmente em virtude de algumas de suas ações, tais como, neurotóxica, hemorrágica e em lesões tissulares (RAMÍREZ; FLETCHER; POSSANI, 1990).

O envenenamento causado pelas serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por dano tecidual local (como edema, hemorragia e necrose) e efeitos

sistêmicos, que resultam principalmente em distúrbios hemostáticos (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). Essas atividades fisiopatológicas são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente e uma única toxina pode apresentar diversas atividades (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

Acredita-se, no entanto, que os distúrbios hemostáticos causados pelos venenos de uma grande variedade de espécies de serpentes desempenhem um papel central na fisiopatologia do envenenamento e na captura da presa (SANTORO et al., 2008). Nesse sentido, a coagulotoxicidade de venenos ofídicos corresponde a um dos efeitos sistêmicos mais importantes, entretanto, é também o mais desafiador de ser estudado e caracterizado, devido à dificuldade inerente de trabalhar com cascatas enzimáticas sanguíneas (SOUSA et al., 2018).

Aproximadamente 90% do peso seco dos venenos são constituídos por proteínas que têm atividade enzimática (metaloproteases, serino proteases, L-aminoácido oxidases, fosfolipases e fosfodiesterases) ou que são desprovidas de atividade enzimática (desintegrinas, lectinas, miotoxinas, neurotoxinas, fatores de crescimento neural e endotelial, inibidores do tipo Kunitz, proteínas secretoras ricas em cisteína) (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; FRY, 2005; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; MARKLAND, 1998; NICOLAU et al., 2017; SERRANO et al., 2005). Apesar das funções de cada um destes componentes, bem como sua interação no envenenamento humano, ainda não estarem totalmente elucidadas (WARRELL, 1989), algumas famílias de proteínas são conhecidas por possuírem propriedades coagulantes.

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

Dentro da família de serinoproteases, existem as enzimas com atividade semelhante a trombina, conhecidas como *thrombin-like* ou trombina-símile. Essas enzimas agem diretamente sobre o fibrinogênio, causando a liberação das fibrinas, porém, o coágulo formado pela ação das trombina-símile é frouxo, uma vez que essas

enzimas não conseguem ativar o Fator XIII da cascata de coagulação (BRAUD; BON; WISNER, 2000), responsável pela estabilização do coágulo (SILVERTHORN, 2007).

As metaloproteases (SVMP) são enzimas que dependem de íons metálicos para serem ativadas. Metaloproteases de venenos de serpentes são associadas à hemorragia, à mionecrose, aos danos ao tecido epitelial e às reações que se manifestam na forma de inflamação ou edema (GOMES et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, as metaloproteases podem apresentar efeitos anti ou pró-coagulantes, pois podem hidrolisar o fibrinogênio de maneira inespecífica, inviabilizando a liberação de fibrinas, ou podem atuar ativando o Fator X da cascata de coagulação (CARDOSO et al., 2009; LATINOVIĆ et al., 2020).

As metaloproteases são divididas em 3 classes, as do tipo P-I, P-II e P-III. A classe P-I é caracterizada por conter apenas o domínio metaloprotease e, em geral, têm baixa massa molecular (20-30 kDa); a classe P-II inclui um domínio desintegrina, que pode se desligar do complexo, gerando desintegrinas que inibem a agregação plaquetária, e sua massa molecular pode variar de 30-60 kDa; as metaloproteases P-III têm alta massa molecular (60-100 kDa), são as mais hemorrágicas desta família de proteínas e contêm, além dos domínios metaloprotease e desintegrina, domínios ricos em cisteína. A classe P-III subdivide-se em P-IIIa, a metaloprotease P-III em sua forma monomérica sem ter sofrido modificações pós-traducionais, P-IIIb, formada após o processo de proteólise entre os domínios desintegrina e rico em cisteína, P-IIIc, esta enzima em sua forma dimérica, e P-IIId, contendo dois domínios extra de lectina tipo C (FOX; SERRANO, 2008; KANG et al., 2011; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são consideradas uma superfamília de enzimas com diversos grupos e subgrupos (I a XVI), que hidrolisam especificamente a ligação éster sn-2 de fosfolipídios produzindo lisofosfolipídios e ácidos graxos. De acordo com sua estrutura primária e padrão das pontes dissulfeto, as PLA₂ dos venenos de serpentes são classificadas em grupo I, predominantes em venenos de elapídeos, e grupo II, mais comuns nos viperídeos (SIX; DENNIS, 2000). As PLA₂ do grupo II, por sua vez, podem ser classificadas em função do tipo de aminoácido presente na posição 49 do sítio catalítico (SOARES; GIGLIO, 2003). As PLA₂ cataliticamente ativas possuem um ácido aspártico na posição 49, quando esse aminoácido é substituído, geralmente, por uma lisina, apresentam nenhuma atividade catalítica (KINI, 2003).

As PLA₂ exercem uma variedade de efeitos tóxicos e farmacológicos que incluem ação neurotóxica, miotóxica, hemolítica, edematogênica, pró-inflamatória,

hipotensiva, pró ou antiagregante plaquetária, anticoagulante e citotóxica (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). A sua ação anticoagulante está relacionada a sua capacidade de degradar os fosfolípidos necessários para a formação dos complexos tenase e protrombinase e por sua capacidade de ligação com o Fator Xa, causando sua inibição (KINI, 2003).

Desde a década de 80, a maneira mais utilizada de avaliar a atividade coagulante dos venenos de serpentes é por meio da determinação de sua “Dose Mínima Coagulante” (DMC), definida por Theakston e Reid (1983) como a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de fibrinogênio ou plasma citratado em 60 segundos a 37 °C.

Apesar de muito utilizada em todo o mundo e, por se tratar de uma metodologia padronizada há décadas, permitir a comparação de resultados gerados por diferentes grupos de pesquisa, o único parâmetro avaliado na DMC é o tempo de coagulação. Quando determinada utilizando plasma citratado, não é possível identificar em qual enzima específica da cascata de coagulação o veneno em estudo está agindo. Por outro lado, quando determinada utilizando o fibrinogênio isolado, apesar de sabermos o substrato das toxinas do veneno, não sabemos o padrão de clivagem do mesmo.

Uma nova abordagem para caracterizar a coagulotoxicidade dos venenos de serpentes foi estabelecida e está sendo empregada para caracterizar esse aspecto do envenenamento em diferentes espécies de serpentes (DEBONO et al., 2019b, 2019a, 2019c; SOUSA et al., 2018; YOUNGMAN et al., 2019). Essa nova abordagem avalia não apenas o tempo de coagulação como *end point*, mas também a velocidade de sua formação e sua resistência. Ainda, avalia a atividade dos venenos sobre componentes específicos do sistema hemostático e sua dependência do cálcio e de fosfolípidos. Esses parâmetros permitem a caracterização de variações inter- e intraespecíficas relacionadas à atividade coagulante (ou anticoagulante) dos venenos de serpentes, mesmo que sutis.

Apesar das evidências venômicas indicarem que os venenos de serpentes são compostos por um número limitado de famílias de toxinas (predominantemente metaloproteases, serinoproteases e fosfolípases A₂), ainda existe certa preocupação a respeito da eficiência dos soros antiveneno no tratamento de envenenamentos envolvendo espécies de serpentes cujo veneno não é incluído no *pool* de venenos utilizado para a imunização dos cavalos para a produção do soro antiveneno (SOUSA et al., 2018). Conseqüentemente, como a composição dos venenos varia

consideravelmente entre espécies e entre populações de uma mesma espécie, a eficácia do antiveneno também pode variar em função das variações intra- e interespecíficas (AMAZONAS et al., 2018; LOMONTE et al., 2014; ROGALSKI et al., 2017).

Tendo em vista a relevância das espécies para a saúde pública, a não contemplação das espécies que compõem o *pool* de veneno para a produção do soro antribotrópico e o alto número de óbitos da região Nordeste, a realização de um estudo a fim de caracterizar o perfil coagulotóxico dos venenos de *B. erythromelas* e *B. leucurus* e sua neutralização pelo o antiveneno produzido é de extrema importância.

2. OBJETIVOS

Para a realização do trabalho, foram adotados os seguintes objetivos.

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o perfil coagulotóxico de duas espécies de serpente do nordeste brasileiro, a *Bothrops erythromelas* e a *Bothrops leucurus*, e avaliar o potencial neutralizante do soro antitoxico em relação à atividade coagulotóxica dessas duas espécies.

2.2. Objetivos específicos

Para a realização desse trabalho, foram realizados os seguintes objetivos específicos:

- Caracterização do perfil proteico das amostras de veneno;
- Caracterização do perfil de imurreconhecimento das amostras de veneno pelo soro antitoxico;
- Análise das atividades enzimáticas das amostras de veneno e sua neutralização pelo soro antitoxico;
- Análise sobre fatores da cascata de coagulação das amostras de veneno e sua neutralização pelo soro antitoxico;
- Determinação da Dose Pró-Coagulante 50% das amostras de veneno;
- Determinação da Dose Efetiva 50% da atividade coagulante das amostras de veneno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A fim de cumprir os objetivos listados acima, foram realizadas as seguintes metodologias.

3.1. *Material biológico (venenos e plasma)*

Os venenos foram extraídos de espécimes de *B. erythromelas* e *B. leucurus* mantidos em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Os mesmos foram obtidos por meio da extração manual conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB). Após a extração, os venenos foram centrifugados a 2000 x g por 15 min a 4 °C, liofilizados e armazenados a -20 °C até o momento da análise.

O plasma humano foi coletado de doadores saudáveis, sem problemas de coagulação pré-existente, mediante aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (CAAE 43560620.0.0000.5493). Foram utilizados sistemas de coleta de sangue a vácuo, composto com *vacutainer* e tubo tratado com tampão citrato trissódico (3,2%). O plasma humano foi obtido após centrifugação a 3000 x g durante 20 min a 24 °C. As amostras de plasma foram mantidas a - 80°C.

3.2. *Caracterização do perfil proteico das amostras de veneno*

Para a caracterização do perfil proteico das amostras de veneno, foram realizados testes de dosagem de proteínas, eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e cromatografia líquida de alta performance.

3.2.1. *Dosagem de proteínas*

Um mg de veneno liofilizado foi ressuspendido em 1 mL de solução salina 0,85% e o conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente BioRad Protein Assay (BioRad). A determinação da concentração de proteínas foi realizada por meio de uma curva-padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) como padrão.

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

O perfil proteico dos venenos foi analisado por meio de SDS-PAGE. As amostras dos venenos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a

15%, de acordo com Laemmli (1970). Por canaleta, foram aplicados 20 µg de proteína. Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Coomassie G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

3.2.3. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

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

3.3. Caracterização do perfil de imunorreconhecimento das amostras de veneno

Para caracterizar o perfil de imunorreconhecimento das amostras, os venenos foram submetidos a ensaios de *Western blotting* e ELISA.

3.3.1. *Western blotting*

Os venenos foram submetidos a SDS-PAGE 15% (conforme item 3.2.2. deste trabalho) e em seguida as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-P, GE Healthcare) em sistema de transferência Semi-Dry (GE Healthcare) por 35 min com voltagem constante (20 V). As membranas foram então incubadas com solução bloqueadora (leite desnatado em pó 5%) contendo Tween 20 0,1% por 15 horas a 4°C. Em seguida, as mesmas foram incubadas com o soro antibotrópico (lote: 190177-08/22) (1:2.000 v/v) em solução bloqueadora por 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG equino conjugada com peroxidase) (Sigma) diluído 1:5.000 por 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi revelada adicionando-se substrato cromogênico, composto por 3,3'-diaminobenzidina (tetra-hidrocloro), tampão

imidazol 0,1 M, CoCl_2 0,2 M e H_2O_2 30%. A reação foi interrompida pela adição de água corrente (HARLOW, 1989).

3.3.2. ELISA

Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 20 μg dos venenos em estudo (100 μL) por 15 horas a 4°C. As placas foram então bloqueadas com 200 μL de tampão carbonato (Na_2CO_3 34 mM e NaHCO_3 15 mM) contendo soroalbumina bovina 3% por 1 hora a 37°C. Em seguida, foi aplicada uma diluição seriada do soro antibotrópico (lote: 190177-08/22) em tampão de incubação leite desnatado em pó 1% Tween 20 0,05% diluído em PBS pH 7,4 (100 μL /poço) e incubada novamente por 1 hora a 37 °C em câmara úmida. Em seguida, as placas foram incubadas com o segundo anticorpo (anti-IgG equino conjugado com peroxidase) (1: 10.000) (100 μL). Após 1 hora a 37°C, a reação foi revelada pela adição de 100 μL da mistura cromógena e substrato da enzima (1 mg de orto-fenilenodiamino/mL em tampão citrato de sódio 0,2 M pH 5,0, contendo 0,01% de H_2O_2). A reação foi interrompida após 5 min pela adição de 50 μL de H_2SO_4 30% e a leitura da absorbância a 492 nm foi realizada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices) (HARLOW, 1989).

3.4. Determinação das atividades enzimáticas

A fim de determinar as atividades enzimáticas que podem possuir influência sobre a cascata de coagulação, foram avaliadas duas atividades, a atividade de fosfolipases A_2 e atividade proteolítica sobre a azocaseína.

3.4.1. Determinação da atividade enzimática de fosfolipases A_2

A atividade fosfolipásica foi determinada de acordo com Holzer e Mackessy (1996). Em placas de microtitulação, 20 μg de veneno ressuspenso em solução salina 0,85% (20 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 20 min a 37 °C. A absorbância da reação foi mensurada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices) utilizando-se o comprimento de onda de 425 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de veneno que causa a liberação de 25,8 nM de cromóforo. 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 unidades por miligrama de proteína por minuto (U/mg/min). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.2. Atividade proteolítica sobre a azocaseína

A atividade proteolítica sobre a azocaseína foi determinada conforme descrito por Antunes e colaboradores (2010), com modificações. Em um microtubo foram adicionados 10 μ L de solução de veneno (1 mg/mL) e 85 μ L de uma solução de azocaseína 4,25 mg/mL (Sigma) solubilizada em solução tampão Tris-HCl 100 mM CaCl_2 10 mM pH 8,8. A mistura foi incubada por 90 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1700 x g por 5 min a 4 °C e a absorbância dos sobrenadantes com adição e 100 μ L de NaOH 0,5M foi mensurada em leitor de placas 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 a 450 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por miligramas de proteína (U/min/mg).

3.5. Caracterização do perfil coagulotóxico

A fim de caracterizar o perfil coagulotóxico das amostras de veneno, foram realizados testes de atividade de trombina-símile, ativação de fator X, degradação do fibrinogênio e a tromboelastometria.

3.5.1 Atividade trombina-símile

A atividade amidolítica direta das amostras de veneno sobre o substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix), específico para trombina, foi avaliada de acordo com as recomendações do fabricante. Para este ensaio, 5 μ L de veneno (1 mg/mL, em solução salina 0,85%) foram adicionados a 10 μ L do substrato cromogênico S-2238 (H-D- Phe-PIP-Arg-pNA·2HCl) (5,6 mM) e 90 μ L de tampão Tris 50 mM pH 7,4 e a reação foi monitorada a 405 nm por 5 min a 37 °C.

3.5.2. Ativação do Fator X

A capacidade de ativação do FX foi avaliada utilizando o substrato cromogênico S-2765 (N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg- pNA 2HCl) (Chromogenix), específico para FX ativado (FXa), de acordo as recomendações do fabricante. Para este ensaio, a reação foi composta por 25 μ L de veneno (1 mg/mL, em solução salina 0,9%), 2,5 μ L de FX (8

$\mu\text{g/mL}$) (Haematological Technologies), 10 μL de CaCl_2 10 mM, e tampão Tris 50 mM pH 7,4. A hidrólise do substrato cromogênico S-2765 foi monitorada a 405 nm por 10 min a 37 °C. A ação direta das amostras sobre o substrato foi monitorada a 405 nm, por 10 min, pela incubação das mesmas a 37 °C, na ausência de FX.

3.5.3. Degradação do fibrinogênio

A clivagem específica do fibrinogênio pelos venenos foi determinada conforme descrito por Peichoto e seus colaboradores (2007), com algumas modificações. Duzentos microlitros de fibrinogênio bovino (2 mg/mL) foram incubados com 10 μg de veneno a 37 °C. Em intervalos fixos de tempo (5 min, 30 min e 90 min), alíquotas foram retiradas dessa mistura e desnaturadas e reduzidas por meio de fervura por 7 min em tampão desnaturante para SDS-PAGE (SDS 4%, glicerol 20% e β -mercaptoethanol 20%). Em seguida as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 12% (item 3.2.2) e os géis foram corados utilizando-se Coomassie G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

Para avaliar a degradação do fibrinogênio, os géis foram submetidos à análise por densitometria pelo programa Gel Analyzer (v. 19.1). A densidade das bandas das três cadeias do fibrinogênio de uma amostra controle foi mensurada e considerada como 100%. Foi então criada uma escala de degradação das cadeias do fibrinogênio, sendo o nível 5 correspondente a bandas com intensidade de 100%, nível 4 com intensidade entre 99 e 75%, nível 3 entre 74 e 50%, nível 2 entre 49 e 25%, nível 1 entre 24 e 1% e nível 0 com cadeia totalmente clivada.

Adicionalmente, também foram realizados testes do potencial de neutralização pelo soro antibotrópico e pelo EDTA 0,5 M (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras de venenos foram pré-incubadas com soro antibotrópico ou com EDTA 0,5 M (5 μL) por 2 min a 37 °C. Após esse período, a mistura foi adicionada ao fibrinogênio bovino (200 μL) e o teste seguiu como descrito acima.

3.5.4. Tromboelastometria

Os ensaios de coagulação com as amostras de veneno foram realizados seguindo os protocolos descritos por Prezoto e seus colaboradores (2018) e Whiting e Dinardo (2014), com modificações. O parâmetro de tempo de início da cascata de coagulação (CT) do perfil ROTE foi avaliado em um sistema de quatro canais (Pentapharm) a 37 °C, de acordo com as instruções do fabricante para o método

ROTEM com ativação da via intrínseca da coagulação (ensaio INTEM). O ensaio foi finalizado após a formação da rede de fibrina (CFT).

Para a determinação da Dose Pró-Coagulante 50% (DP50) (definida como a menor dose de veneno capaz de diminuir o tempo de coagulação do plasma humano calcificado pela metade do seu tempo de recalcificação), quantidades crescentes de veneno foram diluídas em solução salina 0,9% (NaCl) (60 µL) e adicionados a uma solução de CaCl₂ 200 mM (20 µL) e plasma humano (260 µL). O parâmetro utilizado para a determinação da DP50 foi o início da cascata de coagulação (CT).

Para a determinação da Dose Efetiva 50% (DE50) (definida como a quantidade de soro necessária para prolongar o tempo de coagulação até a metade do intervalo entre a DP50 e o tempo de recalcificação do plasma humano), foram utilizadas as DP50 de cada veneno e foram adicionadas doses fixas (0,05 µL, 0,1 µL e 0,5 µL) do soro antibotrópico (lote: 190177-08/22). O parâmetro utilizado para a determinação da DE50 foi o início da cascata de coagulação (CT).

3.6. Soroneutralização

Como descrito anteriormente, o soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan é resultado da hiperimunização de cavalos com um *pool* de venenos de 5 espécies do gênero *Bothrops*, sendo *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12,5%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%). O antiveneno é composto por fragmentos solúveis de IgG F(ab')₂ e a potência determinada pelo fabricante é: 1 mL de soro antibotrópico neutraliza pelo menos 5 mg do veneno botrópico de referência nacional (INSTITUTO BUTANTAN, 2022).

A soroneutralização foi avaliada nos ensaios de atividade proteolítica sobre a azocaseína (item 3.4.1), atividade de trombina-símile (item 3.5.1), ativação de Fator X (3.5.2) e degradação do fibrinogênio (item 3.5.3). Na maioria dos ensaios, os venenos foram pré-incubados com o soro antibotrópico (a 37 °C por 2 min), utilizando a proporção indicada pelo fabricante (sendo 1 mL de soro para 5 mg de veneno (INSTITUTO BUTANTAN, 2022)). No ensaio de atividade de trombina-símile foi utilizada uma dose dez vezes maior do que a recomendada pelo fabricante (10 mL de soro para 5 mg de veneno), determinada por meio de ensaio piloto.

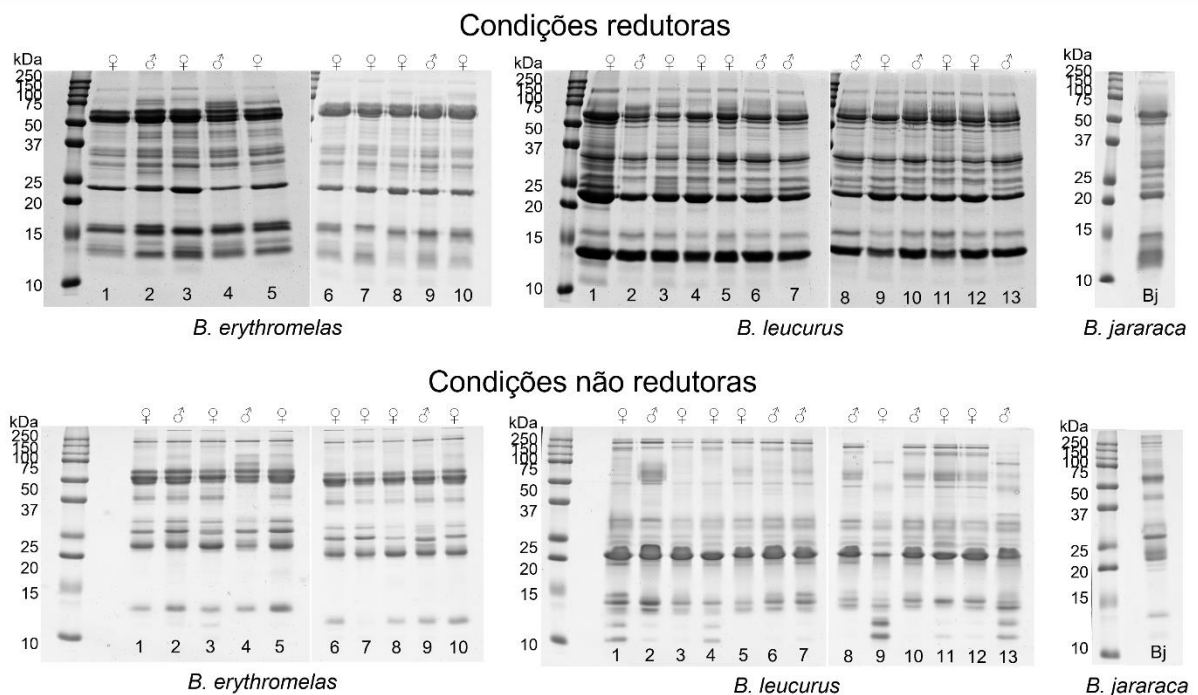
4. RESULTADOS

Para maior praticidade, as espécies estudadas aqui são representadas por siglas, sendo *B. erythromelas* as Be, *B. leucurus* as Bl e *B. jararaca* a Bj.

4.1. Análise do perfil proteico das amostras de veneno

Para avaliar o teor proteico das amostras utilizadas para este estudo foram realizados testes de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (Figura 2) e cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) (Figura 3). Esses resultados foram depois comparados com dados da literatura (ver item 5 desse trabalho).

Figura 2 - Perfil proteico das amostras de veneno em eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (15%). Foram aplicados 20 µg de proteína de veneno por canaleta. Cada linha representa o perfil proteico individual de cada espécime utilizado, separado por espécie. As amostras foram analisadas em condições redutoras (com adição do agente 2-Mercaptoetanol) e não redutoras. O marcador de massa molecular (BioRad) está na primeira linha de cada gel.



Os perfis proteicos evidenciados na figura 2 por SDS-PAGE apresentaram algumas diferenças, como variações intra e interespecíficas. Em relação aos géis de amostras em condições redutoras, observou-se pouca variação individual, sendo elas em grande maioria com relação a diferenças de intensidade de bandas.

Porém, alguns pontos merecem atenção, como o indivíduo 2 de Be que apresenta duas bandas, uma entre 25 e 37 kDa e a outra entre 10 e 15 kDa, ambas são mais evidentes nesse indivíduo sendo que elas são pouco perceptíveis nas demais amostras de veneno desta espécie. Já em Bl os indivíduos 3, 4, 11 e 12 apresentam maior quantidade de bandas entre 37 e 50 kDa do que os demais.

Apesar dessa baixa variação individual apresentada nos géis sob condições redutoras, o perfil eletroforético apresentou variações em relação às espécies estudadas. Na região entre 10 e 15 kDa as amostras de Be apresentam maior riqueza no número de bandas com relação às amostras de Bl, porém as amostras de Bl apresentam uma banda mais intensa nessa mesma região quando comparadas às amostras de Be. Já na região entre 25 e 37 kDa as amostras de Bl apresentaram maior riqueza de bandas do que as Be. A região entre 50 e 75 kDa é de grande intensidade nas amostras de Be e o mesmo não é observado em Bl.

O perfil apresentado pelo *pool* de venenos de Bj mostrou um perfil “intermediário” mostrando semelhanças tanto com Be quanto com Bl. Por exemplo, o veneno de Bj mostra uma intensidade semelhante às Be na região entre 50 e 75 kDa, porém na região entre 10 e 15 kDa a intensidade das bandas apresenta maior similaridade com Bl.

Já nos géis de amostras sob condições não redutoras as variações individuais são mais acentuadas quando comparadas com os géis sob condições redutoras. No caso das amostras de Be as diferenças foram poucas, apenas nas amostras 4 e 7. Essas não apresentam bandas que os demais indivíduos da sua espécie comumente apresentam. Na amostra 4 é evidente a ausência de uma banda na região entre 37 e 50 kDa, já na amostra 7 a ausência de banda é evidenciada na região entre 10 e 15 kDa.

Além disso, as amostras de Bl mostraram maior variação intraespecífica nesse ensaio em questão. Podemos observar 3 padrões de variações, sendo o primeiro o caso das amostras 9 e 13 que apresentam uma diminuição da intensidade da banda entre 20 e 25 kDa, um aumento significativo da intensidade de bandas entre 10 e 15 kDa e uma queda na intensidade e abundância de bandas na região de alta massa molecular (entre 150 a 250 kDa).

O segundo padrão é apresentado nos indivíduos 1 e 4, pois esses apresentam perfis similares aos demais indivíduos (com exceção das amostras 9 e 13) porém também apresentam bandas com alta intensidade na região entre 10 e 15 kDa. O

terceiro padrão é apresentado nos indivíduos 2, 3, 7, 11 e 12, com perfis similares aos demais e baixa intensidade das bandas entre 10 e 15 kDa.

Assim como nos géis em condições redutoras, os géis não reduzidos também mostraram padrões de variações interespecífico. Enquanto nas amostras de Be é evidente que as bandas de maior intensidade se encontram na região entre 50 e 75 kDa as amostras de Bl mostram que a banda mais intensa fica na região entre 20 e 25 kDa. Além disso, ambas espécies apresentam mais algumas diferenciações entre elas. As Bl possuem uma riqueza maior de bandas nas regiões entre 10 e 15 kDa e entre 20 a 37 kDa quando comparado com amostras de Be.

Diferentemente do encontrado no gel sob condições redutoras, no gel de amostras não reduzidas o *pool* de veneno de Bj mostrou maior similaridade com amostras de Be do que com amostras de Bl. Porém é evidente que as amostras de Be possuem maior intensidade das bandas na região entre 37 e 50 kDa quando comparadas ao *pool* de Bj.

As amostras de veneno também foram analisadas por meio de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC), e os perfis cromatográficos são apresentados na figura 3. Assim como nos géis apresentados na figura 2, aqui também é possível observar variações intra e interespecíficas.

Figura 3 - Perfil cromatográfico das amostras de veneno. As amostras de veneno foram aplicadas (75µg) em equipamento Jasco para análise de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) em coluna C18 (Teknokroma) e a leitura foi mensurada em A415nm. As legendas das figuras são apresentadas com a sigla de cada espécie (Be - *B. erythromelas*, Bl - *B. leucurus* e Bj - *B. jararaca*) acompanhada da sua numeração. As amostras foram eluídas por meio de um gradiente descontínuo de acetonitrila 99,9% contendo TFA 0,1% (solução B) (representado pela linha tracejada).

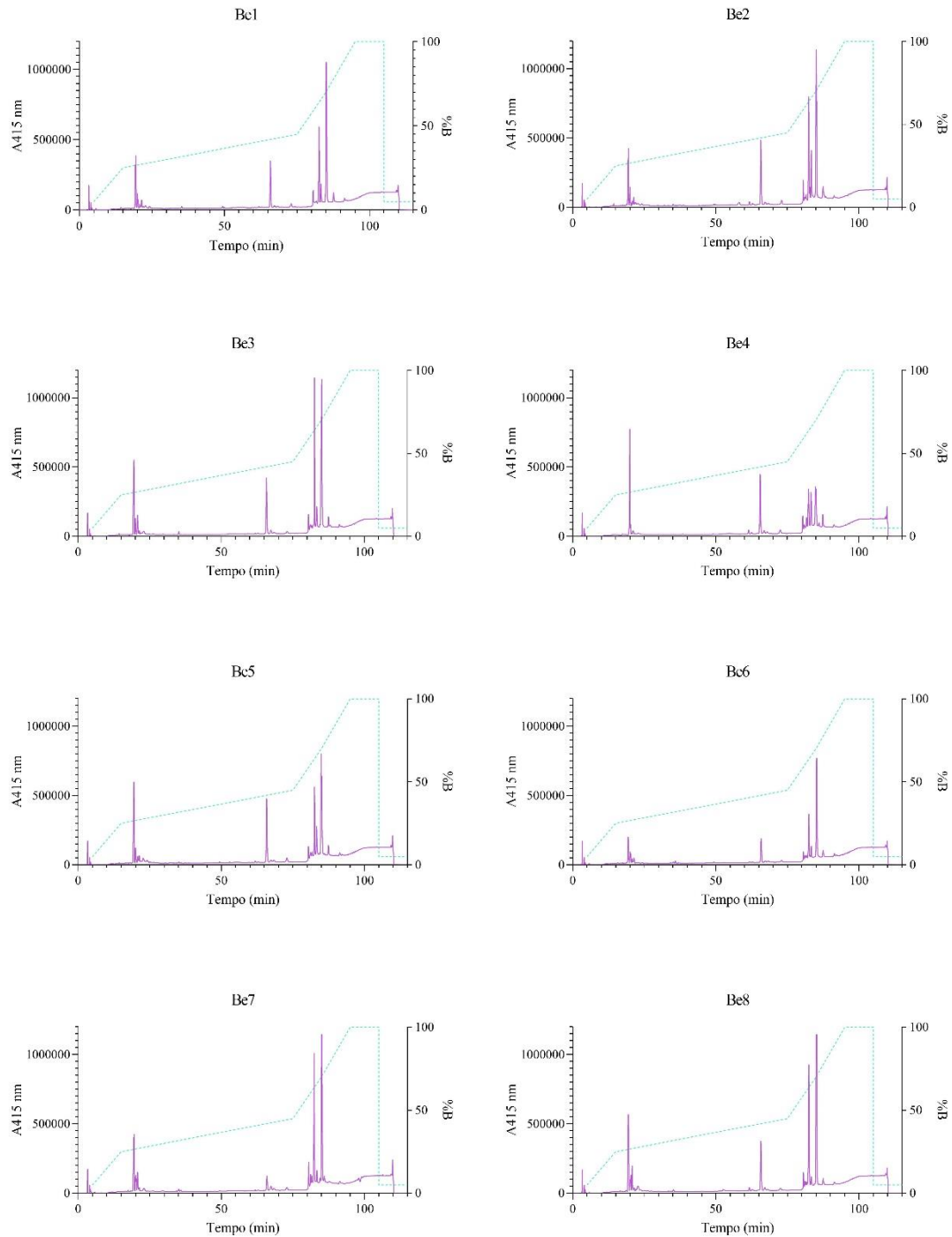


Figura 3 - Continuação.

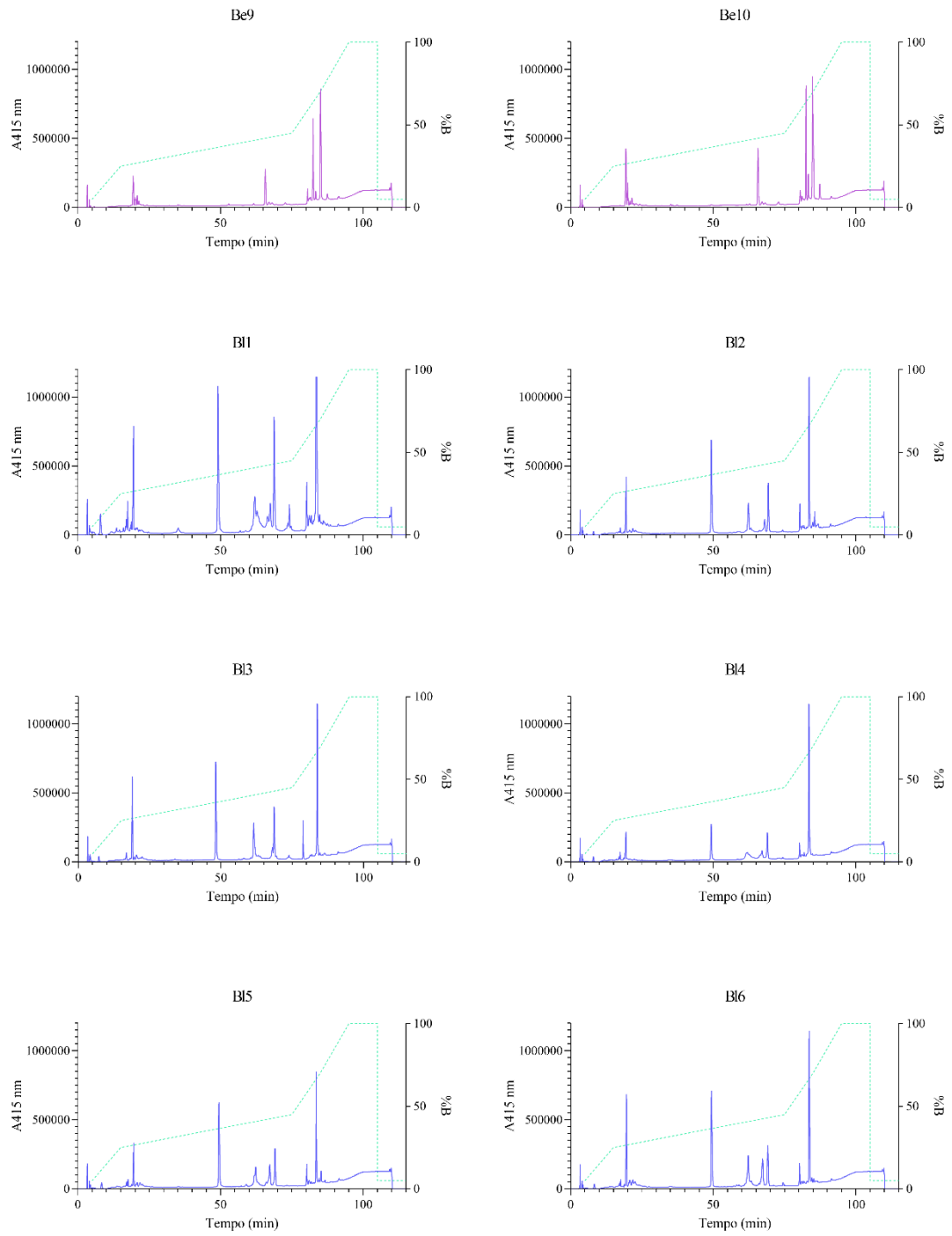
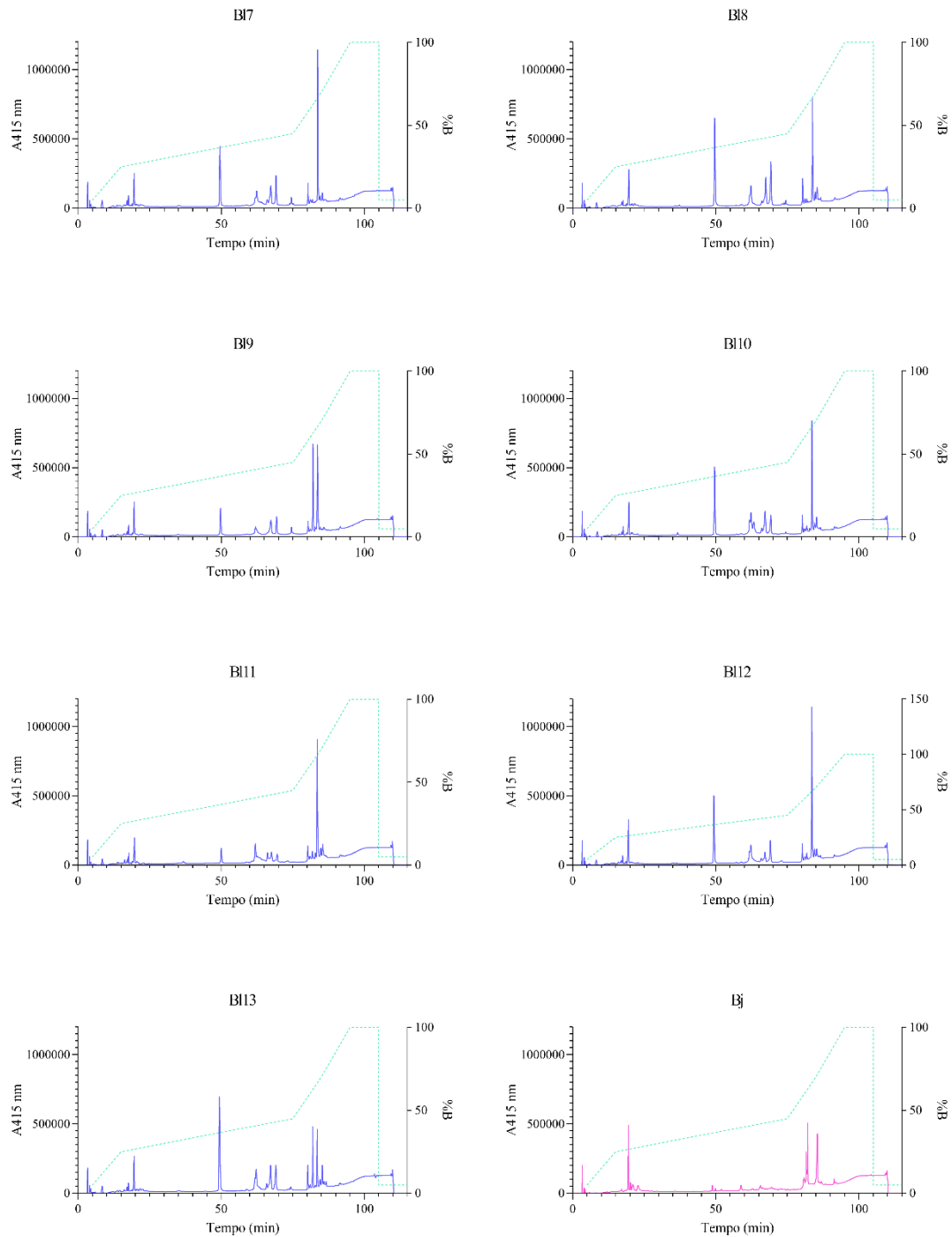


Figura 3 - Continuação.



Para realizar a análise dos perfis cromatográficos, os picos foram didaticamente organizados em grupos. O primeiro grupo compreende o intervalo entre 10 e 30 min de eluição, o segundo grupo compreende o intervalo entre 40 e 75 min e o terceiro grupo entre 80 e 100 min.

De modo geral, as amostras de BI se mostraram mais ricas em relação ao número de picos apresentados em seu cromatograma quando comparadas com as amostras de Be. Observando os picos provenientes do segundo grupo, podemos observar que as amostras de Be apresentam apenas um pico, por volta dos 65 min, enquanto as amostras de BI apresentam 4 picos nessa região, com alta intensidade. Por outro lado, observando o terceiro grupo podemos observar que as amostras de Be apresentam mais de 6 picos nessa região, sendo que dois deles apresentam leituras altas (leitura > 500.000 A415 nm) (exceto pelo indivíduo Be4), enquanto as amostras de BI apresentam menos que 6 picos e apenas um deles mostra leituras altas (exceto o indivíduo BI9).

Além das variações interespecíficas apresentadas acima, as amostras de veneno também mostraram variações ao nível individual. Observando o primeiro grupo podemos notar que os indivíduos Be3, Be4, Be5, BI1, BI3 e BI6 apresentam picos mais intensos nessa região quando comparados com outros indivíduos de mesma espécie. O oposto ocorre com as amostras Be6 e Be9 que apresentam picos menos intensos que as demais amostras utilizadas.

Além disso, também foram observadas diferenças no segundo grupo pois as amostras Be6, Be7, BI9 e BI11 apresentaram picos menos intensos quando comparados com outras amostras (leitura < 25.000 A415 nm). Podemos observar também que a amostra Be7 possui o pico nessa região ainda menor do que a amostra Be6. Também existem diferenças na variação entre BI9 e BI11, pois mesmo que menos intenso que as demais amostras, o indivíduo BI9 apresenta o primeiro pico (\cong 50 min) do segundo grupo maior que os demais, entretanto isso não ocorre com o indivíduo BI11, pois o primeiro pico desse grupo é menos intenso do que o segundo (\cong 62 min).

Assim como nos demais grupos, analisando o terceiro grupo de picos cromatográficos ainda é possível observar variações individuais. O indivíduo Be4 apresenta nessa região picos menos intensos quando comparados com outras amostras, além disso, o valor de leitura do pico apresentado no segundo grupo (\cong 65 min) é maior do que as dos picos apresentados no terceiro grupo, diferindo assim do padrão apresentado pelos demais indivíduos de sua espécie. Outros indivíduos que apresentaram diferenças foram dos BI9 e BI13, pois esses apresentam 2 picos de igual intensidade nessa região, divergindo também do padrão das amostras que pertencem a essa espécie.

Analisando, por fim, o cromatograma do *pool* de Bj podemos observar semelhanças, tanto em relação as amostras de Be quanto as amostras de BI. No primeiro grupo, em Bj, podemos observar que o primeiro pico é mais intenso, seguido de picos menores, o que se assemelha ao padrão encontrado em Be. No segundo grupo, podemos observar número de picos maior do que apresentado por BI, porém de menor intensidade. Já no terceiro grupo, podemos observar uma riqueza de picos menor do que encontrado em BI, porém com dois picos mais evidentes, se assemelhando mais ao padrão apresentado por Be.

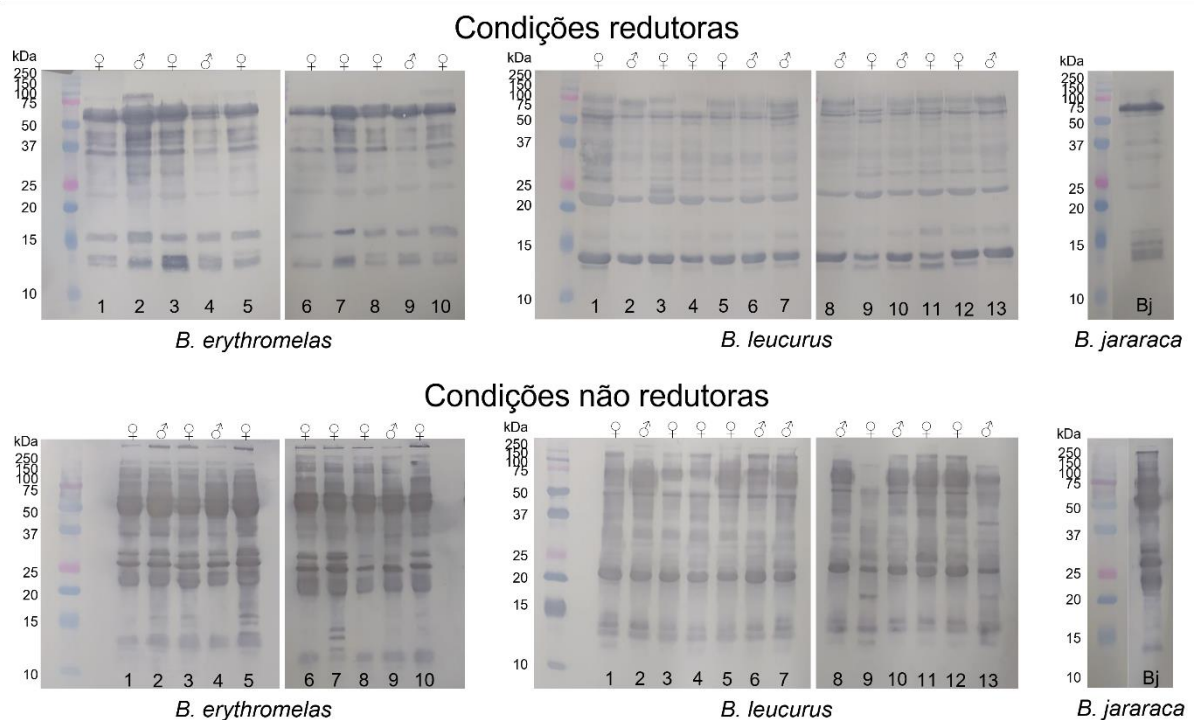
Resumidamente, as amostras tanto de Be quanto de BI apresentam diferenças entre elas, e cada um apresenta um padrão para a sua espécie, com algumas variações individuais. Como por exemplo, o pico eluído em 50 min, presente em BI (no *pool* de Bj com baixa intensidade) e completamente ausente em Be.

4.2. Análise de imunorreconhecimento das amostras de veneno pelo soro antibotrópico

A fim de avaliar o potencial de imunorreconhecimento do soro antibotrópico, as amostras utilizadas foram submetidas a testes de *Western blotting* (Figura 4) e ELISA (Figura 5). Novamente, foi utilizado um *pool* de veneno de Bj como referência.

Os padrões do perfil proteico de Be e BI observados em SDS-PAGE (Figura 2) continuam similares nas membranas de *Western blotting* (Figura 4), pois este ensaio evidencia que a região com maior intensidade é entre 50 e 75 kDa em amostras em condições redutoras e não redutoras de Be, enquanto em BI a região com maior intensidade é entre 10 e 15 kDa em amostras em condições redutoras e na região de proteínas maiores que 50 kDa em amostras em condições não redutoras.

Figura 4 - Western blotting das amostras de veneno. Foram aplicados 20 µg de proteína de veneno por canaleta em um gel de poliacrilamida contendo SDS (15%). Logo após a corrida as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, incubadas com o soro antibotrópico e em seguida com um anticorpo contra imunoglobulinas equinas (*anti-horse*). As membranas então foram reveladas e escaneadas. Cada linha representa o perfil de imunorreconhecimento individual de cada espécime utilizado, separado por espécie. As amostras foram analisadas em condições redutoras (com adição do agente 2-Mercaptoetanol) e não redutoras. O marcador de massa molecular (BioRad) está na primeira linha de cada membrana.



Em membranas com amostras em condições redutoras, a região entre 37 e 50 kDa foi melhor reconhecida no veneno de Be do que de BI, dando ênfase aos indivíduos 2, 3, 5 e 7 de Be. Já na região entre 10 e 15 kDa é possível observar duas bandas evidentes em Be, porém apenas uma em BI (com exceção dos indivíduos 9 e 11), sendo essa a mais intensa em amostras dessa espécie. Os indivíduos 9 e 11 de BI apresentam duas bandas por volta de 14 kDa que, curiosamente, são pouco visíveis nos géis de SDS-PAGE (Figura 2).

Já na região entre 20 e 25 kDa podemos observar uma banda evidente nas amostras de BI, diferente do encontrado em Be. O indivíduo 3 de BI ainda apresenta duas bandas nessa região. Logo acima, a região entre 25 e 37 é pouco reconhecida pelo soro antibotrópico, mostrando aqui bandas de baixa intensidade. Sabe-se que

essa é uma região rica em proteínas, pois em SDS-PAGE (Figura 2) é possível observar diversas bandas, principalmente em amostras de veneno de BI.

Destaca-se que nas membranas das amostras em condições não redutoras houve um melhor reconhecimento das proteínas dos venenos quando comparado as amostras sob condições redutoras. Com base no padrão de bandas observado na análise de SDS-PAGE (Figura 2), podemos notar que as proteínas com massa molecular maior que 20 kDa são melhor reconhecidas em Be do que em BI.

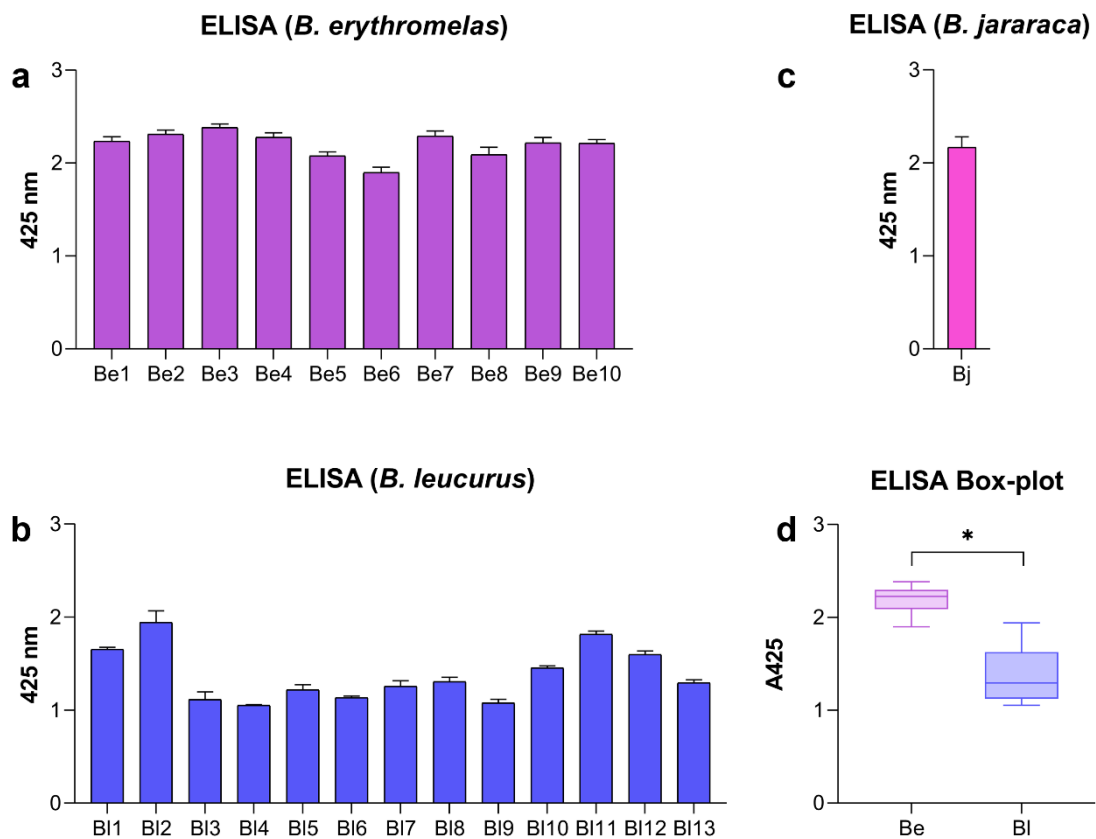
Podemos notar também que a banda de maior intensidade nos géis de SDS-PAGE (bandas na região entre 20 e 25 kDa) nas amostras de BI também são bem reconhecidas, porém com intensidade menor que apresentada anteriormente (Figura 2). Além disso, os padrões de variações apresentados nos géis de SDS-PAGE pra BI se mostram menos evidentes nas membranas de *Western blotting*, pois podemos observar aqui apenas as diferenças apresentadas nos indivíduos 9 e 13 de BI.

Além disso, o soro antibotrópico reconheceu duas bandas nas amostras 5 e 7 de Be que não estão presentes nos géis de SDS-PAGE (Figura 2). Essas bandas reconhecidas possuem a mesma massa molecular, são duas bandas na região de 15 kDa e que estão ausentes nos géis de SDS-PAGE na amostra 7 e pouco evidente na amostra 5 de Be.

Por fim, as amostras de Be e de BI apresentaram diferenças e semelhanças com o *pool* de veneno de Bj. Nas membranas de amostras em condições redutoras é possível notar que a região com maior intensidade fica entre 50 e 75 kDa, se assemelhando com o perfil apresentado por amostras de Be. Podemos notar ainda que na região entre 10 e 15 kDa as bandas de Bj estão mais concentradas, se assemelhando mais ao perfil de BI. Podemos notar ainda que uma região (entre 20 e 37 kDa) rica em bandas proteicas (ver Figura 2) é mal reconhecida pelo soro antibotrópico, mesmo no *pool* de Bj.

Já nas membranas de amostras em condições não redutoras, podemos observar que o *pool* de Bj foi melhor reconhecido pelas proteínas do soro antibotrópico, quando comparado com o teste realizado em condições redutoras. O padrão apresentado por Bj assemelhou-se mais ao apresentado pelas amostras de Be do que BI. Nesse ponto, podemos notar que as amostras de Be tendem a ter um melhor reconhecimento pelas proteínas do soro antibotrópico do que as amostras de BI, o que pode ser confirmado pelo teste de ELISA (Figura 5).

Figura 5 - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). As amostras de veneno foram incubadas (10 µg) em placas de 96 poços durante a noite. As placas foram então lavadas e incubadas com soro antitoxico, em seguida com anticorpo contra imunoglobulinas equinas (*anti-horse*) e a reação foi revelada e realizada a leitura a 425 nm em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices). A figura mostra a absorbância das amostras de *B. erythromelas* (a), *B. leucurus* (b) e do *pool* de *B. jararaca* (c). Além disso, a figura também mostra a comparação da média das espécies de *B. erythromelas* e de *B. leucurus* (d). Foi realizado o teste t para análise estatística (GraphPad Prism v. 8.0.1) (* p < 0,0001).



O ensaio de ELISA é complementar ao teste de *Western blotting*, pois as membranas de *Western blotting* fornecem informações qualitativas enquanto o ELISA fornece informações quantitativas. Aqui podemos observar que as amostras de Be são significativamente melhor reconhecidas pelos anticorpos do soro antitoxico quando comparadas com as amostras de BI.

Comparando com os resultados de *Western blotting* (Figura 4), podemos observar que nas membranas que contêm amostras em condições não redutoras, os indivíduos de Be possuem bandas mais intensas quando comparadas aos indivíduos de BI. Os valores de absorbância do *pool* de Bj se assemelharam bastante com a

média de Be, o que também podemos observar no *Western blotting* em condições não redutoras (Figura 4).

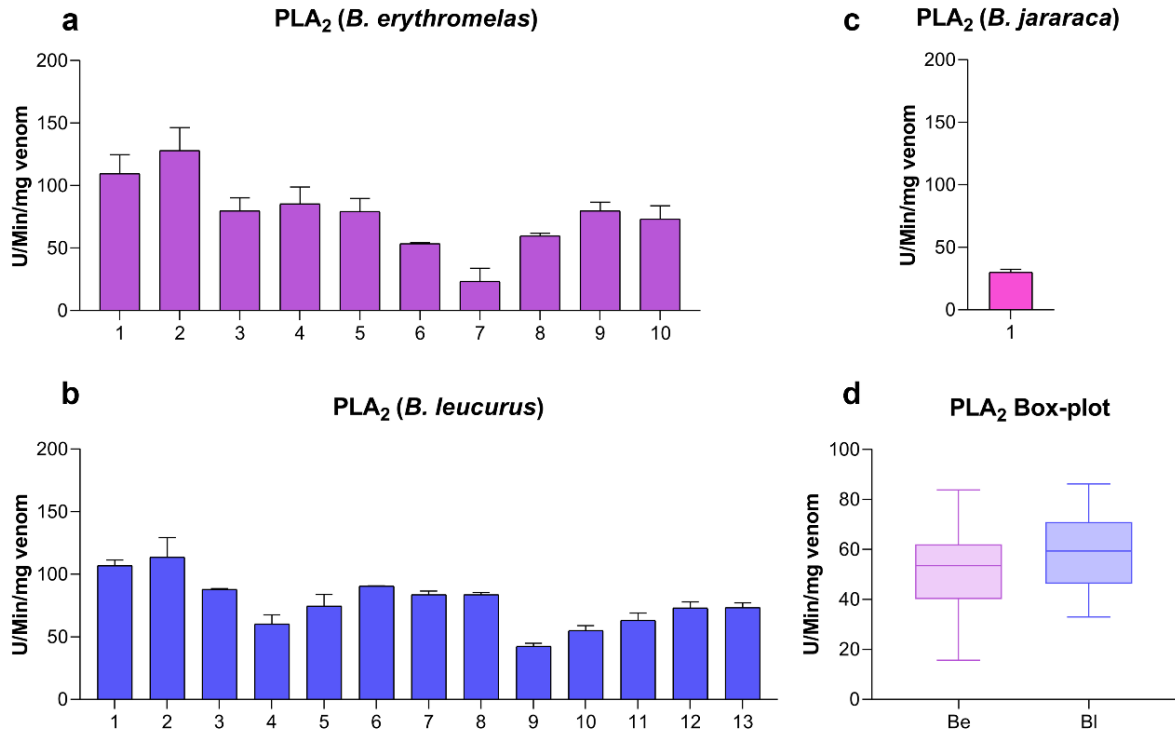
Podemos também observar que a variação em amostras Be é menor do que nas amostras de BI. Dos indivíduos que tiveram os maiores valores de absorvância (> 1,5) em BI (indivíduos 1, 2, 11 e 12), todos já foram citados anteriormente nos apontamentos sobre variações apresentadas nesse trabalho. Os indivíduos BI1, BI2, BI11 e BI12 foram apontados como tendo um padrão de variação encontrado no gel de SDS-PAGE sob condições não redutoras (Figura 2). Já os indivíduos BI1 e BI11 foram citados como amostras que apresentaram alterações nos picos de RP-HPLC, BI1 relacionadas ao primeiro grupo e BI11 ao segundo grupo (Figura 3).

Curiosamente, outros indivíduos de BI evidenciaram variações iguais às apresentadas pelas amostras citadas acima e não mostraram valores elevados de absorvância no teste de ELISA (Figura 5). O indivíduo BI4, por exemplo, apresentou variação em SDS-PAGE em condições não redutoras (Figura 2) similar ao apresentado pelo indivíduo BI1 e teve baixo valor absorvância (1,06) no ensaio de ELISA. Já nas variações apresentadas no RP-HPLC (Figura 3), mais duas amostras de BI apresentaram variações semelhantes a BI1, que são os indivíduos BI3 e BI6 e ambas apresentam valores baixos de absorvância (1,20 e 1,14 respectivamente) no ensaio de ELISA. A amostra BI9 apresentou variação similar a apresentada por BI11, podendo ser observado na figura 3, mas a BI9 apresentou o menor valor de absorvância no ensaio de ELISA (1,03).

4.3. Análise das atividades enzimáticas

Sabe-se que algumas proteínas do veneno ofídico possuem ação contra componentes da cascata de coagulação sanguínea. Dentre essas proteínas estão as fosfolipases A₂, as metaloproteases e as serinoproteases. As fosfolipases A₂ podem aumentar o tempo de coagulação e podem se ligar ao fator Xa causando sua inibição (ver item 1 dessa dissertação). Por esse motivo foi analisada a atividade dessa enzima (Figura 6).

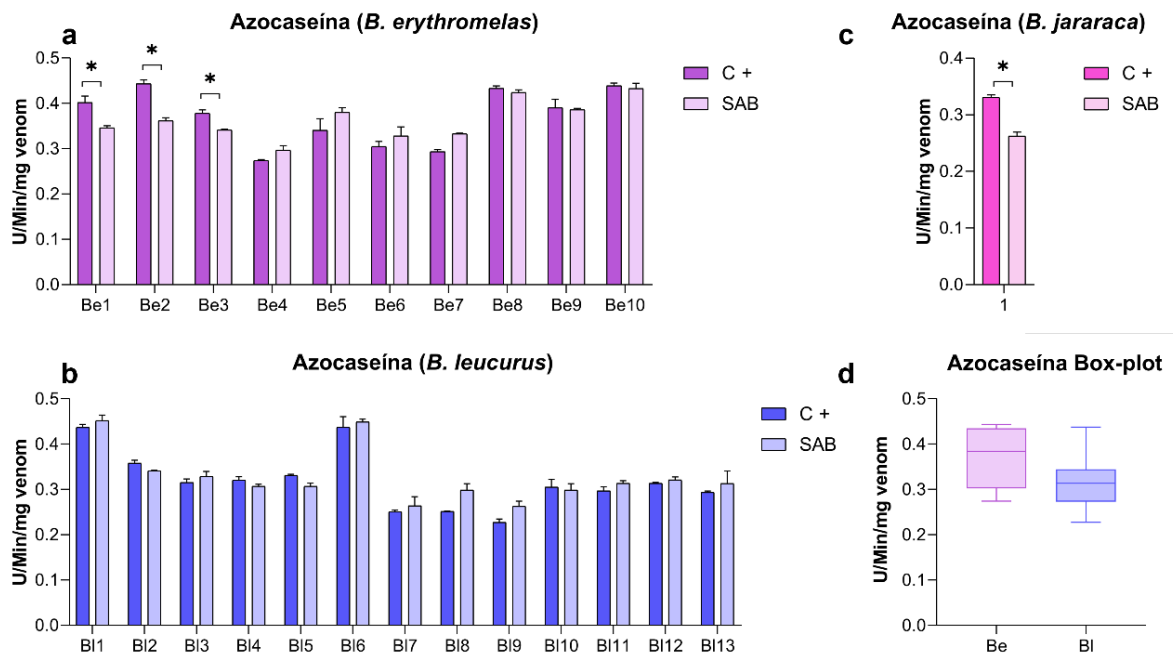
Figura 6 - Atividade fosfolipásica das amostras de veneno. As amostras de venenos foram aplicadas (20 µg) em placas de 96 poços juntamente com o substrato sintético ácido 4-nitro-3-[octanoyloxy] benzoico (NOBA). A placa foi incubada a 37°C por 60 min e as leituras foram mensuradas por leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices).



Em relação à atividade de fosfolipase A₂ sob o substrato específico NOBA não houve diferenças significativas entre amostras de Be e BI. Em ambas as espécies foi possível observar variações. A amostra de Be com maior atividade foi o indivíduo 2 (148,7 U/min/mg de veneno) enquanto em BI foi o indivíduo 2 (128,0 U/min/mg de veneno). Observando a figura 2, para os géis de SDS-PAGE em condições redutoras, é possível ver que em Be2 a região entre 10 e 15 kDa é levemente mais intensa que as demais amostras dessa espécie, podendo se relacionar com essa atividade mais alta. Porém, em BI2, observando tanto o gel de SDS-PAGE em condições redutoras quanto não redutoras, não podemos observar diferenças entre esse indivíduo e as demais amostras dessa espécie.

Para avaliar a atividade de metaloproteases e serinoproteases foi realizado o teste de atividade proteolítica sobre a azocaseína (Figura 7). Esse teste não mostra especificidade para nenhuma das duas proteases citadas. Além disso, foi também analisado o potencial inibitório do soro antibotrópico para a atividade proteolítica.

Figura 7 - Atividade proteolítica das amostras de veneno sobre a azocaseína. As amostras de veneno (10 µg) foram incubadas com a azocaseína por 90 min a 37 °C. Depois desse período foram adicionados 200 µL de ácido tricloroacético (5%) e em seguida as amostras foram centrifugadas. A leitura do sobrenadante foi realizada em leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices). A atividade inibitória pelo soro antibotrópico foi realizada com a pré-incubação das amostras de veneno com o soro antibotrópico por 30 min a 37 °C. As legendas representam as amostras sem a ação do soro antibotrópico (Ven) e sob a ação do soro antibotrópico (Ven+SAB). A figura mostra a atividade proteolítica de *B. erythromelas* (a), *B. leucurus* (b), do pool de *B. jararaca* (c) e da comparação entre as médias de *B. erythromelas* e *B. leucurus* (d). Foi realizado o teste *t* para avaliar o potencial inibitório e a para a comparação entre as médias de *B. erythromelas* e *B. leucurus*. As diferenças de $p < 0,0001$ foram consideradas significativas e marcadas com *.



Assim como no teste de atividade fosfolipásica, no ensaio de atividade proteolítica não houve diferença estatística entre as amostras de Be e BI (Figura 7.d). Também foram evidenciadas variações individuais em ambas as espécies. Três dos indivíduos de Be obtiveram valores de atividade superior a 0,4 U/min/mg de veneno, que foram as amostras 2, 8 e 10. Enquanto nas amostras de BI apenas dois indivíduos apresentaram atividade superior a 0,4 U/min/mg de veneno que foram a amostra 1 e 6.

Apesar do indivíduo 10 apresentar a maior atividade proteolítica entre as amostras de Be (0,44 U/min/mg de veneno), essa amostra não apresenta nenhuma variação em relação a sua composição proteica, tanto nos géis de SDS-PAGE (Figura 2) quanto nos cromatogramas provenientes de RP-HPLC (Figura 3). Já a amostra BI1,

a que possui maior atividade proteolítica dentre as da sua espécie (0,43 U/min/mg de veneno), foram observadas variações nos géis de SDS-PAGE em condições não redutoras, como citado anteriormente (Figura 2). Porém, a amostra que apresentou o mesmo padrão de BI1, a BI4, possui atividade de apenas 0,31 U/min/mg (Figura 7).

Apesar de não apresentarem diferenças significativas entre as médias das atividades proteolíticas, as amostras de Be foram melhor inibidas quando submetidas a pré-incubação com o soro antibotrópico. As amostras Be1, Be2 e Be3 apresentaram, respectivamente, inibição significativa de 13,8%, 18,4% e 9,8%. Enquanto não houve nenhuma inibição considerada significativa nas amostras de BI. A melhor inibição apresentada nesse ensaio foi a proveniente do *pool* de Bj, que mostrou inibição de 20,6%.

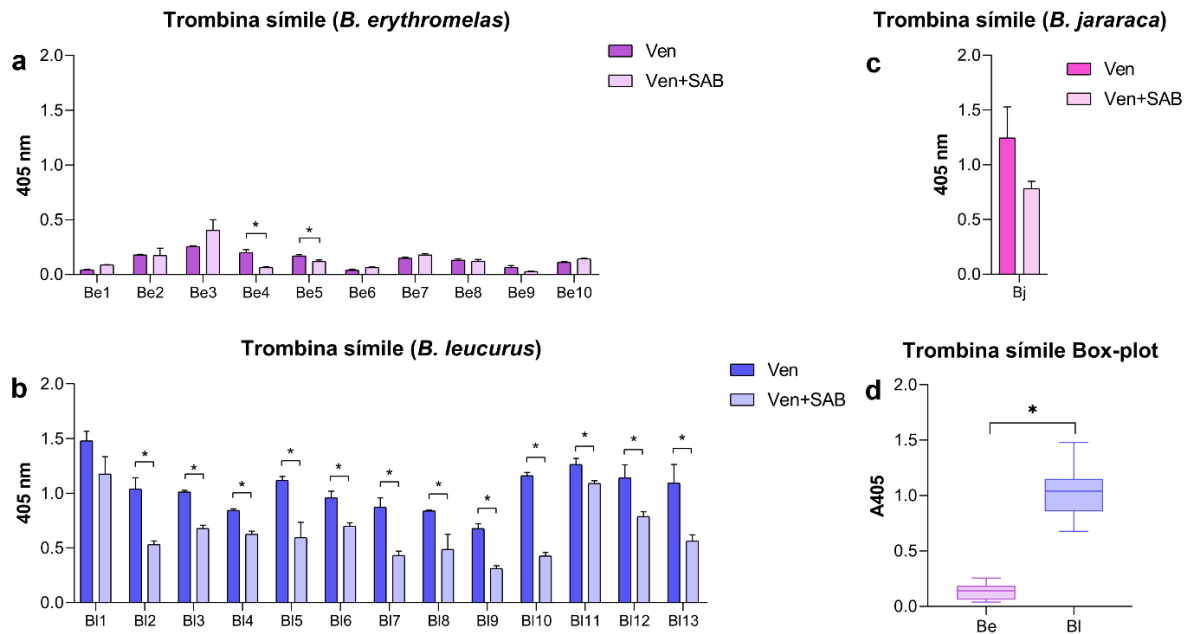
4.4. Caracterização do perfil coagulotóxico

Para a realização da caracterização do perfil coagulotóxico das amostras de veneno, foram desenvolvidos testes que avaliam a ação dos venenos sob pontos específicos da cascata de coagulação, que foram a atividade trombina-símile (Figura 8) e a ativação de Fator X (Figura 9).

Observando a figura 8 é possível notar que as amostras de Be possuem pouca, ou nenhuma, atividade trombina-símile. Entretanto, as amostras tanto de BI quanto o *pool* de Bj apresentam atividade semelhante à trombina, com leitura em 405 nm na faixa entre 1,0 e 1,5. Neste ensaio, todas as amostras de BI (exceto a BI1) foram inibidas pelo soro antibotrópico, sendo que a melhor amostra inibida foi BI10 (63,2% de inibição).

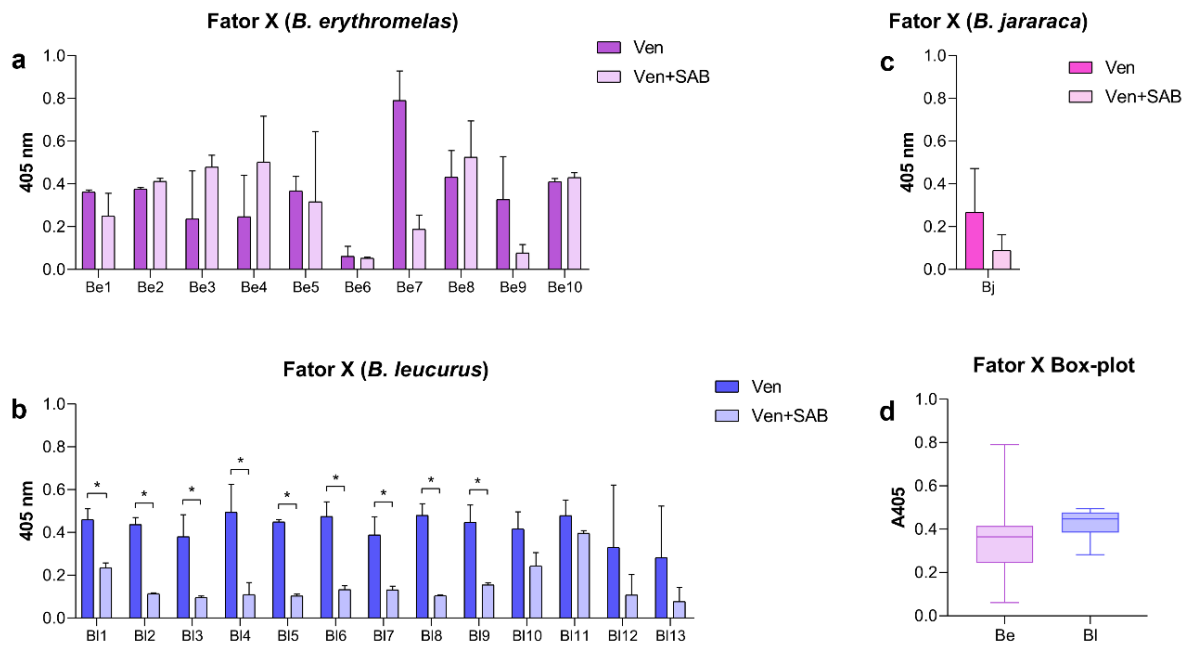
Apesar da baixa atividade trombina-símile das amostras de Be, foi possível observar inibição significativa em Be4 e Be5 (67,5% e 29,3%, respectivamente). O valor de leitura encontrado no *pool* de Bj foi similar a média encontrada em BI, porém, o soro não apresentou uma inibição significativa da atividade semelhante à trombina do *pool* de Bj.

Figura 8 - Atividade de trombina-símile das amostras de veneno. Os venenos (5 µg) e a mistura veneno + soro antitrombótico (5 µg + 10 µL), foram aplicados em placas de 96 poços e incubados a 37 °C por 30 min. Em seguida, foi adicionado o substrato cromogênico (S-2238) e realizada a incubação a 37 °C por 5 min. A leitura foi mensurada com o leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices). Os valores são expressos pela média das absorbâncias e seu desvio padrão. Foi realizada a análise pelo teste *t* para avaliar as diferenças apresentadas. A figura mostra a absorbância de *B. erythromelas* (a), *B. leucurus* (b), do pool de *B. jararaca* (c) e da comparação entre a média de *B. erythromelas* e *B. leucurus* (d). As diferenças de $p < 0,0001$ foram consideradas significativas e marcadas com *.



A figura 9 mostra a capacidade das amostras do veneno de ativarem o Fator X da cascata de coagulação. Podemos observar que as amostras de Be mostram grande variação em relação aos valores encontrados para esse ensaio, já as amostras de BI evidenciam um perfil mais homogêneo.

Figura 9 - Ativação de Fator X. As amostras de veneno (25 µg) e a mistura veneno + soro antibotrópico (25 µg + 5 µL) foram aplicados em placas de 96 poços e incubadas a 37°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado o substrato cromogênico (S-2765), CaCl₂ 10 mM e o Fator X bovino (Sigma). A placa então foi incubada a 37°C por 10 min e a leitura foi realizada em leitor de placa Spectra Max i3 (Molecular Devices). Os valores são expressos pela média das absorbâncias e seu desvio padrão. Foi realizada a análise pelo teste *t* para avaliar as diferenças apresentadas. A figura mostra a absorbância de *B. erythromelas* (a), *B. leucurus* (b), do pool de *B. jararaca* (c) e da comparação entre a média de *B. erythromelas* e *B. leucurus* (d). As diferenças de *p* < 0,0001 foram consideradas significativas e marcadas com *.



Os indivíduos de maior variação da espécie Be foram o Be6 e Be7, apresentando leituras em 405 nm de aproximadamente 0,04 e 0,14. Ambas as amostras já foram citadas anteriormente em variações encontradas em RP-HPLC e na atividade de fosfolipase A₂. A amostra de veneno Be6 apresentou picos no primeiro grupo menos elevados quando comparados com outros indivíduos de sua espécie dos cromatogramas (Figura 4). Já o indivíduo Be7 apresentou a maior atividade fosfolipásica de seu grupo (Figura 6.a).

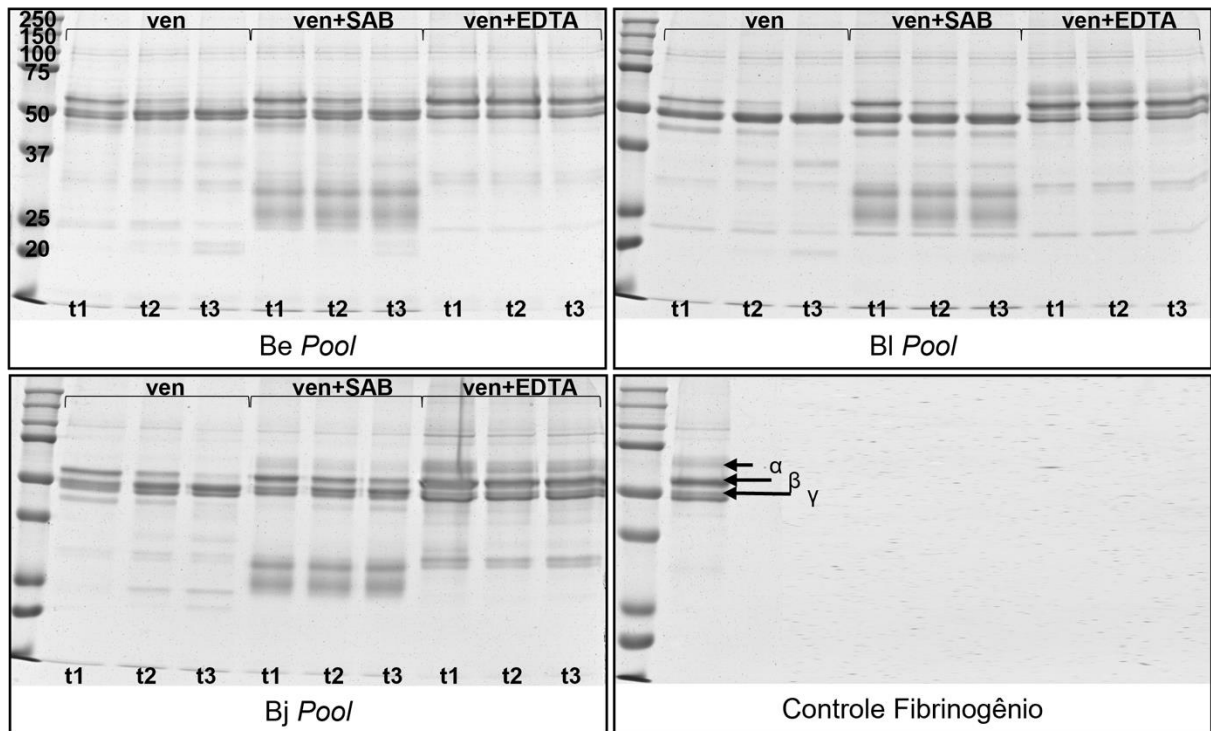
Analisando o potencial inibitório do soro antibotrópico sobre a capacidade de ativação do Fator X das amostras de veneno, observamos que o soro teve melhor ação inibitória nas amostras de BI do que nas amostras de Be. Nove indivíduos de BI (de BI1 a BI9) foram inibidas significativamente pelo soro antibotrópico, enquanto nenhuma amostra de Be apresentou neutralização estatisticamente significativa.

Dos nove indivíduos de BI que foram neutralizados pelo soro antibotrópico, apenas um deles apresentou inibição inferior a 50%, que foi a amostra BI1. Esse indivíduo não se destacou em nenhum teste envolvendo anticorpos até o momento, pois mostrou leitura média no teste de ELISA em relação aos outros indivíduos de sua espécie (Figura 4.b), e não apresentou inibição da atividade proteolítica (Figura 6.b) e nem da atividade trombina-símile (Figura 7.b), quando incubado com o mesmo anticorpo.

O potencial do *pool* de veneno de Bj de ativar o Fator X da cascata de coagulação se mostrou menor que a média encontrada em BI. Além disso, o soro antibotrópico não foi capaz de neutralizar significativamente a atividade do *pool* de venenos de Bj de ativar o Fator X.

Também foi analisada a atividade fibrinogenolítica das amostras de veneno, apresentada na figura 10, na tabela 1 e no apêndice A. O fibrinogênio é uma das moléculas mais importantes da cascata de coagulação sanguínea, pois é a partir dele que se forma a rede de fibrina para a formação do coágulo (SILVERTHORN, 2007). Sabe-se também que o fibrinogênio possui três cadeias principais (alfa - α , beta - β e gama - γ) e nesse ensaio podemos ver o potencial que as amostras de veneno têm de clivar essas cadeias.

Figura 10 - Atividade fibrinogenolítica dos *pools* de *B. erythromelas*, *B. leucurus* e *B. jararaca*. As amostras de veneno (ven), a mistura veneno + soro antibotrópico (ven+SAB) e a mistura veneno + EDTA (ven+EDTA) foram incubadas a 37°C por 2 min. Em seguida, foram adicionados à mistura 200 µL de fibrinogênio humano (2 mg/mL) e incubados a 37°C. Alíquotas de 15 µL foram retiradas do ensaio em intervalos fixos de 5 min (t1), 30 min (t2) e 90 min (t3) e adicionadas ao tampão de amostra contendo o agente redutor 2-Mercaptoetanol. As amostras foram então analisadas por meio de SDS-PAGE (12%).



Em relação a atividade fibrinogenolítica, os *pools* de Be e de Bl não apresentaram diferenças, sendo que em 5 min ambas as amostras degradaram totalmente a cadeia alfa e parcialmente a cadeia beta do fibrinogênio (Figura 10), porém com diferentes intensidades (Tabela 1). Nos intervalos subsequentes, não clivaram totalmente a cadeia beta, só houve uma clivagem parcial que aumentou com o tempo de incubação. O *pool* de veneno de Bj também mostrou um padrão similar ao apresentado pelo *pool* de Be e de Bl.

Porém, quando comparamos a neutralização pelo soro antibotrópico da atividade fibrinogenolítica é possível notar uma diferença entre os *pools* de Be e de Bl. O *pool* de Be, quando incubado com o soro antibotrópico, no intervalo de 30 min de incubação (t2) mostra uma banda referente a cadeia beta mais intensa do que no *pool* de Bl (Figura 10 e Tabela 1). Isso indica que o soro antibotrópico neutraliza melhor o *pool* de Be do que de Bl para a atividade fibrinogenolítica.

Ao analisarmos todos os *pools* em relação a sua neutralização pelo soro antibotrópico, podemos observar que apenas o *pool* de Bj apresenta parcialmente a cadeia alfa do fibrinogênio nos tempos iniciais (Figura 10). Além disso, também é possível notar uma clivagem parcial da cadeia beta desde o tempo inicial (Tabela 1).

Já a neutralização com EDTA se mostrou mais eficaz no *pool* de venenos de Bj pois é possível visualizar a banda de cadeia alfa no tempo de 5 min (t1) e no tempo de 90 min (t2) mais intensa do que nos *pools* de Be e de Bl para o mesmo tempo de incubação (Figura 10 e Tabela 1).

Observa-se também que a inibição com EDTA foi mais eficaz do que em relação ao soro antibotrópico em todos os venenos analisados (Figura 10, Tabela 1 e Apêndice A) uma vez que apenas é possível observar a cadeia alfa nas amostras que foram incubadas com EDTA.

Para melhor avaliar e comparar os resultados da atividade fibrinogenolítica, foi criada uma escala para determinar o grau de clivagem das cadeias do fibrinogênio, com base na análise por densitometria (ver item 3.5.3 deste trabalho). A tabela 1 resume a atividade fibrinogenolítica de todas as amostras de veneno seguindo a escala citada acima.

seguido pelo número, sendo 5 a cadeia menos degradada e 0 a cadeia completamente degradada.

Apesar dos *pools* de Be e de BI mostrarem perfis similares entre eles, podemos observar que ambas as espécies apresentaram variações, tanto na sua atividade quanto na neutralização pelo soro antibotrópico e pelo EDTA. Segundo a escala proposta, podemos observar que todos os indivíduos de Be apresentam nível maior que 3 no tempo inicial, enquanto apenas 5 indivíduos de BI apresentaram condições similares, indicando assim que as amostras de BI degradam mais rapidamente o fibrinogênio quando comparado as amostras de Be.

Além disso, a tabela 1 também mostra que as amostras de BI são mais fibrinogenolíticas do que as amostras de Be, pois apenas 3 indivíduos de Be (Be1, Be2 e Be3) degradaram completamente a cadeia β do fibrinogênio. Já em BI, podemos observar essa mesma característica em 10 amostras (exceto BI2, BI4 e BI5).

Dos indivíduos que não foram neutralizados pelo soro antibotrópico, destacam-se as amostras Be2, Be9, BI1, BI2 e BI9. No ensaio de ELISA, o indivíduo BI9 apresentou a menor leitura (Figura 5) quando comparados com os indivíduos de sua espécie, mostrando que a quantidade de anticorpo que se liga a esses venenos é menor. Entretanto, a amostra BI2 é que apresenta maior leitura no teste de ELISA (Figura 5) quando comparado a indivíduos de sua espécie, e mesmo assim, não mostrou inibição para o teste de atividade fibrinogenolítica.

Adicionalmente, a maioria dos indivíduos apresentaram a inibição pelo soro antibotrópico em pelo menos um dos três intervalos de tempos utilizados. Entre os indivíduos de Be, apenas dois (Be4 e Be7) apresentaram inibição nos três intervalos, enquanto em BI, cinco indivíduos (BI4, BI7, BI8, BI12 e BI13) apresentaram a mesma característica (Tabela 1). Dentre todas as amostras individuais, apenas BI4 mostrou degradação parcial da cadeia α , no intervalo de 5 min (t_1), quando incubado com o soro antibotrópico (Tabela 1 e Apêndice A).

Ao total, 13 indivíduos conseguiram degradar completamente a cadeia beta no tempo de 90 min, e o tratamento com o soro antibotrópico conseguiu diminuir esse número para 7 indivíduos.

Quando as amostras foram incubadas com o EDTA, um agente quelante de metal, podemos observar que nenhum indivíduo foi capaz de clivar completamente a cadeia α do fibrinogênio (Tabela 1). Em três indivíduos (Be7, BI1 e BI2) podemos notar

que a degradação da cadeia α aumenta conforme o tempo de incubação, pois mostraram diminuição nos níveis de clivagem nos três intervalos de tempo analisados.

Diferentemente da DMC (dose mínima coagulante), os ensaios de tromboelastometria fornecem mais dados em relação ao coágulo sanguíneo. Enquanto a DMC fornece apenas dados do tempo de coagulação, a tromboelastometria fornece dados referentes ao início da coagulação (CT), formação da rede de fibrina (CFT) e ângulo de amplitude do coágulo (α).

A tabela 2 mostra resultados referentes a determinação da Dose Pró-Coagulante 50% (DP50), que é definida como a menor dose de veneno (expressa em ng/mL) capaz de diminuir o tempo de coagulação do plasma humano calcificado pela metade do seu tempo de recalcificação (~600s).

	Dose Pro-Coagulante 50% (ng/mL)									
	Be		BI		Be pool		BI pool		Bj pool	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
1	6,07	0,96	8,38	0,54	6,95	1,05	14,04	2,72	80,49	6,96
2	7,84	0,23	425,49	30,07						
3	5,47	1,71	23,37	4,79						
4	2,17	0,49	7,04	0,64						
5	2,77	0,23	320,03	24,47						
6	31,61	1,49	8,21	1,44						
7	23,68	3,02	10,93	1,00						
8	12,36	0,82	24,03	3,06						
9	4,58	0,72	0,74	0,00						
10	8,78	0,89	7,93	0,50						
11			1,95	0,41						
12			5,99	1,59						
13			5,51	5,86						
Média	10,53	9,67	65,35	138,29						

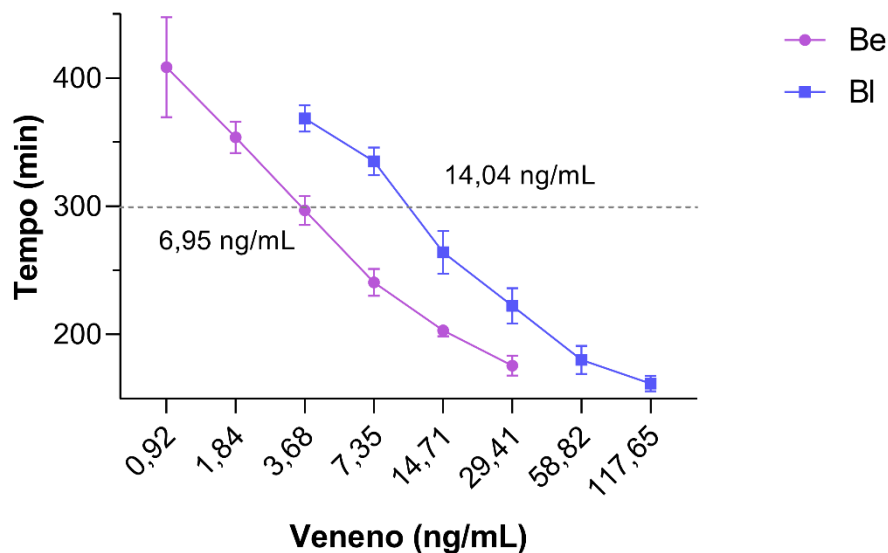
Tabela 2 - Dose Pro-Coagulante 50% (DP50) das amostras de veneno. Médias dos valores de DP50 expressos em ng/mL e seu respectivo desvio padrão. Ao final da coluna de Be (*B. erythromelas*) e BI (*B. leucurus*), é apresentada a média dos indivíduos. As figuras referentes à definição da DE50 se encontram no Apêndice B.

Observando o panorama da DP50 de todos os indivíduos, fica evidente a variação que eles apresentam, principalmente nos indivíduos da espécie BI. Enquanto os indivíduos mais e menos pró-coagulante de Be possuem valores de DP50 2,17

ng/mL e 31,61 ng/mL os indivíduos mais e menos pró-coagulante de BI possuem DP50 de 1,95 ng/mL e 425,49 ng/mL.

Apesar das DP50 não apresentarem diferenças estatísticas entre os grupos de Be e BI ($p > 0,1$) os indivíduos pertencentes a espécie Be tendem a ter um perfil mais pró-coagulante quando comparados com os indivíduos de BI. Ao analisarmos o *pool* dos indivíduos estudados, podemos observar que os valores das suas DP50 seguem o mesmo padrão das médias individuais tanto de Be quanto de BI, mostrando uma tendência de Be ser mais pró-coagulante do que BI (Figura 11). Apesar da DP50 dos *pools* seguirem o mesmo padrão mencionado acima, podemos ver que ambos os *pools* são mais pró-coagulantes que as médias dos indivíduos (DP50 BePool = 6,95 ng/mL, BeMédia = 10,53 ng/mL, BIPool = 14,04 ng/mL, BIMédia = 65,35 ng/mL) (Tabela 2).

Figura 11 - Determinação da Dose Pro-Coagulante 50% dos *pools* de veneno de *B. erythromelas* e *B. leucurus*. Foram analisadas 6 doses dos *pools* de venenos em equipamento de tromboelastometria (ROTEM), juntamente com o CaCl_2 (20 μL), o plasma humano (260 μL) e solução salina (quantidade suficiente para completar 360 μL). Os ensaios foram realizados pelo teste de ativação por contato (INTEM).



Além das variações apresentadas acima, podemos também observá-las em outros parâmetros fornecidos pela tromboelastometria (Apêndice B). O tempo de formação da rede de fibrina (CTF) que demonstra o tempo de formação de um coágulo firme (maior que 20 mm), apresentou dois tipos de variações, uma (1) em que com o aumento da quantidade de veneno menor é o tempo de formação da rede de fibrina,

e outra (2) em que o aumento da quantidade de veneno causa uma resposta aleatória em relação ao tempo de formação da rede de fibrina.

Em amostras de Be, 6 indivíduos apresentaram o padrão 1, 4 indivíduos apresentaram o padrão 2 e em 1 indivíduo não foi possível identificar a formação da rede de fibrina (CFT). Já em BI, apenas 3 indivíduos apresentaram o padrão 1 e os demais indivíduos apresentaram o padrão 2 (Apêndice B).

Para avaliar o potencial inibitório do soro antibotrópico contra a ação pró-coagulante das amostras de veneno, foi mensurada a dose efetiva 50% (DE50) (Tabela 3), que foi definida como a quantidade de soro necessária para prolongar o tempo de coagulação até a metade do intervalo entre a DP50 e o tempo de recalcificação do plasma humano, calculada a partir do tempo de CT.

	Dose Efetiva 50% (ul)									
	Be		BI		Be pool		BI pool		Bj pool	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
1	0,204	0,011	0,141	0,034	0,277	0,015	0,154	0,016	0,232	0,008
2	0,152	0,028	0,219	0,011						
3	0,218	0,042	0,261	0,014						
4	0,187	0,012	0,209	0,006						
5	0,314	0,051	0,209	0,011						
6	0,23	0,015	0,172	0,024						
7	0,211	0,001	0,197	0,01						
8	0,189	0,001	0,21	0,02						
9	0,245	0,017	0,166	0,007						
10	0,255	0,012	0,167	0,033						
11			0,129	0,012						
12			0,197	0,03						
13			0,229	0,042						
Média	0,221	0,044	0,193	0,037						

Tabela 3 - Dose Efetiva 50% das amostras de veneno. É apresentada a média dos valores da quantidade de soro antibotrópico (expressa em μL). Ao final da coluna de Be (*B. erythromelas*) e BI (*B. leucurus*), é apresentada a média dos indivíduos. As figuras referentes à definição da DE50 se encontram no Apêndice C.

Assim como nos testes citados anteriormente, também é possível observarmos variações nos valores de DE50. Os indivíduos que melhor foram neutralizados pelo soro antibotrópico de ambas as espécies (Be2, $DE50 = 0,152 \pm 0,028$, e BI1, $DE50 = 0,141 \pm 0,034$) apresentam diferenças significativas ($p < 0,01$) em relação aos

indivíduos menos neutralizados (Be5, DE50 = 0,314 ± 0,051 e BI3, DE50 = 0,261 ± 0,014).

Assim como na determinação da DP50, aqui também podemos observar que as médias individuais de DE50 não representam a DE50 dos *pools*, mas seguem o mesmo padrão. Apesar das médias dos indivíduos não apresentarem diferença significativa entre as espécies de Be e BI ($p = 0,11$), os valores de DE50 dos *pools* de Be e BI apresentam, sendo que o *pool* de BI é significativamente melhor neutralizado pelo soro antitoxinogênico do que o *pool* de Be ($p < 0,0001$).

5. DISCUSSÃO

Os organismos peçonhentos podem apresentar diferentes efeitos no envenenamento de suas presas, sendo os distúrbios na coagulação um deles. Disfunções coagulopáticas causadas pela peçonha ofídica podem agravar os efeitos do envenenamento, tanto local quanto sistêmico, impossibilitando a difusão de toxinas e favorecendo sua ação local, podendo causar hemorragias internas devido ao consumo dos fatores de coagulação, resultando na coagulopatia de consumo (HUTTON; WARRELL, 1993).

Apesar dos efeitos coagulotóxicos poderem agravar casos de envenenamento, o potencial coagulante dos venenos ofídicos foi, historicamente, analisado pela DMC (THEAKSTON; REID, 1983). Essa técnica permite a comparação de resultados encontrados de diferentes serpentes, porém, considera apenas o tempo de formação do coágulo, não sendo possível analisar outros parâmetros da formação do coágulo.

Mesmo existindo a dificuldade inerente de se trabalhar com cascatas enzimáticas, o uso de abordagens mais complexas permite a análise de diversos aspectos do coágulo, como rapidez de formação do coágulo, tempo de formação da rede de fibrina e a ação em fatores de coagulação (DEBONO et al., 2019b, 2019a, 2019c; SOUSA et al., 2018; YOUNGMAN et al., 2019). Esses parâmetros permitem a caracterização mais detalhadas das ações coagulantes dos venenos de serpentes, possibilitando fazer comparações, mesmo que as diferenças sejam sutis.

Com isso, as metodologias abordadas neste trabalho tiveram como objetivo caracterizar o perfil proteico, analisar o imurreconhecimento pelo soro antitoxinotrópico, caracterizar as atividades enzimáticas e o perfil coagulotóxico.

A análise do perfil proteico das amostras de veneno das serpentes *B. erythromelas* e *B. leucurus*, realizada eletroforese (SDS-PAGE) e cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) apresentaram dados semelhantes aos encontrados na literatura, sendo comparados com perfis apresentados por espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* (DA SILVA AGUIAR et al., 2020; HATAKEYAMA et al., 2021; TASIMA et al., 2022).

No ensaio de SDS-PAGE sob condições redutoras, podemos observar que indivíduos *B. erythromelas* possuem maior riqueza de bandas na região de 10 a 15 kDa quando comparados com amostras de *B. leucurus*, porém as amostras de *B. leucurus* apresentam uma banda de grande intensidade nessa região. Nessa região,

há predominância de fosfolipases A₂ (PLA₂) e lectinas do tipo C (CTL) (AMORIM et al., 2018).

O maior número de bandas de *B. erythromelas* na região mencionada pode estar relacionado à abundância de CTLs encontradas no proteoma de *B. erythromelas*. Jorge e seus colaboradores (2015) demonstraram que a abundância relativa de CTL pode chegar a 21,6% do total de proteínas. Já a banda de grande intensidade encontrada em *B. leucurus* nessa região se deve ao fato de as PLA₂ serem as proteínas mais abundantes (33,6%) nos venenos de *B. leucurus* (DIAS et al., 2022).

Na região entre 50 e 75 kDa são encontradas metaloproteases (SVMP) do tipo P-II e P-III e L-aminoácido oxidases (LAAO) (ZELANIS et al., 2016). Nessa região também podemos observar diferenças entre espécies de *B. erythromelas* e *B. leucurus*. As amostras de *B. erythromelas* possuem bandas intensas nessa região, correlacionando assim com o seu proteoma, pois segundo Jorge e seus colaboradores (2015) as SVMP são as proteínas mais abundantes em seu veneno, podendo chegar a 49,8%. A segunda família de proteína mais abundante em *B. leucurus* são as LAAOs (29,2%) (DIAS et al., 2022) e as amostras de indivíduos dessa espécie também mostram bandas intensas nessa região.

Já nos géis de SDS-PAGE sob condições não redutoras a banda de maior intensidade em *B. leucurus* apresenta entre 20 e 25 kDa. Nessa região são encontradas preferencialmente SVMP do tipo P-I e serionoproteases (SVSP) (HATAKEYAMA et al., 2021). Porém, o proteoma de *B. leucurus* apresentado por Dias e seus colaboradores (2022) mostra que as SVMP compõem apenas 12,9% e as SVSP 14,5%.

Outro ponto importante são os padrões de variações encontrados nos venenos de *B. leucurus* e observados nos géis de SDS-PAGE não reduzidos. Sabe-se que os venenos das serpentes estão sujeitos a variações causadas por diversos fatores, tais como o sexo, o desenvolvimento ontogenético e a distribuição geográfica (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; MENEZES et al., 2006; MODAHL; DOLEY; KINI, 2010; ZELANIS et al., 2007). Nesse caso, não podemos atribuir os padrões de variações a nenhum dos fatores citados acima, visto que nenhuma variação é exclusividade de algum sexo, todos os venenos foram extraídos de animais adultos e todos são provenientes da mesma cidade (ver Apêndice D).

Os cromatogramas também apresentaram variações em relação a intensidade dos picos apresentados. Com base na literatura (GALIZIO et al., 2018; TASIMA et al.,

2022), podemos sugerir que os picos de aproximadamente 20 min correspondem às desintegrinas, o pico de 50 min é majoritariamente composto de PLA₂ D-49, os picos entre 60 e 75 min são PLA₂ K-49, serinoproteases, lectinas do tipo C e CRISP, e nos picos após aos 80 min são encontradas as metaloproteases e as L-aminoácido oxidases.

Jorge e seus colaboradores (2015) não encontraram PLA₂ D-49 no proteoma de *B. erythromelas*, isso explicaria a ausência do pico de 50 min nos cromatogramas nos venenos de *B. erythromelas*. A abundância dos picos onde são encontradas as PLA₂s nos cromatogramas de *B. leucurus* são comparáveis a alta intensidade das bandas nos géis de SDS-PAGE sob condições redutoras. Assim como nos géis de SDS-PAGE, as amostras de veneno de *B. erythromelas* possuem picos correspondentes às metaloproteases mais intensos do que as serpentes *B. leucurus*.

Essas informações citadas acima correspondem aos dados já publicados do proteoma de cada uma dessas espécies. A família de proteínas mais abundante no veneno de *B. erythromelas* são as metaloproteases (JORGE et al., 2015), já em *B. leucurus*, a família de proteína mais abundante em sua composição proteica são as PLA₂ (DIAS et al., 2022).

Outro passo importante para o cumprimento dos objetivos propostos foi a análise de imurreconhecimento das amostras de veneno, por meio do teste de *Western blotting* e ELISA.

Nas membranas de *Western blotting* sob condições redutoras podemos observar que as proteínas que possuem maior abundância em seus respectivos proteomas são as melhor reconhecidas pelo soro antitoxico. A região de maior intensidade nas amostras de veneno de *B. erythromelas* é entre 50 e 75 kDa, região que corresponde as SVMP (ZELANIS et al., 2016), sendo essa a proteína mais abundante em seu proteoma (JORGE et al., 2015). Já nos indivíduos de *B. leucurus* a região de maior intensidade é entre 10 e 15 kDa, região onde são encontradas as PLA₂ (AMORIM et al., 2018), sendo essas as proteínas mais abundantes em seu proteoma (DIAS et al., 2022).

As membranas de *Western blotting* sob condições redutoras apresentaram um baixo reconhecimento das proteínas presentes na área entre 20 e 50 kDa. Os géis de SDS-PAGE sob condições redutoras apresentam uma riqueza de bandas nessa mesma região. Essa é uma região rica em SVSP (ZELANIS et al., 2016) e as proteínas pertencentes a essa família possuem baixa imunogenicidade (LEE; TAN; TAN, 2021).

Ao comparar as membranas sob condições redutoras e não redutoras, é possível afirmar que o soro antibotrópico reconheceu melhor as amostras sem a ação do agente redutor. Isso pode estar relacionado à conformação das moléculas, pois nas amostras sem ação do agente redutor as toxinas estão mais similares às encontradas em seu estado natural.

Observando as membranas de *Western blotting* sob condições não redutoras as amostras de indivíduos de *B. erythromelas* mantêm o padrão apresentado acima, sendo que as proteínas com maior intensidade estão na região das SVMP. Porém, o mesmo não acontece nas amostras de *B. leucurus*, pois nas membranas em condições não redutoras a banda com maior reconhecimento está na região entre 20 e 25 kDa, nessa região existe a predominância de SVSP e SVMP P-I (HATAKEYAMA et al., 2021).

Além disso, as amostras de veneno pertencentes à espécie *B. erythromelas* foram melhor reconhecidas pelos anticorpos do soro antibotrópico do que as amostras de *B. leucurus*. O perfil de reconhecimento de bandas apresentadas pelo *pool* de veneno de *B. jararaca* se assemelham mais às amostras de *B. erythromelas* do que às de *B. leucurus*. Apesar das famílias de proteínas dos venenos serem as mesmas, a abundância relativa delas é diferente, e o proteoma geral de *B. jararaca* (NICOLAU et al., 2017) se assemelha mais à abundância relatada para *B. erythromelas* (JORGE et al., 2015) do que à de *B. leucurus* (DIAS et al., 2022).

O ensaio de ELISA corrobora as observações anteriores, que o soro antibotrópico reconhece melhor o veneno das amostras pertencentes à *B. erythromelas* do que *B. leucurus* ($p < 0,0001$). Isso pode estar relacionado com a quantidade de SVSP encontrada em cada uma das espécies: enquanto as *B. erythromelas* podem ter 6% de SVSP na composição proteica de seu veneno (JORGE et al., 2015), as amostras de *B. leucurus* possuem 14,5% (DIAS et al., 2022).

Aqui também podemos relacionar os valores individuais de ELISA com os perfis encontrados no *Western blotting*. O indivíduo Be3 possui o maior valor de leitura no ensaio de ELISA, e o mesmo possui bandas mais intensas no ensaio de *Western blotting* sob condições redutoras. Já em *B. leucurus*, o indivíduo BI9 apresenta a menor valor de leitura no ELISA, e também apresenta bandas menos intensas tanto no *Western blotting*, tanto em condições redutoras quanto não redutoras.

Assim como visto no ensaio de *Western blotting*, no teste de ELISA o *pool* de veneno de *B. jararaca* mostra imunorreconhecimento semelhante à média dos

indivíduos de *B. erythromelas*. O soro antibotrópico mostrou bom reconhecimento das espécies de *B. erythromelas* e *B. leucurus*, mesmo essas espécies não fazendo parte do *pool* de venenos utilizado para a hiperimunização de cavalos para obtenção dos soros antiofídicos (INSTITUTO BUTANTAN, 2022).

Também foram caracterizadas as atividades enzimáticas, como a atividade fosfolipásica e a atividade proteolítica. As PLA₂s apresentam diversos efeitos fisiopatológicos, tais como mionecrose, anticoagulação, inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hipotensão arterial, aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema (RODRIGUES et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2003), e essa gama de efeitos está relacionada com os seus sítios catalítico e farmacológicos (KINI, 2003). Além das atividades citadas acima, as PLA₂s também possuem efeitos sobre a cascata de coagulação, pois podem se ligar ao Fator Xa, causando sua inibição (KINI, 2005).

Sabe-se que existem diversas variações de PLA₂, e que uma pequena modificação é capaz de determinar se essa enzima possui ou não atividade catalítica. As PLA₂s que possuem um Ácido Aspártico na posição 49 (D-49) possuem atividade enzimática, enquanto as PLA₂s que possuem uma Lisina na posição 49 (K-49) não (KINI, 2003). Por conta disso, muitas vezes não é possível fazer uma correlação direta entre atividade fosfolipásica e abundância de fosfolipases no veneno, porém não foram encontradas PLA₂ K-49 em *B. erythromelas*, tanto em seu proteoma (JORGE et al., 2015) quanto nos perfis cromatográficos. O pico próximo dos 50 min (ausente em todas as amostras de *B. erythromelas*) é característico das PLA₂ K-49.

O indivíduo Be7 possui a menor atividade fosfolipásica quando comparado a outras amostras pertencentes à mesma espécie, e observando o gel de SDS-PAGE em condições não redutoras podemos observar que esse indivíduo não possui uma banda evidente na região entre 10 e 15 kDa, onde se encontram as PLA₂s (ZELANIS et al., 2016).

Os valores encontrados de atividade fosfolipásica não mostraram diferenças significativas entre o veneno das serpentes *B. erythromelas* e *B. leucurus* ($p = 0,27$). E, segundo a literatura, não difere da atividade fosfolipásica de outras serpentes do gênero *Bothrops*, como *B. jararacussu* (DA SILVA AGUIAR et al., 2020) e *B. moojeni* (HATAKEYAMA et al., 2021), sendo que em todos os trabalhos foi utilizado o mesmo substrato específico.

Quando o veneno foi previamente incubado com o soro antibotrópico, não foi possível observar valores de neutralização, e o mesmo já foi documentado por Queiroz e seus colaboradores (2008) para venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops*, incluindo *B. erythromelas* e *B. leucurus*.

Além das PLA₂s, outras duas famílias de proteínas exercem influências na cascata de coagulação sanguínea, as SVMP e as SVSP (CARDOSO et al., 2009; HUTTON; WARRELL, 1993). Por esse motivo, também foi mensurada a atividade proteolítica sobre a azocaseína, um substrato não específico.

Os valores de atividade proteolítica foram semelhantes ao encontrado em outras espécies do gênero *Bothrops*, como *B. jararacussu* (DA SILVA AGUIAR et al., 2020) e *B. atrox* (TASIMA et al., 2020) sobre o mesmo substrato. Apesar de não apresentarem diferenças em relação a atividade proteolítica ($p = 0,11$), mostram diferenças em relação a neutralização. O soro antibotrópico neutraliza melhor a atividade proteolítica de *B. erythromelas* do que as de *B. leucurus*.

O grupo de *B. erythromelas* teve uma inibição de 0,57% quando pré-incubado com o soro antibotrópico nas proporções indicadas pelo fabricante. De todos os indivíduos *B. erythromelas*, destacam-se os indivíduos Be1, Be2 e Be3, pois tiveram diminuição de 13,8%, 18,4% e 9,8%, respectivamente, de suas atividades proteolíticas.

Já em *B. leucurus*, quando os venenos foram pré-incubados com o soro antibotrópico nas doses recomendados pelo fabricante, tiveram atividade cerca de 3,54% maior do que os venenos sem a ação do soro. Queiroz e seus colaboradores (2008) também mostraram um aumento da atividade proteolítica quando pré-incubados com o soro antibotrópico, não só para *B. leucurus* mas também para *B. erythromelas*.

Adicionalmente, a atividade proteolítica do *pool* de *B. jararaca* se mostrou similar às atividades de *B. erythromelas* e *B. leucurus*, sem diferenças estatísticas entre elas. Porém a inibição do veneno de *B. jararaca* pelo soro antibotrópico foi melhor do que em ambos os venenos, pois quando pré-incubados com o soro, o *pool* de *B. jararaca* apresentou diminuição de 20,6% da atividade proteolítica, corroborando assim com os dados encontrados por Queiroz e seus colaboradores (2008), pois de todas as espécies do gênero *Bothrops*, o soro inibiu melhor a atividade proteolítica de *B. jararaca* do que das demais.

Essa diferença na inibição entre as espécies estudadas pode estar relacionada a dois fatores. Em relação ao veneno de *B. erythromelas* ser melhor inibido do que o de *B. leucurus*, isso pode estar novamente relacionado a quantidade de SVSP que cada grupo apresenta. Como essa é uma enzima importante para a atividade proteolítica, a espécie que tiver maior concentração de SVSP tende a ser menos inibida pela baixa imunogenicidade da molécula (LEE; TAN; TAN, 2021).

Já a melhor inibição de *B. jararaca* do que das demais serpentes, tanto nesse estudo quanto no estudo apresentado por Queiroz e seus colaboradores (2008), pode estar relacionada à presença majoritária de venenos de *B. jararaca* e ausência dos venenos de *B. erythromelas* e *B. leucurus* no *pool* de venenos que é aplicado em equinos para obtenção do soro antiofídico.

Uma das moléculas mais importantes para a coagulação sanguínea é a trombina (SILVERTHORN, 2007), pois ela possui uma ação direta no fibrinogênio, liberando monômeros de fibrina para se formar a rede de fibrina. Além disso, a trombina também causa a retroalimentação positiva da cascata de coagulação.

Sabe-se que existem proteínas, pertencentes a família das SVSP, presentes nos venenos ofídicos que possuem atividade semelhante à trombina, e que são chamadas de trombina-símile (traduzido de *thrombin-like*) (ULLAH et al., 2018). Elas podem ser encontradas em venenos de diversas serpentes, como *B. atrox* (ITOH et al., 1988), *B. jararaca* (NISHIDA et al., 1994) e *B. leucurus* (MAGALHÃES et al., 2007).

Quando as amostras de veneno foram submetidas ao teste de atividade de trombina-símile, pudemos observar uma diferença significativa ($p < 0,0001$) comparando os resultados de *B. erythromelas* e *B. leucurus* (Figura 8.d). Apesar dessa diferença ser esperada, nos surpreende que os indivíduos de *B. erythromelas* apresentam essa atividade, uma vez que foi descrito que serpentes da espécie *B. erythromelas* não possuem trombina-símile na composição de seu veneno (LOTTO et al., 2021).

Como citado na metodologia (ver item 3.6 dessa dissertação) para esse ensaio, foi utilizado uma dose 10 vezes maior do que a recomendada pelo fabricante. Isso pode estar relacionado ao fato de as trombina-símile pertencerem a uma família que possui baixa imunogenicidade e por serem glicosiladas, o que pode interferir na interação antígeno e anticorpo (LEE; TAN; TAN, 2021).

Apesar do *pool* de veneno de *B. jararaca* possuir atividade semelhante ao grupo das amostras de *B. leucurus*, o mesmo não apresentou inibição pelo soro

antibotrópico, mesmo com o aumento da concentração dos anticorpos na pré-incubação. Além do *pool* de *B. jararaca*, um indivíduo de *B. leucurus* também não apresentou diminuição da atividade de trombina-símile quando pré-incubado com o soro antibotrópico, que foi o indivíduo B11.

Além do ensaio de atividade semelhante à trombina, também foram realizados testes de ativação do Fator X. O Fator X também é um importante componente da cascata de coagulação, pois ele é o primeiro fator da via comum. Sua ativação, além de formar o coágulo, causa uma retroalimentação positiva da via extrínseca (SILVERTHORN, 2007).

A Figura 9 mostra um padrão heterogêneo nas amostras de *B. erythromelas* e mais homogêneo nas amostras de *B. leucurus*. Não é possível observar diferenças estatísticas entre *B. erythromelas* e *B. leucurus*, e os valores apresentados pelo *pool* de veneno de *B. jararaca* se mostram parecidos com ambas as espécies. Sousa e seus colaboradores (2018) encontraram valores semelhantes em *B. atrox* e *B. jararaca*, mesmo utilizando metodologia diferente.

Como descrito anteriormente, as PLA₂s podem se ligar ao Fator X ativo (Fator Xa) causando assim sua inibição (KINI, 2003). Nesse ensaio, podemos observar que o indivíduo com a maior capacidade de ativar o Fator X é o Be7, esse indivíduo é o que possui a menor atividade fosfolipásica do grupo e não apresenta a banda correspondente à PLA₂ no gel de SDS-PAGE sob condições não redutoras. Esses fatores em conjunto podem ser o gerador dessa alta capacidade de ativar o Fator X nessa amostra. Só é possível fazer essa correlação porque não foram encontradas PLA₂ não enzimáticas no veneno de *B. erythromelas* (JORGE et al., 2015).

Os ativadores de Fator X dos venenos de serpentes podem pertencer à família tanto das metaloproteases quanto das serinoproteases (CARDOSO et al., 2009). Possivelmente, por conta desse fato que nesse ensaio não foi necessário aumentar a dose de soro antibotrópico para se observar uma neutralização das amostras. Podemos observar que as amostras de *B. leucurus* foram melhor neutralizadas pelo soro antibotrópico (64,1% de neutralização) do que as de *B. erythromelas*.

Algumas amostras de *B. leucurus* chegaram a mais de 70% de diminuição da ativação do Fator X quando pré-incubadas com o soro antibotrópico (B12, B13, B14, B15, B16 e B18). Sousa e seus colaboradores (2018) observaram inibição discreta da ativação do Fator X do veneno de *B. atrox* e *B. jararaca* (0,8% de inibição), assemelhando-se mais aos resultados encontrados para o *pool* de *B. jararaca*, pois

esse não mostrou diminuição significativa da sua capacidade de ativar o Fator X sob ação do soro antibotrópico.

Sabe-se que existem enzimas presentes nos venenos ofídicos capazes de degradar as cadeias α e β do fibrinogênio, e raramente atuam sobre a cadeia γ (MARKLAND, 1998; SWENSON; MARKLAND, 2005). Assim como em outras serpentes do gênero *Bothrops* (OLIVEIRA, 2014) as espécies *B. erythromelas* e *B. leucurus* mostraram a hidrólise da cadeia α e em seguida da cadeia β do fibrinogênio, sem mostrar qualquer alteração na cadeia γ em todos os intervalos de tempos analisados.

Todos os indivíduos, seja de *B. erythromelas* ou de *B. leucurus*, apresentaram degradação total da cadeia α e degradação parcial da cadeia β no intervalo de 5 min. Porém, é possível notar diferenças entre as amostras de ambas as espécies, pois todos os indivíduos de *B. erythromelas* apresentaram a cadeia β em nível superior a 3 de degradação, no intervalo de 5 min, enquanto em *B. leucurus* apenas 3 indivíduos apresentaram condições iguais.

Comparando os dados da atividade fibrinogenolítica e atividade proteolítica, foi possível encontrar uma relação nas amostras de *B. erythromelas*. Os indivíduos Be1, Be2 e Be3 apresentaram níveis elevados de atividade proteolítica do grupo e foram os únicos que apresentaram degradação total da cadeia β . Apesar da degradação do fibrinogênio ser causado pelas proteases presentes nos venenos de serpentes (LU et al., 2005) não foi encontrado relação entre a atividade fibrinogenolítica e atividade proteolítica em amostras de Bl.

Podemos então afirmar que as amostras de veneno de *B. leucurus* possuem maior atividade fibrinogenolítica do que nos venenos de *B. erythromelas*. Como a atividade fibrinogenolítica dos venenos de Be e de Bl foram neutralizados por EDTA, podemos afirmar que as metaloproteases são as principais moléculas que agem na degradação das cadeias α e β do fibrinogênio em ambas as espécies (OLIVEIRA, 2014).

Ao analisar os dados anteriores, é possível supor que as amostras de *B. leucurus* possuem maior potencial pró-coagulante do que as amostras de *B. erythromelas*, uma vez que exercem atividade significativamente mais alta de trombina-símile e apresentam um padrão mais homogêneo na ativação do Fator X. Porém, esse padrão não é observado quando o veneno entra em contato com o plasma humano no ensaio de tromboelastometria.

Podemos observar que a DP50 do *pool* de *B. erythromelas* é de 6,95 ng/mL enquanto a DP50 do *pool* de *B. leucurus* é de 14,04 ng/mL (Figura 10). Já se sabe que o veneno de *B. erythromelas* tem atividade pró-coagulante marcante, mesmo com a ausência de trombina-símile, pois contam com ativadores de Fator X e de protrombina (FURTADO et al., 1991; SANTORO et al., 2015). Porém, Sanchez e seus colaboradores (1992) mostram que a Dose Mínima Coagulante sobre o plasma é menor em *B. leucurus* (1,4 mg/L) do que em *B. erythromelas* (2,4 mg/L), dado oposto do visto aqui.

Ao analisarmos as DP50 dos indivíduos de ambas as espécies, é possível notar que as amostras de *B. leucurus* possuem uma variação maior do que a encontrada em *B. erythromelas*. Isso também pode ser observado quando comparamos dois trabalhos envolvendo o veneno de *B. leucurus*. Lira-da-Silva (2009) encontrou uma DMC sobre o plasma de 85,98 mg/L enquanto Sanchez e seus colaboradores (1992) encontraram uma DMC de 1,4 mg/L, ambos utilizando a metodologia padronizada por Theakston e Reid (1983).

Outro dado importante que podemos observar analisando os dados de tromboelastometria é a variação do tempo de formação da rede de fibrina (CFT). Esse estágio é marcado pela firmeza do coágulo, evidenciada quando o coágulo chega a comprimento de 20 milímetros (WHITING; DINARDO, 2014). Um dos componentes essenciais para a firmeza do coágulo é o Fator XIII da cascata de coagulação (SILVERTHORN, 2007).

Para o valor de CFT é possível observar uma diferença entre os venenos de *B. erythromelas* e *B. leucurus*. Seis das amostras de *B. erythromelas* apresentam valores de CFTs lineares, ou seja, quanto mais veneno é colocado mais rápida é a formação da rede de fibrina, enquanto em *B. leucurus*, apenas três indivíduos mostram esse padrão. Os demais indivíduos apresentam outro padrão, em que o valor de CFT independe da quantidade de veneno na mistura.

Assim como em outros trabalhos que compararam o potencial coagulante das amostras individuais e do *pool* dessas amostras (GALIZIO et al., 2018), neste estudo também podemos observar que o *pool* é mais pró-coagulante do que a média individual do grupo. Enquanto a média da DP50 dos grupos de *B. erythromelas* e de *B. leucurus* representam respectivamente 10,53 ng/mL e 65,35 ng/mL, os seus respectivos *pools* representam doses de 6,95ng/mL e 14,04ng/mL.

Essa potencialização da atividade pró-coagulante dos *pools* em relação as amostras individuais podem ser devido a ação sinérgica das proteínas do veneno. Algumas amostras de veneno podem apresentar proteínas específicas que são potencializadas quando misturadas, devido a ações intermoleculares entre as próprias proteínas do veneno e entre essas proteínas e as proteínas exógenas (LAUSTSEN, 2016), como no caso as enzimas da cascata de coagulação.

O potencial inibitório do soro antibotrópico foi determinado pela DE50, possibilitando observar que o *pool* de veneno de *B. leucurus* foi melhor neutralizado do que o *pool* de *B. erythromelas*. Esse resultado é esperado quando consideramos a neutralização dos ensaios coagulantes *in vitro*, como a atividade trombina-símile e ativação do Fator X. Em ambos os ensaios, os indivíduos de *B. leucurus* foram melhor neutralizados do que os de *B. erythromelas*.

Curiosamente, o *pool* de veneno de *B. jararaca* se mostrou intermediário quanto à neutralização pelo soro antibotrópico quando comparado com os venenos de ambas as espécies, e isso se repete também nos testes coagulotóxicos. Por se tratar do veneno de uma espécie que corresponde a 50% do *pool* de venenos botrópicos utilizado para a produção do soro, contra a ação de duas espécies de serpentes que não fazem parte desse *pool* (INSTITUTO BUTANTAN, 2022), esperava-se que o veneno de *B. jararaca* seria o melhor inibido nos ensaios realizados. Porém, apenas na atividade proteolítica sobre a azocaseína o *pool* de *B. jararaca* foi melhor inibido pelo soro antibotrópico do que os indivíduos de *B. erythromelas* e de *B. leucurus*.

6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou variações intra e interespecíficas entre os venenos de *B. erythromelas* e *B. leucurus*, em diferentes ensaios realizados em relação à composição proteica, ao imurreconhecimento e neutralização, às atividades enzimáticas e à coagulotoxicidade.

Em relação a ensaios de composição proteica, podemos observar que o veneno das serpentes *B. leucurus* mostraram maior variação quando comparados com as amostras de *B. erythromelas*. Essas variações apresentadas não possuem correlação com sexo, idade, alimentação e distribuição geográfica desses animais.

Os ensaios de imurreconhecimento e de neutralização mostraram que os venenos de *B. erythromelas* são melhor reconhecidos (teste de ELISA) pelo soro antibotrópico e são melhor inibidos com relação à atividade proteolítica do que os venenos de *B. leucurus*. Porém, com relação aos ensaios de trombina-símile, ativação de Fator X e inibição da atividade coagulante (DE50), os venenos das serpentes *B. leucurus* foram melhor inibidos do que os venenos de *B. erythromelas*.

Ambas as espécies não mostraram diferenças significativas em relação às atividades enzimáticas (fosfolipásica e proteolítica). Porém, quando avaliamos a atividade sobre fatores específicos da cascata de coagulação, podemos afirmar que as serpentes *B. erythromelas* possuem ação sobre o Fator X (com maior heterogeneidade) enquanto as serpentes *B. leucurus* além da ação sob o Fator X (com maior homogeneidade) apresentam também atividade trombina-símile. Os venenos das serpentes *B. erythromelas* tendem ser mais pró-coagulante do que as *B. leucurus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAZONAS, D. R.; PORTES-JUNIOR, J. A.; NISHIYAMA-JR, M. Y.; NICOLAU, C. A.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H. V.; GRAZZIOTIN, F. G.; ROKYTA, D. R.; GIBBS, H. L.; VALENTE, R. H.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. **Journal of Proteomics**, v. 181, p. 60–72, 2018.
- AMORIM, F. G.; COSTA, T. R.; BAIWIR, D.; DE PAUW, E.; QUINTON, L.; SAMPAIO, S. V. Proteopeptidomic, functional and immunoreactivity characterization of *Bothrops moojeni* snake venom: Influence of snake gender on venom composition. **Toxins**, v. 10, n. 5, 1 maio 2018.
- ANTUNES, T. C.; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI, M.; SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1443–1458, dez. 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. **Acidente Por Animais Peçonhentos - Notificações Registradas No Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 5 fev. 2023.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851–859, 2000.
- CALVETE, J. J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 121–126, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.018>>.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, p. 1405-1414, 2007.
- CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H. V.; FURTADO, M. F. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. 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**, v. 74, n. 4, p. 510–527, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003>>.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. de S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. Jr. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. [s.l: s.n.]
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake Venom Variability: Methods of Study. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279–1303, 1991.
- CHIPPAUX, J.-P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J.; CHIPPAUX, J. -P.; WILLIABIS, V. **State Toxinology Service, Adelaide Children's Hospital Adelaide Childrens Hospital**. [s.l: s.n.].

- DA SILVA AGUIAR, W.; DA COSTA GALIZIO, N.; SANT'ANNA, S. S.; SILVEIRA, G. P. M.; DE SOUZA RODRIGUES, F.; GREGO, K. F.; DE MORAIS-ZANI, K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Ontogenetic study of *Bothrops jararacussu* venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, v. 186, p. 67–77, 30 out. 2020.
- DEBONO, J.; BOS, M. H. A.; COIMBRA, F.; GE, L.; FRANK, N.; KWOK, H. F.; FRY, B. G. Basal but divergent: Clinical implications of differential coagulotoxicity in a clade of Asian vipers. **Toxicology in Vitro**, 2019a.
- DEBONO, J.; BOS, M. H. A.; DO, M. S.; FRY, B. G. Clinical implications of coagulotoxic variations in Mamushi (Viperidae: *Gloydius*) snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, 2019b.
- DEBONO, J.; BOS, M. H. A.; NOUWENS, A.; GE, L.; FRANK, N.; KWOK, H. F.; FRY, B. G. Habu coagulotoxicity: Clinical implications of the functional diversification of *Protobothrops* snake venoms upon blood clotting factors. **Toxicology in Vitro**, 2019c.
- DIAS, Ê. R.; DE OLIVEIRA, L. A.; LAURIA, P. S. S.; BORDON, K. de C. F.; RODRIGUES DOMÊNICO, A. M.; DA SILVA GUERREIRO, M. L.; WIEZEL, G. A.; CARDOSO, I. A.; ROSSINI, B. C.; MARINO, C. L.; PIMENTA, D. C.; ARANTES, E. C.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; BRANCO, A.; DOS SANTOS, L. D.; BIONDI, I. *Bothrops leucurus* snake venom protein profile, isolation and biological characterization of its major toxin PLA2s-like. **Toxicon**, v. 213, p. 27–42, 15 jul. 2022.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal**, jun. p. 3016-3030, 2008.
- FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. Em: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Animais peçonhentos no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Savier, 2009. p. 42–70.
- FRY, B. G. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome Research**, v. 15, n. 3, p. 403–420, mar. 2005.
- FURTADO, M. F.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 219–226, 1991.
- GALIZIO, N. D. C.; SERINO-SILVA, C.; STUGINSKI, D. R.; ABREU, P. A. E.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; TASHIMA, A. K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; MORAIS-ZANI, K. Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. **Journal Proteomics**, v. 186, p. 56–70, 2018.
- GOMES, M. S. R.; DE QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C. N.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA, M. v.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; DE OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 290–300, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, 14 set. 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958–975, 2009.

HARLOW, D. E. L. Antibodies: A laboratory manual. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 10, p. 429, out. 1989. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0968000489903071>>.

HATAKEYAMA, D. M.; TASIMA, L. J.; DA COSTA GALIZIO, N.; SERINO-SILVA, C.; RODRIGUES, C. F. B.; STUGINSKI, D. R.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; TASHIMA, A. K.; NISHIDUKA, E. S.; DE MORAIS-ZANI, K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. From birth to adulthood: An analysis of the Brazilian lancehead (*Bothrops moojeni*) venom at different life stages. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6 June, 1 jun. 2021.

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

HUTTON, R. A.; WARRELL, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Reviews**, v. 7, p. 176–189, 1993.

IBGE, I. B. de G. e E. **IDH - Índice de Desenvolvimento Humano**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/panorama>>. Acesso em: 5 fev. 2023.

IBGE, I. B. de G. e E. **PNAD - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9127-pesquisa-nacional-por-amostra-de-domicilios.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 5 fev. 2023.

INSTITUTO BUTANTAN. **Soro Antibotrópico (Pentavalente)**São Paulo. 2022. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/assets/arquivos/soros-e-vacinas/soros/Soro%20antibotrópico.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2023.

ITOH, N.; TANAKA, N.; FUNAKOSHI, I.; KAWASAKI, T.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Organization of the gene for Batroxobin, a trombin-like snake venom enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7628–7631, 1988.

JORGE, R. J. B.; MONTEIRO, H. S. A.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M. C.; XIMENES, R. M.; BORGES-NOJOSA, D. M.; LUNA, K. P. de O.; ZINGALI, R. B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 93–114, 1 jan. 2015.

JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomics: Characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Journal of Proteomics**, v. 2., p. 327-338, 2004.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.;

TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS Journal**, dez. 2011.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, p. e218, 2008.

KINI, R. M. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827–840, 2003.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147–1161, 15 jun. 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, p. 680–685, 1970.

LATINOVIĆ, Z.; LEONARDI, A.; KOH, C. Y.; KINI, R. M.; BAKIJA, A. T.; PUNGERČAR, J.; KRIŽAJ, I. The procoagulant snake venom serine protease potentially having a dual, blood coagulation Factor V and X-activating activity. **Toxins**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2020.

LAUSTSEN, A. H. Toxin synergism in snake venoms. **Toxin Reviews**, out. 2016.

LEE, L. P.; TAN, K. Y.; TAN, C. H. Snake venom proteomics and antivenomics of two Sundaic lance-headed pit vipers: *Trimeresurus wiroti* (Malaysia) and *Trimeresurus puniceus* (Indonesia). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 40, 1 dez. 2021.

LIRA-DA-SILVA, R. M. *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes; Viperidae): Natural history, venom and envenomation. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 1, p. 56–65, 2009.

LOMONTE, B.; TSAI, W. C.; URENA-DIAZ, J. M.; SANZ, L.; MORA-OBANDO, D.; SANCHEZ, E. E.; FRY, B. G.; GUTIERREZ, J. M.; GIBBS, H. L.; SOVIC, M. G.; CALVETE, J. J. Venomics of New World pit vipers: genus-wide comparisons of venom proteomes across Agkistrodon. **Journal of Proteomics**, v. 96, p. 103–116, 2014.

LOTTO, N. P.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; GUARNIERI, M. C.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; SANTORO, M. L.; OGUIURA, N. The absence of thrombin-like activity in *Bothrops erythromelas* venom is due to the deletion of the snake venom thrombin-like enzyme gene. **PLoS ONE**, v. 16, n. 4 April 2021, 1 abr. 2021.

LU, X.; LU, D.; SCULLY, M. F.; KAKKAR, V. v. Snake Venom Metalloproteinase Containing a Disintegrin-like Domain, its Structure-activity Relationships at Interacting with Integrins. **Curr. Med. Chem.-Cardiovascular & Hematological Agents**, v. 3, p. 249-260, ago. 2005.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R. N.; ALMEIDA, A. P.; SANCHEZ, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative**

Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, v. 146, n. 4, p. 565–575, 2007.

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

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

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. *Em*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Animais peçonhentos no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Savier, 2009. p. 42–70.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304–312, 1 mar. 2006.

MODAHL, C. M.; DOLEY, R.; KINI, R. M. Venom analysis of long-term captive Pakistan cobra (*Naja naja*) populations. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 612–618, 2010.

NICOLAU, C. A.; CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; JUNQUEIRA, M.; PERALES, J.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; VALENTE, R. H. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214–231, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.029>>.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, SI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUIT, H. Purification and Characterization of Bothrombin, a Fibrinogen-Clotting Serine Protease from the Venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, p. 1843-1849, 1994.

OLIVEIRA, S. S. **Atividades Biológicas do Veneno de Serpentes Bothrops atrox Capturadas na Floresta Nacional do Tapajós, Oeste do Pará**. 2014. Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

PEICHOTO, M. E.; TEIBLER, P.; MACKESSY, S. P.; LEIVA, L.; ACOSTA, O.; GONÇALVES, L. R. C.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; SANTORO, M. L. Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing α -fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2007.

PREZOTO, B. C.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; MARCELINO, J. R.; TASHIMA, A. K.; NISHIDUKA, E. S.; KAPRONEZAI, J.; MOTA, J. O.; ROCHA, M. M. T.; SERINO-SILVA, C.; OGUIURA, N. A functional and thromboelastometric-based micromethod for assessing crotoxin anticoagulant activity and antiserum relative potency against *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 148, p. 26–32, 15 jun. 2018.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. de F. D.; TAMBOURGI, D. v. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842–851, 15 dez. 2008.

RAMÍREZ, G. A.; FLETCHER, P. L.; POSSANI, L. D. Characterization of the venom from *Crotalus molossus nigrescens* Gloyd (black tail rattlesnake): Isolation of two proteases. **Toxicon**, v. 28, n. 3, p. 285–297, 1990.

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

RODRIGUES, C. F. B.; SERINO-SILVA, C.; DE MORAIS-ZANI, K.; KAVAZOI, V. K.; NOGUEIRA CARVALHO, M. P.; GREGO, K. F.; CHIARELLI, T.; TASHIMA, A. K.; TOYAMA, M. H.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Boaypli: Structural and functional characterization of the gamma phospholipase A₂ plasma inhibitor from the non-venomous Brazilian snake *Boa constrictor*. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, 2020.

ROGALSKI, A.; SOERENSEN, C.; OP DEN BROUW, B.; LISTER, C.; DASHVESKY, D.; ARBUCKLE, K.; GLORIA, A.; ZDENEK, C. N.; CASEWELL, N. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; WÜSTER, W.; ALI, S. A.; MASCI, P.; ROWLEY, P.; FRANK, N.; FRY, B. G. Differential procoagulant effects of saw-scaled viper (Serpentes: Viperidae: *Echis*) snake venoms on human plasma and the narrow taxonomic ranges of antivenom efficacies. **Toxicology Letters**, 2017.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. v; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, Z. D. T.; DINIZ, M. R.; SANCHEZ, E. F.; VELARDE, D. T.; CORDEIRO, M. N.; ACOSTINI-COTRA, G.; DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95–103, 1992.

SANTORO, M. L.; DO CARMO, T.; CUNHA, B. H. L.; ALVES, A. F.; ZELANIS, A.; DE TOLEDO SERRANO, S. M.; GREGO, K. F.; SANT'ANNA, S. S.; BARBARO, K. C.; FERNANDES, W. Ontogenetic variation in biological activities of venoms from hybrids between *Bothrops erythromelas* and *Bothrops neuwiedi* snakes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A.; BUTANTAN INSTITUTE ANTIVENOM STUDY, G. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440–1448, 2008.

SANTOS-FILHO, N. A. **Caracterização Funcional e Estrutural de um Inibidor de Fosfolipase A₂ tipo- α da Serpente *Bothrops alternatus*: Clonagem, Expressão e Mapeamento da Região Responsável pela Atividade Inibitória**. 2012. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 15 jun. 2005.

SERRANO, S. M. T.; SHANNON, J. D.; WANG, D.; CAMARGO, A. C. M.; FOX, J. W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501–510, fev. 2005.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. v. 7^o Edição. 2017

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 1–19, 2000. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/bba>.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: Effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855–868, 2003.

SOUSA, L. F.; ZDENEK, C. N.; DOBSON, J. S.; OP DEN BROUW, B.; COIMBRA, F.; GILLET, A.; DEL-REI, T. H. M.; CHALKIDIS, H. de M.; SANT'ANNA, S.; TEIXEIRA-DA-ROCHA, M. M.; GREGO, K.; TRAVAGLIA CARDOSO, S. R.; MOURA DA SILVA, A. M.; FRY, B. G. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) venoms from Brazil: Differential biochemistry and antivenom efficacy resulting from prey-driven venom variation. **Toxins**, 2018.

SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1021–1039, 15 jun. 2005.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 164-176, jan. 2012.

TASIMA, L. J.; HATAKEYAMA, D. M.; AGUIAR, W. da S.; LIMA, E. O. V. de; MIYAMOTO, J. G.; TASHIMA, A. K.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; MORAIS-ZANI, K. de; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Analyzing the influence of age and sex in *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 214, p. 78–90, 30 jul. 2022.

TASIMA, L. J.; SERINO-SILVA, C.; HATAKEYAMA, D. M.; NISHIDUKA, E. S.; TASHIMA, A. K.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; DE MORAIS-ZANI, K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Crotamine in *Crotalus durissus*: Distribution according to subspecies and geographic origin, in captivity or nature. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, n. abr. 2020, p. 1–14, 2020.

TEIXEIRA, C. F. P.; CHAVES, F.; ZAMUNÉR, S. R.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, n. 2, p. 107–115, 2005.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947–962, 2003.

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**, 1983.

ULLAH, A.; MASOOD, R.; ALI, I.; ULLAH, K.; ALI, H.; AKBAR, H.; BETZEL, C. Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 788-811, jul. 2018.

VILCA-QUISPE, A.; PONCE-SOTO, L. A.; WINCK, F. V.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 745–753, 1 abr. 2010.

WARRELL, D. A. Snake venoms in science and clinical medicine* 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 732-740, mai. 1989.

WHITING, D.; DINARDO, J. A. TEG and ROTEM: Technology and clinical applications. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 2, p. 228–232, 1 fev. 2014.

WHO, W. H. O. **Snakebite envenoming**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=tab_1>. Acesso em: 5 fev. 2023.

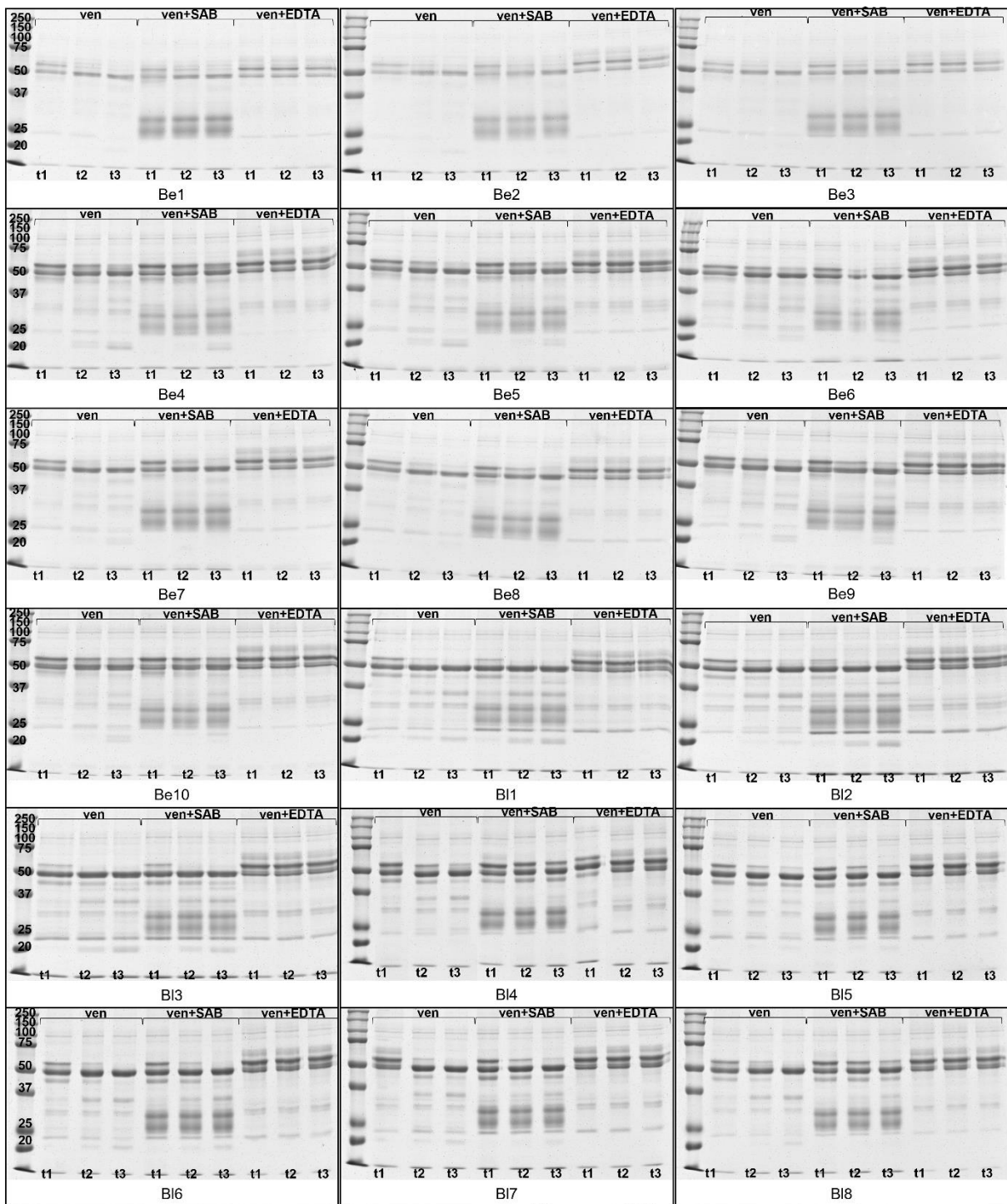
YOUNGMAN, N. J.; DEBONO, J.; DOBSON, J. S.; ZDENEK, C. N.; HARRIS, R. J.; OP DEN BROUW, B.; COIMBRA, F. C. P.; NAUDE, A.; COSTER, K.; SUNDMAN, E.; BRAUN, R.; HENDRIKX, I.; FRY, B. G. Venomous landmines: Clinical implications of extreme coagulotoxic diversification and differential neutralization by antivenom of venoms within the viperid snake genus *Bitis*. **Toxins**, 2019.

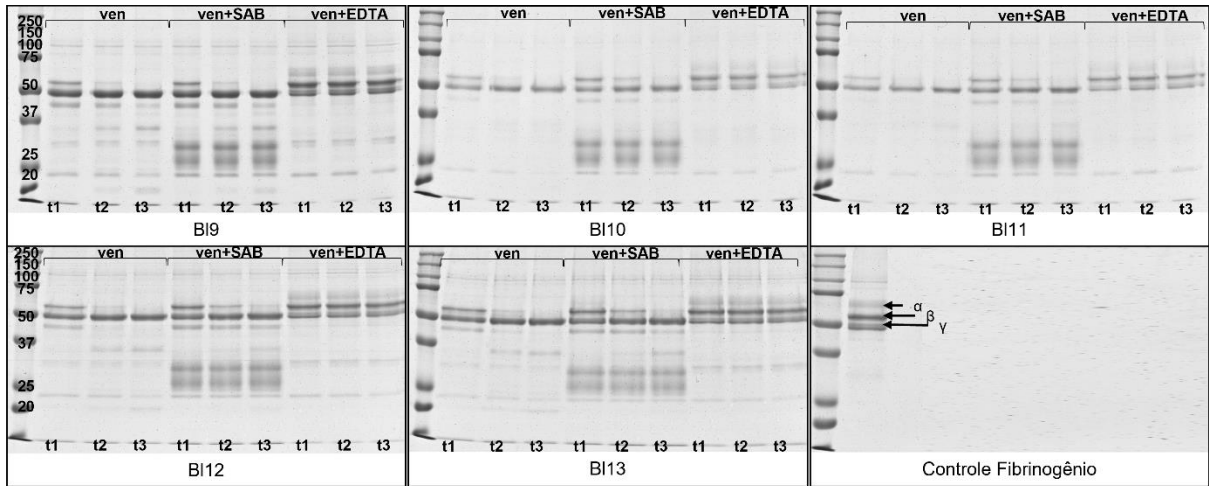
ZELANIS, A.; DE SOUZA VENTURA, J.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FURTADO, M. de F. D. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: An ontogenetic approach. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 601–609, 2007.

ZELANIS, A.; MENEZES, M. C.; KITANO, E. S.; LIBERATO, T.; TASHIMA, A. K.; PINTO, A. F. M.; SHERMAN, N. E.; HO, P. L.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Proteomic identification of gender molecular markers in *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Proteomics**, v. 139, p. 26–37, 29 abr. 2016.

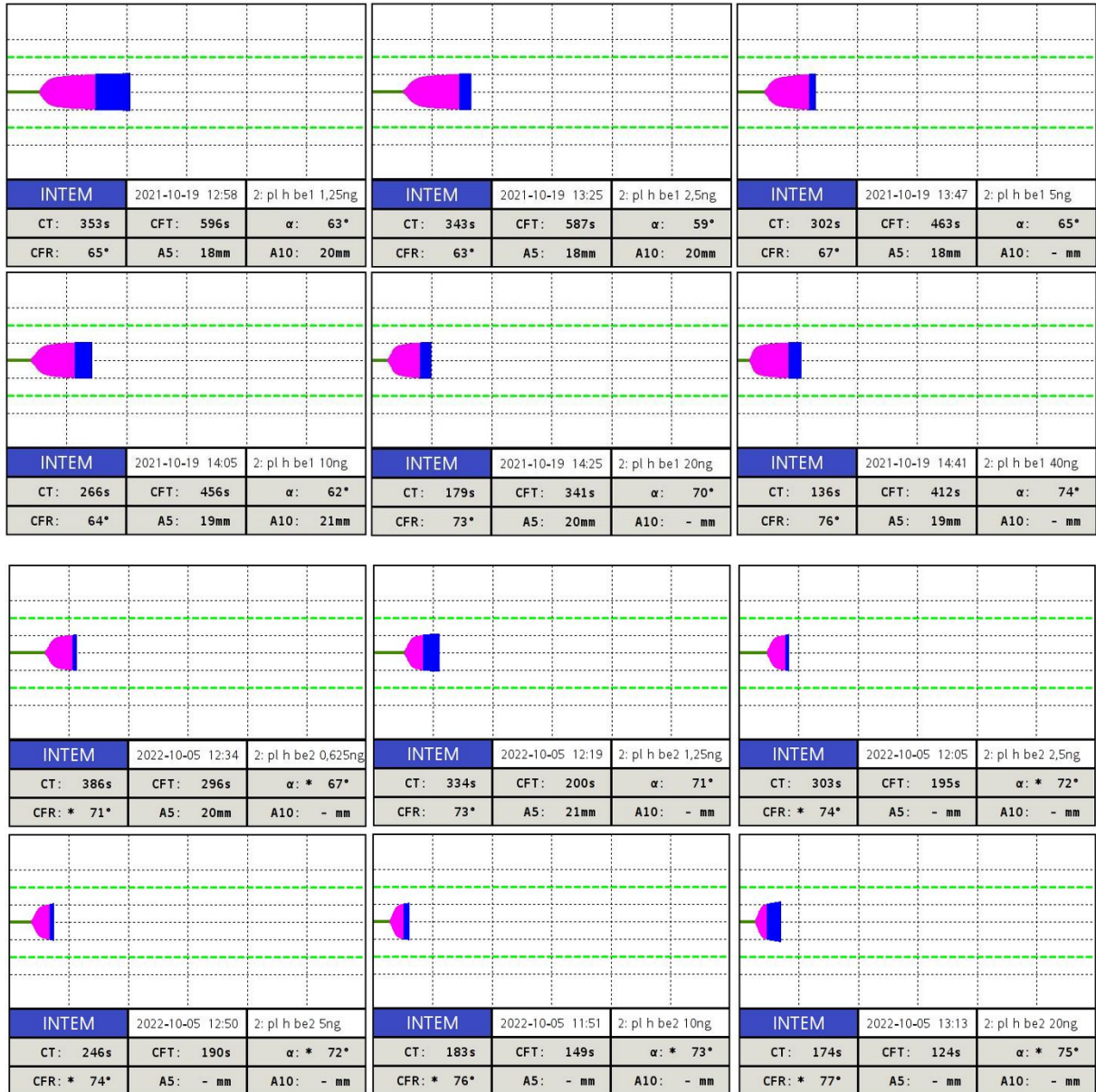
APÊNDICES

Apêndice A - Atividade fibrinogenolítica do veneno dos indivíduos de *B. erythromelas* e *B. leucurus*. As amostras de veneno (ven), a mistura veneno + soro antibotrópico (ven+SAB) e a mistura veneno + EDTA (ven+EDTA) foram incubadas a 37°C por 2 min. Em seguida, foram adicionados à mistura 200 µL de fibrinogênio humano (2 mg/mL) e incubados a 37°C. Alíquotas de 15 µL foram retiradas da reação em intervalos fixos de 5 min (t1), 30 min (t2) e 90 min (t3) e adicionadas em tampão de amostra contendo o agente redutor 2-Mercaptoetanol. As amostras foram analisadas por meio de SDS-PAGE (12%).



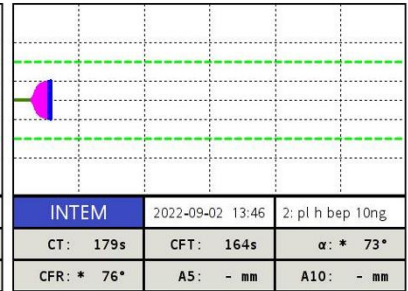
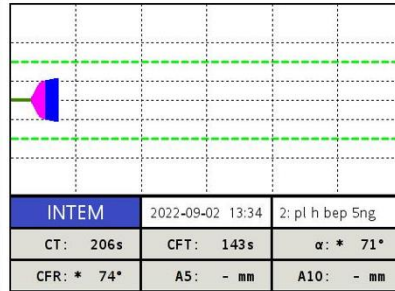
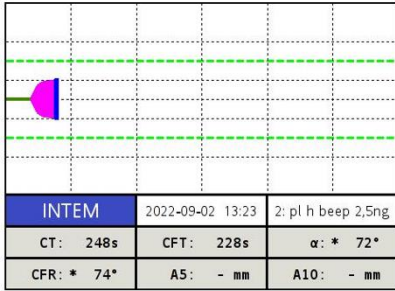
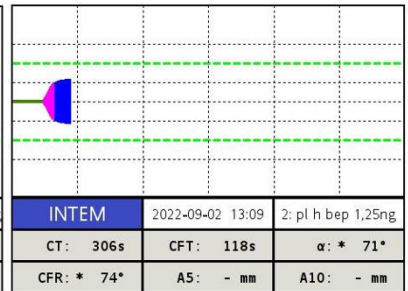
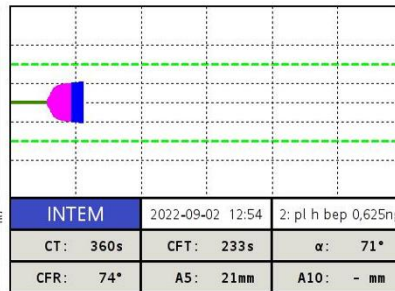
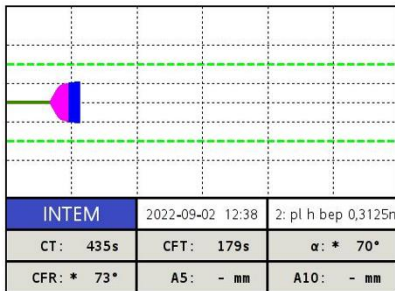
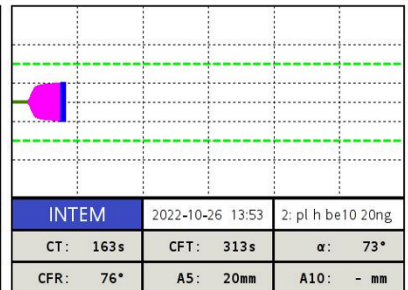
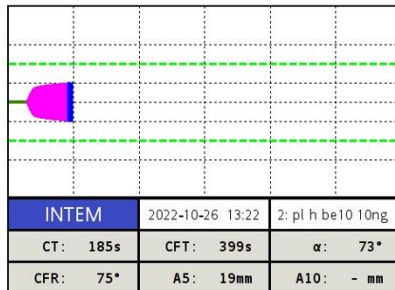
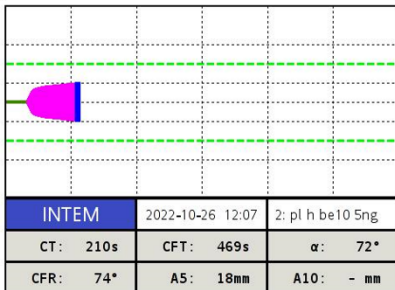
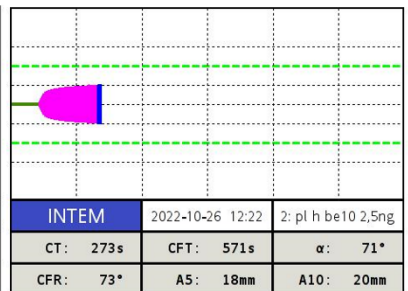
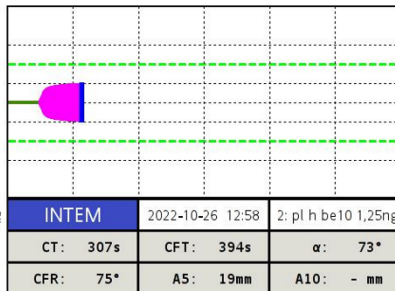
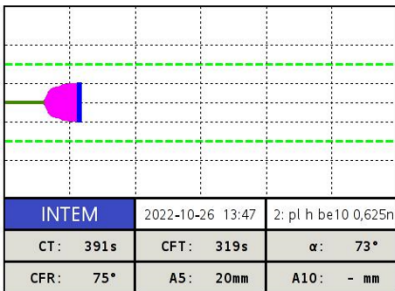
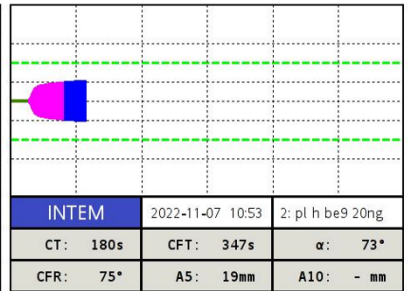
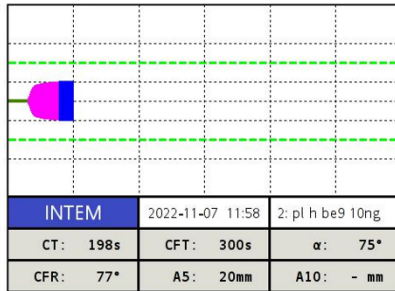
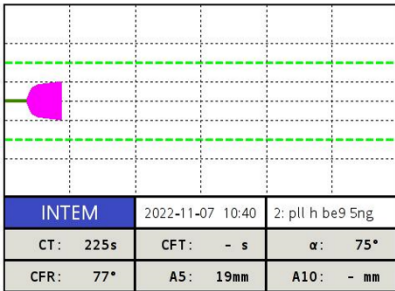
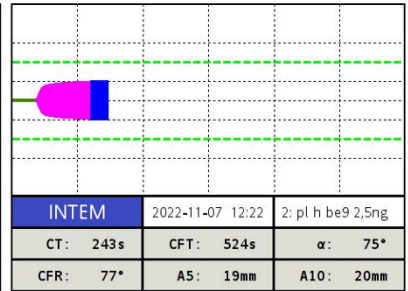
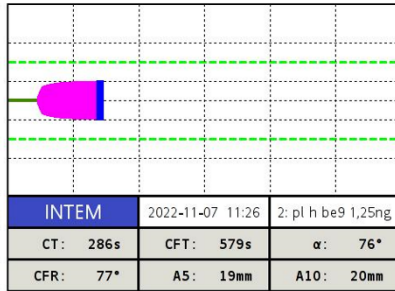
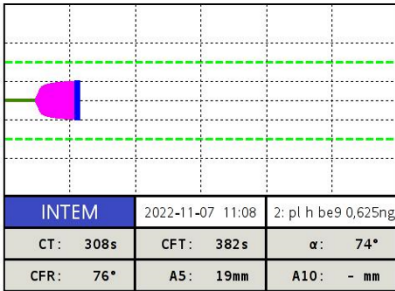


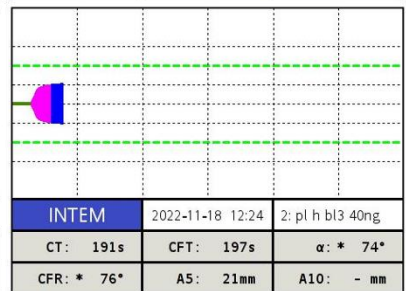
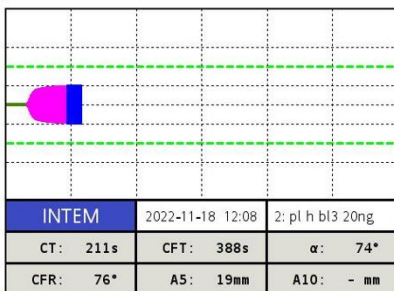
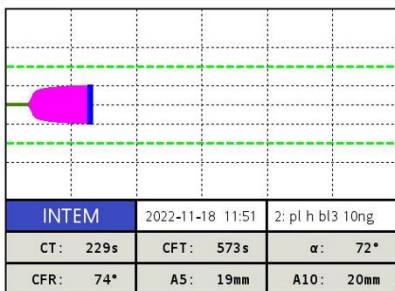
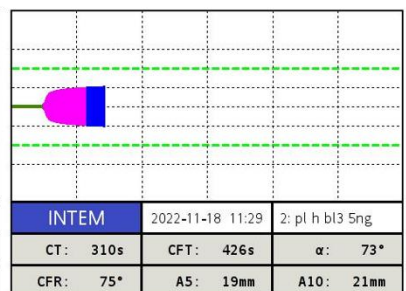
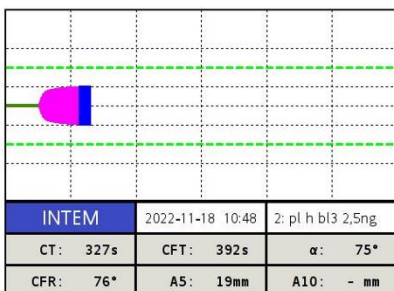
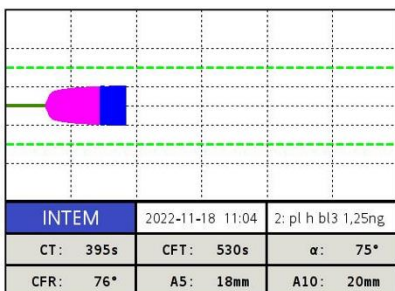
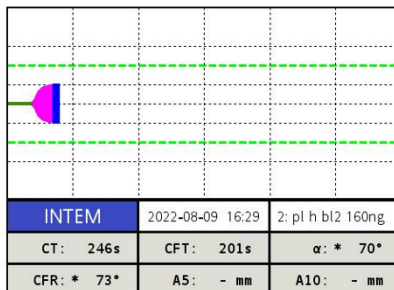
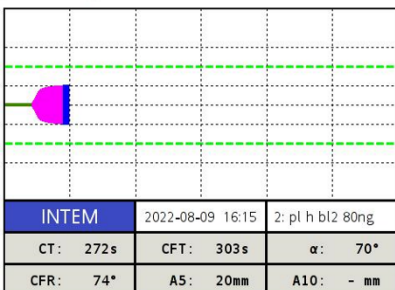
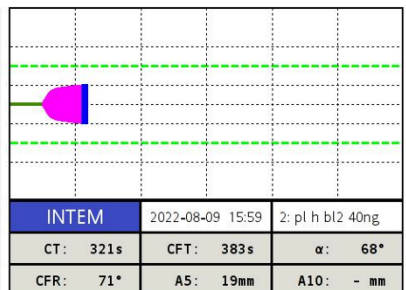
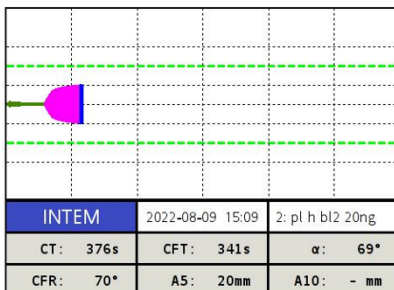
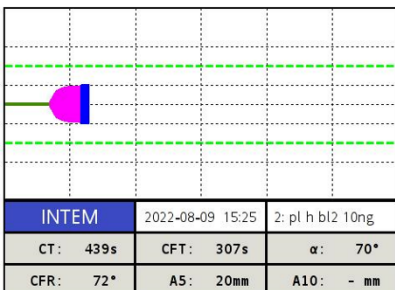
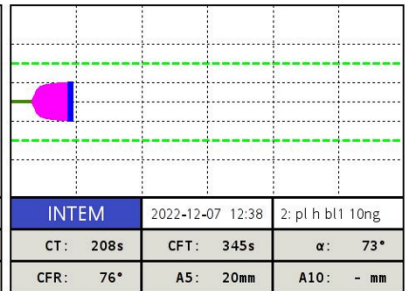
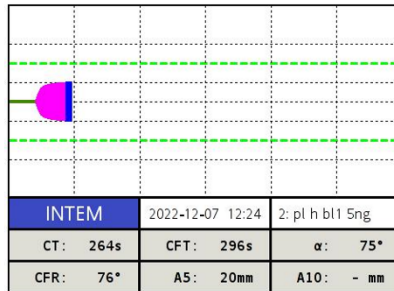
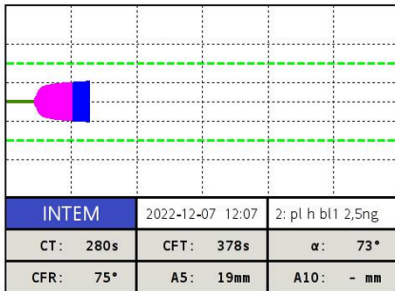
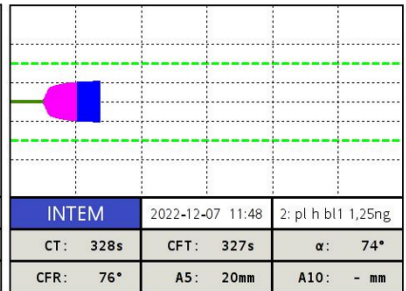
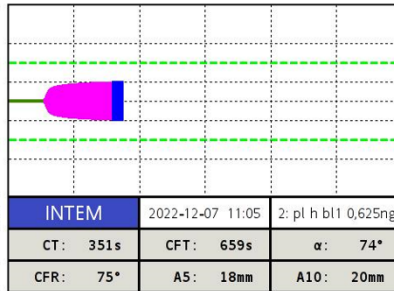
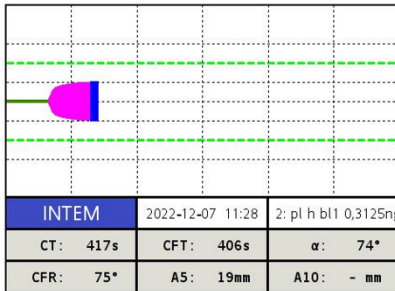
Apêndice B - Atividade Pró-Coagulante. Foram analisadas 6 doses das amostras de venenos em equipamento de tromboelastometria (ROTEM), juntamente com o CaCl_2 (20 μL), o plasma humano (260 μL) e solução salina (quantidade suficiente para completar 360 μL). Os ensaios foram realizados pelo teste de ativação por contato (INTEM).



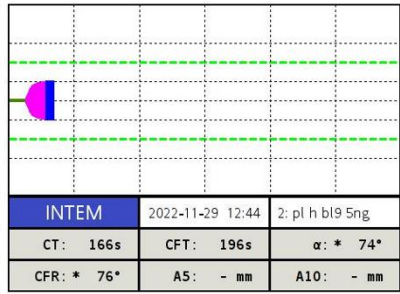
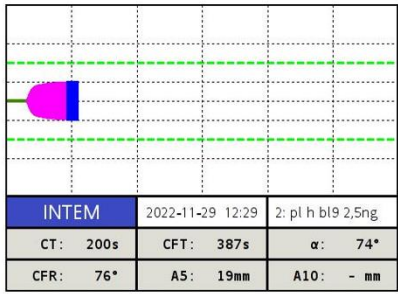
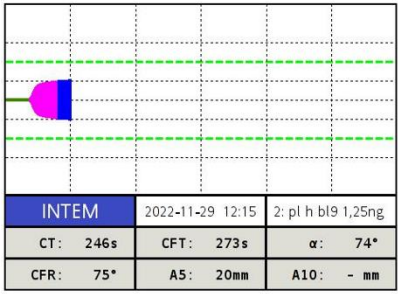
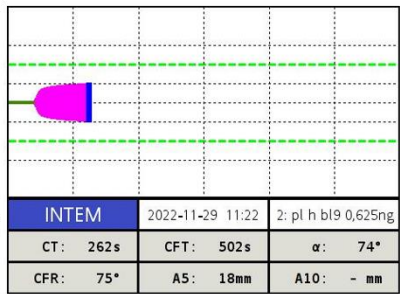
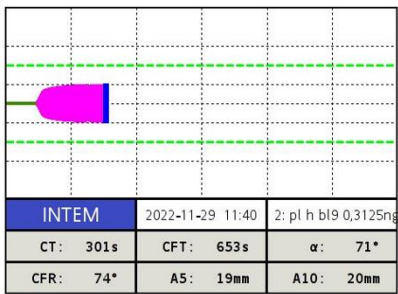
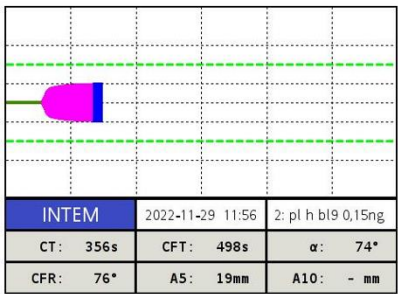
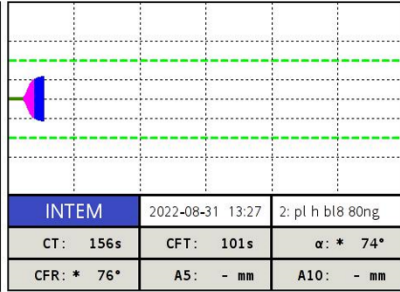
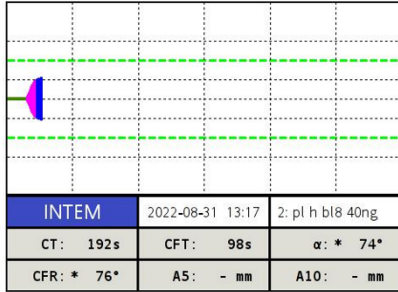
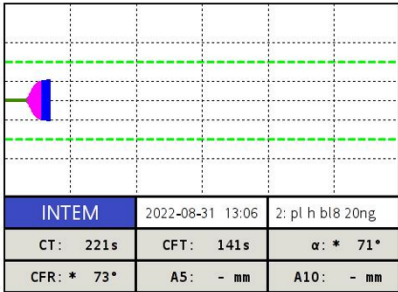
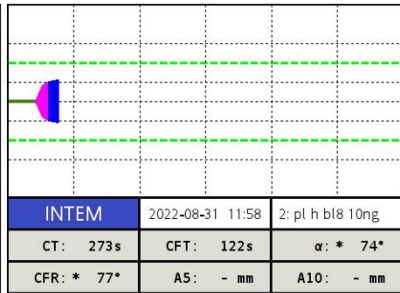
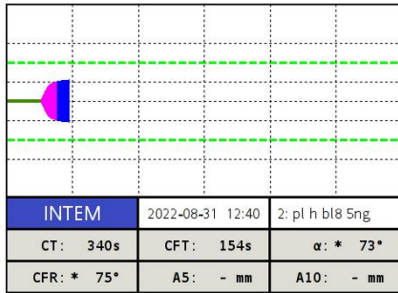
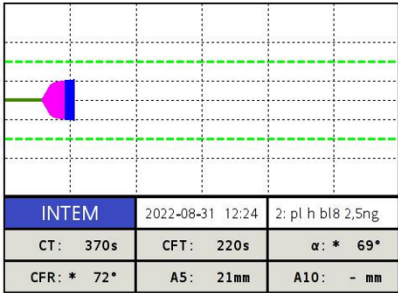
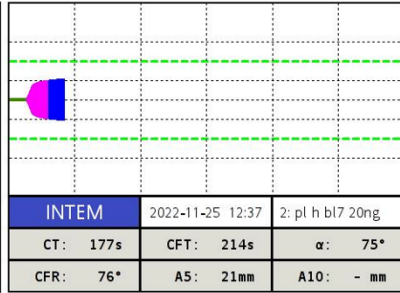
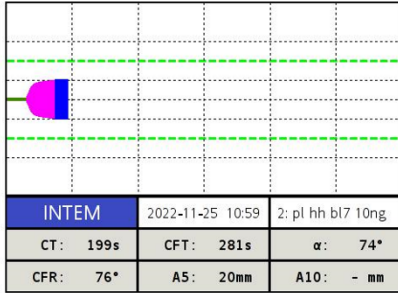
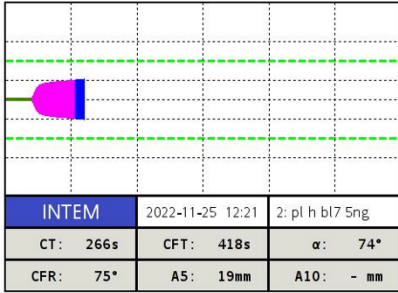
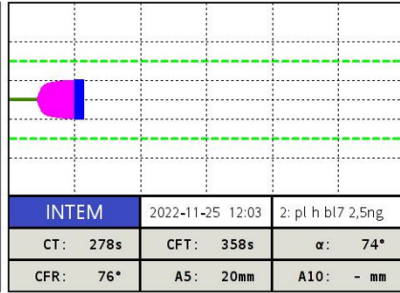
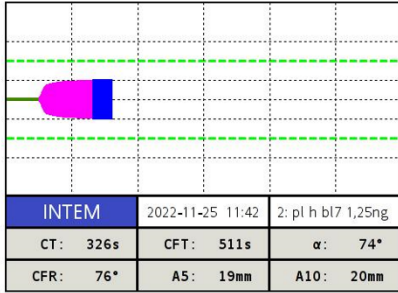
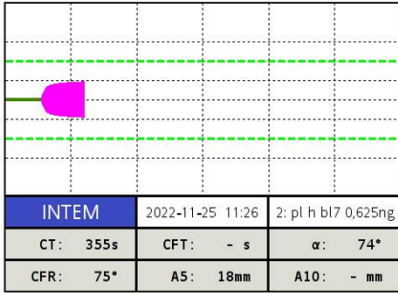
INTEM 2022-10-07 12:12 2: pl h be3 0,3125ng	INTEM 2022-10-07 11:58 2: pl h be3 0,625ng	INTEM 2022-10-07 12:28 2: pl h be3 1,25ng
CT: 430s CFT: 323s α : 72°	CT: 344s CFT: 222s α : * 71°	CT: 324s CFT: 281s α : * 71°
CFR: 73° A5: 20mm A10: - mm	CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 74° A5: 20mm A10: - mm
INTEM 2022-10-07 12:42 2: pl h be3 2,5ng	INTEM 2022-10-07 12:55 2: pl h be3 5ng	INTEM 2022-10-07 13:04 2: pl h be3 10ng
CT: 254s CFT: 202s α : * 70°	CT: 215s CFT: 107s α : * 72°	CT: 187s CFT: 174s α : * 72°
CFR: * 72° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 75° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm
INTEM 2022-10-20 12:00 2: pl h be4 0,3125ng	INTEM 2022-10-20 12:17 2: pl h be4 0,625ng	INTEM 2022-10-20 13:15 2: pl h be4 1,25ng
CT: 394s CFT: 155s α : * 71°	CT: 349s CFT: 185s α : 73°	CT: 313s CFT: 184s α : * 68°
CFR: * 74° A5: 22mm A10: - mm	CFR: 75° A5: 21mm A10: - mm	CFR: * 72° A5: 22mm A10: - mm
INTEM 2022-10-20 12:44 2: pl h be4 2,5ng	INTEM 2022-10-20 12:57 2: pl h be4 5ng	INTEM 2022-10-20 11:48 2: pl h be4 10ng
CT: 232s CFT: 158s α : * 71°	CT: 204s CFT: 156s α : * 71°	CT: 158s CFT: 100s α : * 73°
CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 77° A5: - mm A10: - mm
INTEM 2021-10-19 16:44 2: pl h be5 0,3125ng	INTEM 2021-10-19 17:06 2: pl h be5 0,625ng	INTEM 2021-10-19 17:39 2: pl h be5 1,25ng
CT: 373s CFT: 419s α : 53°	CT: 358s CFT: 447s α : 58°	CT: 278s CFT: - s α : * 61°
CFR: 57° A5: 18mm A10: - mm	CFR: 60° A5: 19mm A10: 21mm	CFR: * 63° A5: 18mm A10: - mm
INTEM 2021-10-19 17:28 2: pl h be5 2,5ng	INTEM 2021-10-19 17:54 2: pl h be5 5ng	
CT: 232s CFT: - s α : * 65°	CT: 195s CFT: - s α : * 67°	
CFR: * 69° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 68° A5: - mm A10: - mm	

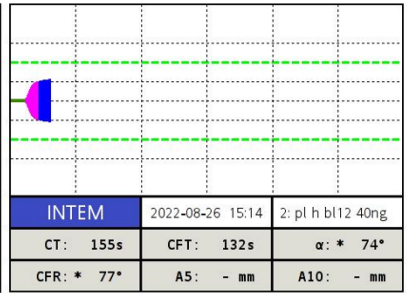
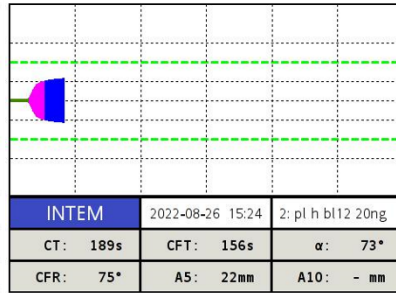
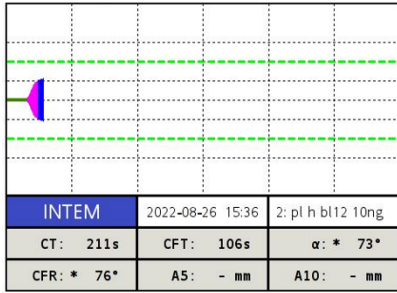
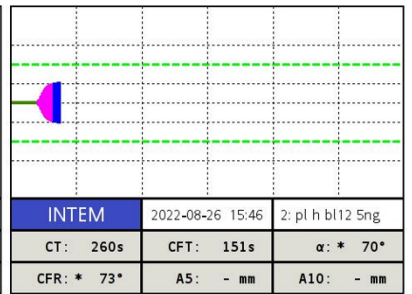
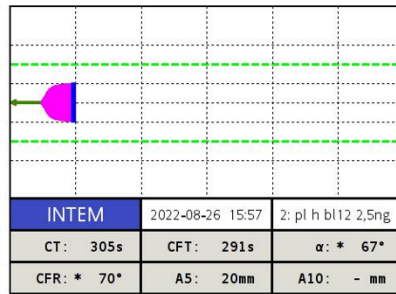
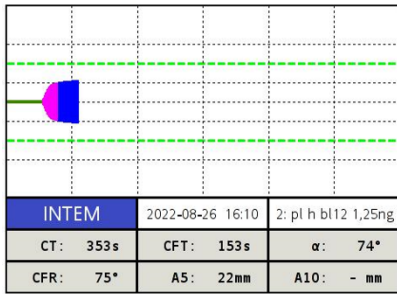
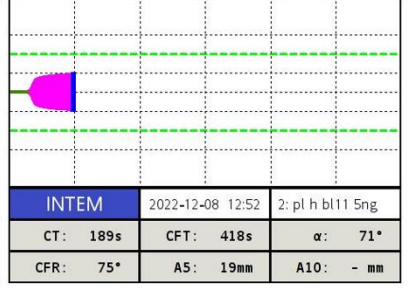
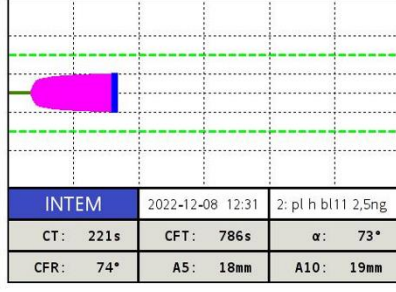
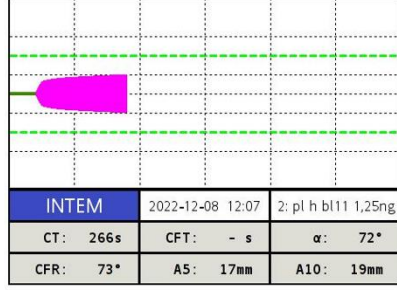
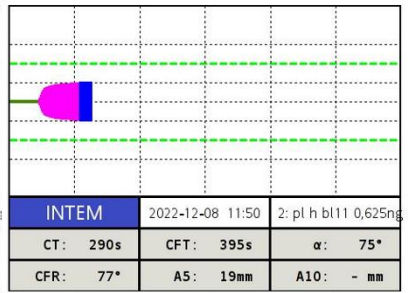
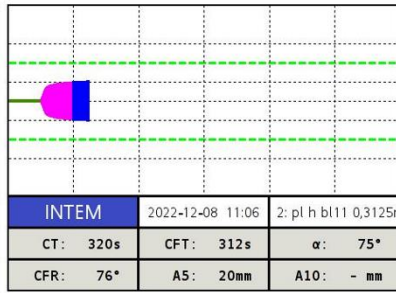
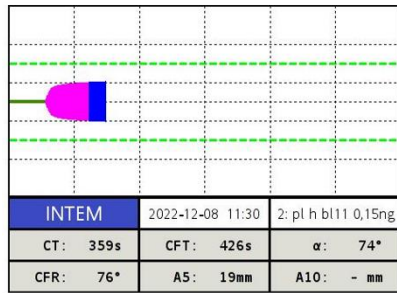
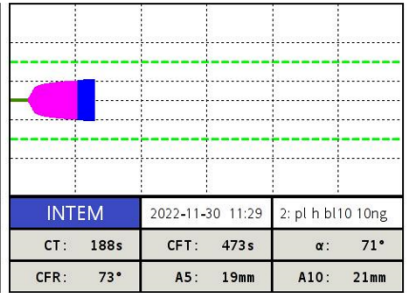
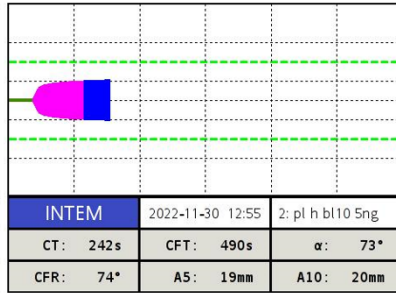
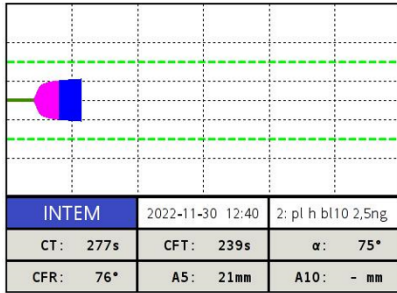
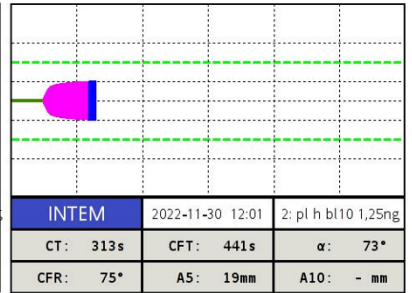
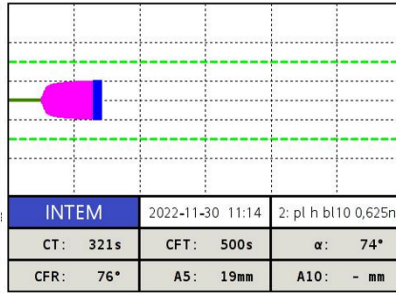
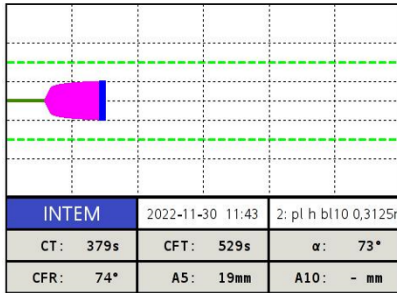
INTEM 2022-03-08 11:41 2: pl h be6 1,25ng	INTEM 2022-03-08 12:02 2: pl h be6 2,5ng	INTEM 2022-03-08 12:22 2: pl h be6 5ng
CT: 529s CFT: 281s α : 65°	CT: 436s CFT: 399s α : 61°	CT: 365s CFT: 257s α : * 65°
CFR: 67° A5: 20mm A10: - mm	CFR: 68° A5: 19mm A10: - mm	CFR: * 69° A5: 20mm A10: - mm
INTEM 2022-03-08 12:38 2: pl h be6 10ng	INTEM 2022-03-08 12:54 2: pl h be6 20ng	INTEM 2022-03-08 13:08 2: pl h be6 40ng
CT: 334s CFT: 224s α : * 68°	CT: 205s CFT: 132s α : * 72°	CT: 152s CFT: 111s α : * 72°
CFR: * 69° A5: 21mm A10: - mm	CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 76° A5: 24mm A10: - mm
INTEM 2022-10-24 12:08 2: pl h be7 1,25ng	INTEM 2022-10-24 12:25 2: pl h be7 2,5ng	INTEM 2022-10-24 12:40 2: pl h be7 5ng
CT: 426s CFT: 382s α : 69°	CT: 361s CFT: 148s α : * 71°	CT: 317s CFT: 184s α : * 70°
CFR: 72° A5: 19mm A10: - mm	CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 73° A5: 22mm A10: - mm
INTEM 2022-10-24 12:55 2: pl h be7 10ng	INTEM 2022-10-24 13:08 2: pl h be7 20ng	INTEM 2022-10-24 13:19 2: pl h be7 40ng
CT: 252s CFT: 136s α : * 73°	CT: 229s CFT: 215s α : * 71°	CT: 199s CFT: 170s α : * 73°
CFR: * 75° A5: 23mm A10: - mm	CFR: * 73° A5: - mm A10: - mm	CFR: * 75° A5: - mm A10: - mm
INTEM 2021-10-22 13:08 2: pl h be8 0,3125ng	INTEM 2021-10-22 13:31 2: pl h be8 0,625ng	INTEM 2021-10-22 13:55 2: pl h be8 1,25ng
CT: 451s CFT: 531s α : 61°	CT: 436s CFT: 458s α : 59°	CT: 351s CFT: 271s α : 61°
CFR: 63° A5: 19mm A10: 20mm	CFR: 64° A5: 19mm A10: - mm	CFR: 64° A5: 21mm A10: - mm
INTEM 2021-10-22 14:12 2: pl h be8 2,5ng	INTEM 2021-10-22 14:31 2: pl h be8 5ng	INTEM 2021-10-22 14:45 2: pl h be8 10ng
CT: 271s CFT: 273s α : 63°	CT: 247s CFT: 200s α : * 66°	CT: 200s CFT: 296s α : 65°
CFR: 66° A5: 20mm A10: - mm	CFR: * 70° A5: 21mm A10: - mm	CFR: 69° A5: 20mm A10: - mm





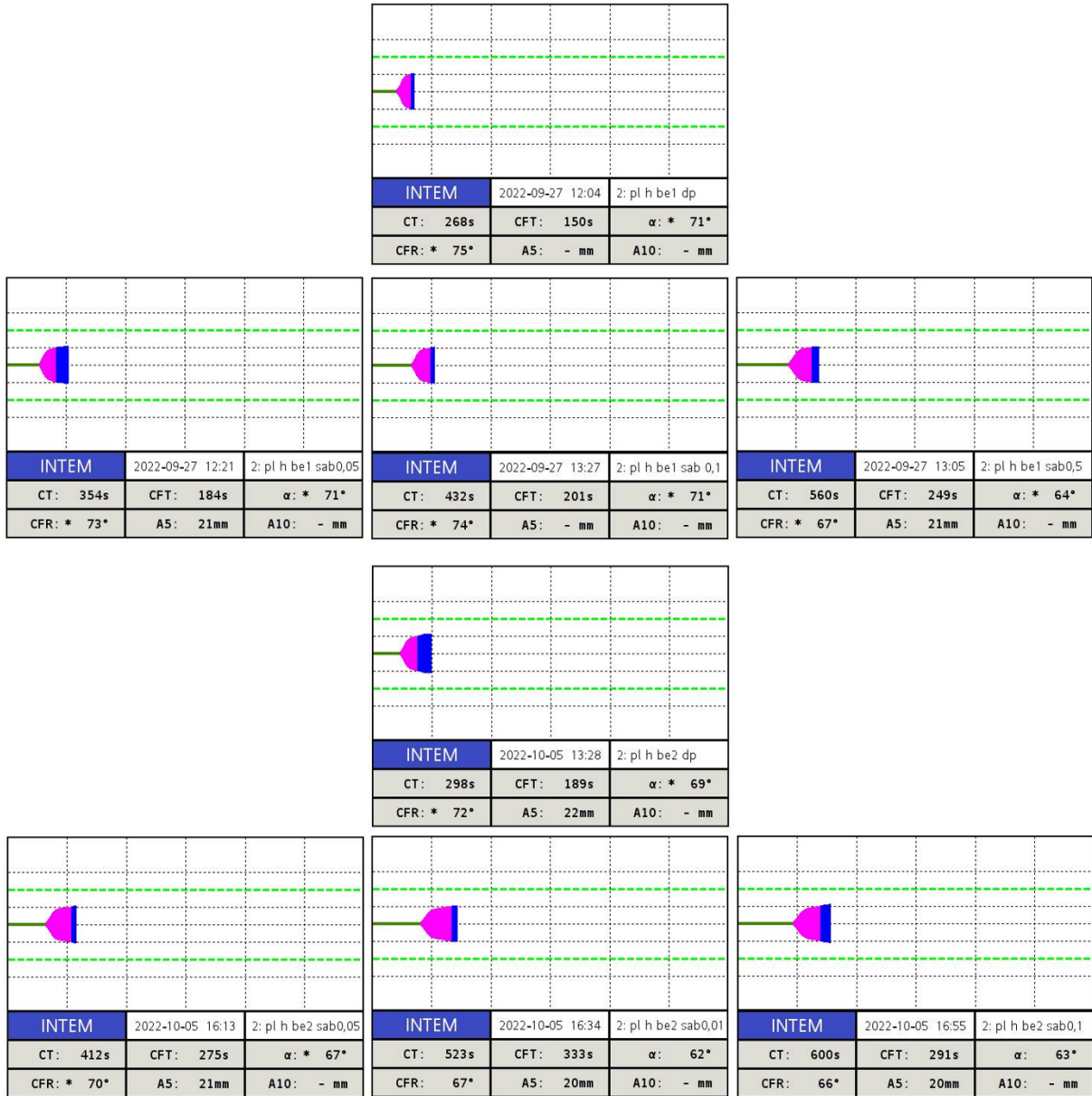
INTEM 2022-08-11 11:56 2: pl h bl4 1,25ng CT: 333s CFT: 275s α: 72° CFR: 76° A5: 20mm A10: - mm	INTEM 2022-08-11 12:12 2: pl h bl4 2,5ng CT: 316s CFT: 278s α: 73° CFR: 74° A5: 20mm A10: - mm	INTEM 2022-08-11 12:28 2: pl h bl4 5ng CT: 289s CFT: 220s α: * 71° CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm
INTEM 2022-08-11 12:42 2: pl h bl4 10ng CT: 221s CFT: 259s α: * 73° CFR: * 75° A5: 20mm A10: - mm	INTEM 2022-08-11 12:54 2: pl h bl4 20ng CT: 212s CFT: 181s α: 74° CFR: 75° A5: 21mm A10: - mm	INTEM 2022-08-11 13:07 2: pl h bl4 40ng CT: 170s CFT: 233s α: 74° CFR: 75° A5: 21mm A10: - mm
INTEM 2022-04-06 13:08 2: pl h bl5 20ng CT: 479s CFT: 249s α: * 59° CFR: * 61° A5: 21mm A10: - mm	INTEM 2022-04-06 13:27 2: pl h bl5 40ng CT: 416s CFT: 295s α: * 54° CFR: * 58° A5: 20mm A10: - mm	INTEM 2022-04-06 12:01 2: pl h bl5 80ng CT: 306s CFT: 402s α: 56° CFR: 58° A5: 19mm A10: - mm
INTEM 2022-04-06 13:57 2: pl h bl5 160ng CT: 278s CFT: 165s α: * 65° CFR: * 68° A5: 23mm A10: - mm	INTEM 2022-04-06 14:10 2: pl h bl5 320ng CT: 188s CFT: 176s α: 74° CFR: 75° A5: 22mm A10: - mm	
INTEM 2022-11-21 11:57 2: pl h bl6 0,625ng CT: 322s CFT: 390s α: 72° CFR: 74° A5: 19mm A10: - mm	INTEM 2022-11-21 12:14 2: pl h bl6 1,25ng CT: 295s CFT: 279s α: 77° CFR: 79° A5: 20mm A10: - mm	INTEM 2022-11-21 11:34 2: pl h bl6 2,5ng CT: 280s CFT: 229s α: * 74° CFR: * 77° A5: 22mm A10: - mm
INTEM 2022-11-21 10:48 2: pl h bl6 5ng CT: 212s CFT: 338s α: 75° CFR: 76° A5: 20mm A10: - mm	INTEM 2022-11-21 10:36 2: pl h bl6 10ng CT: 187s CFT: 374s α: 73° CFR: 75° A5: 19mm A10: - mm	INTEM 2022-11-21 11:46 2: pl h bl6 20ng CT: 166s CFT: 382s α: 70° CFR: 75° A5: 19mm A10: - mm

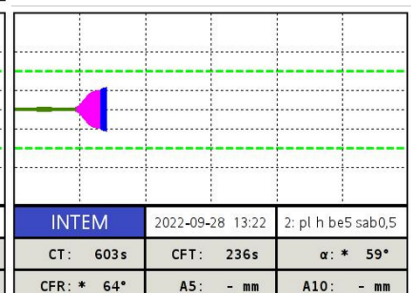
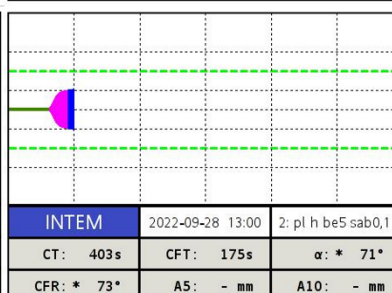
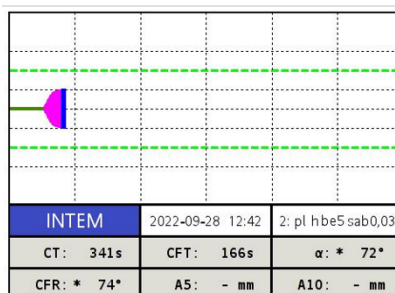
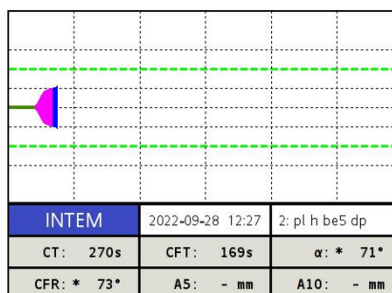
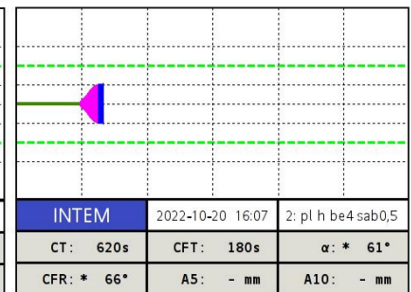
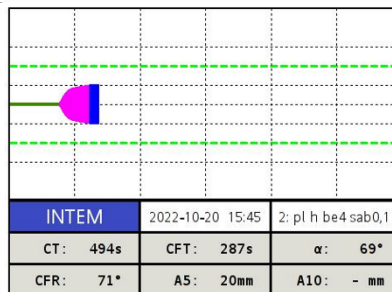
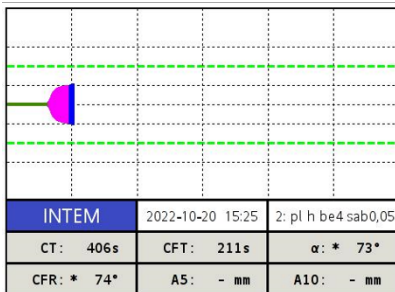
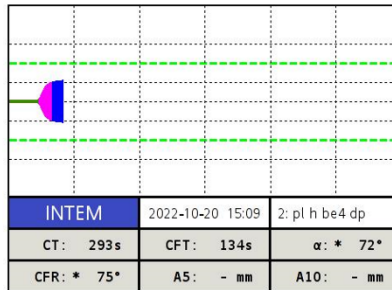
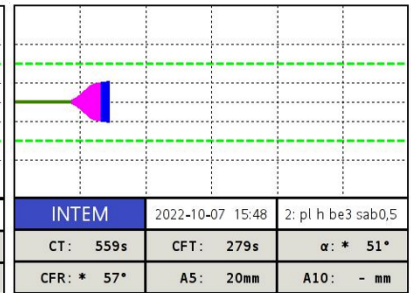
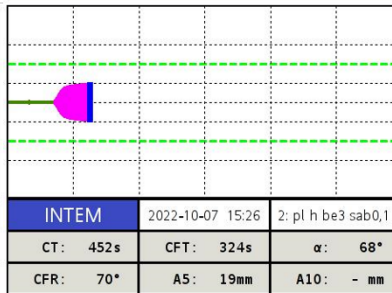
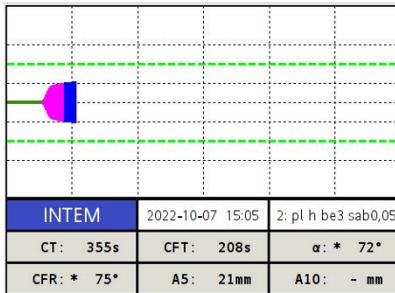
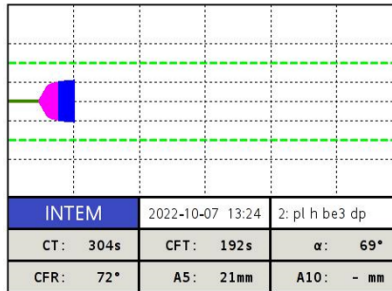


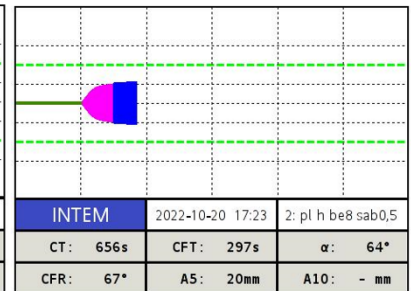
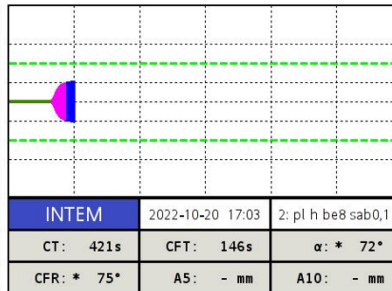
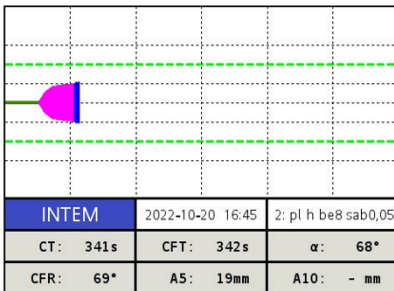
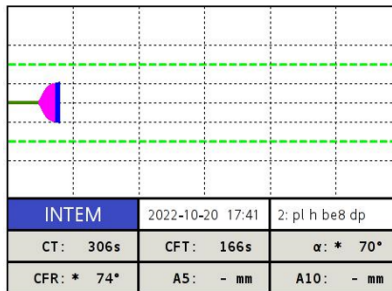
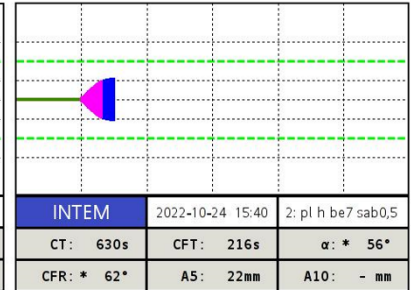
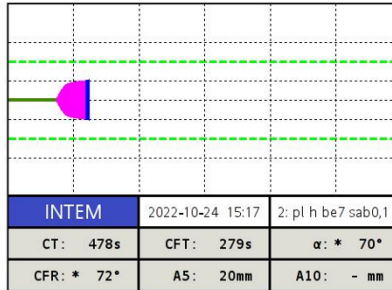
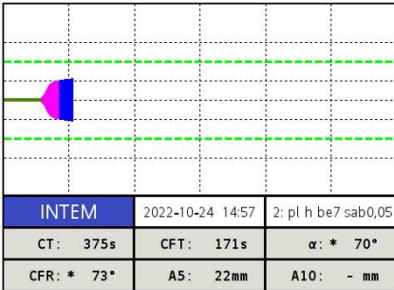
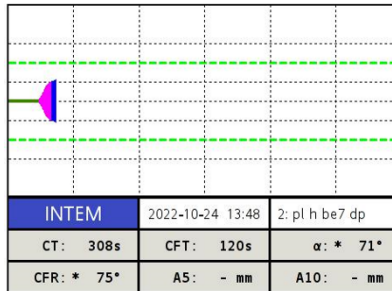
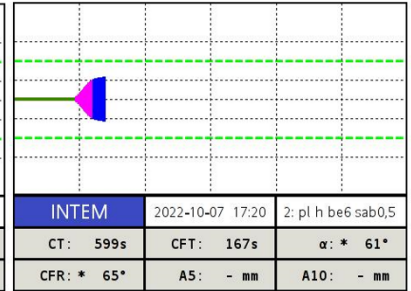
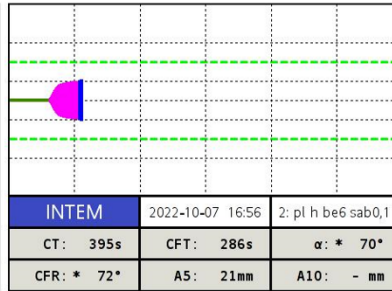
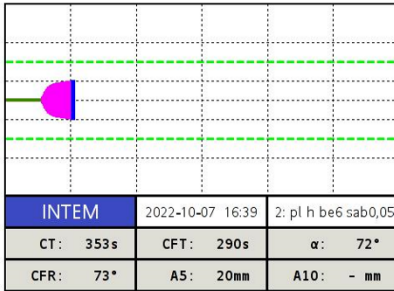
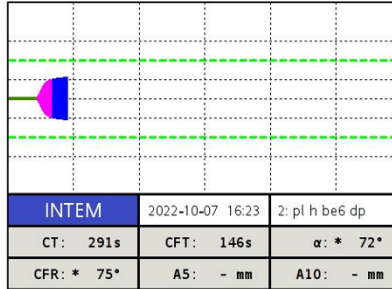


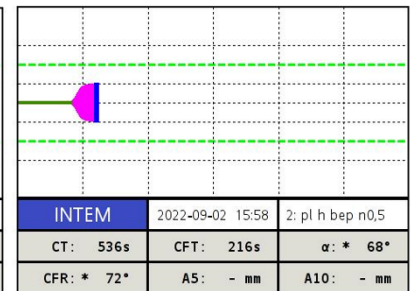
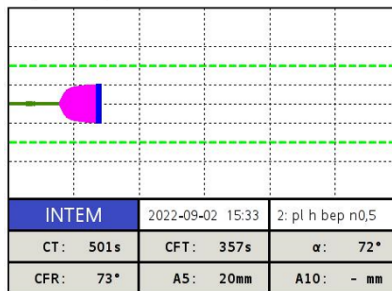
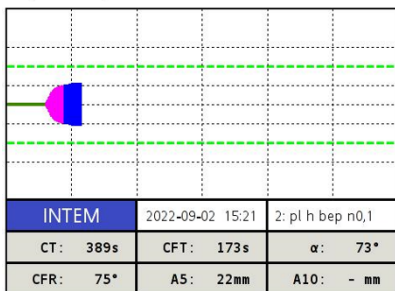
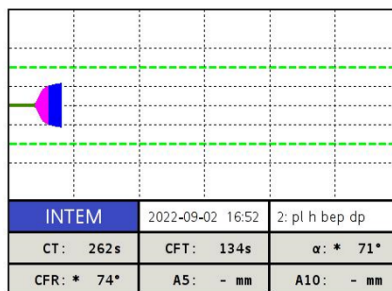
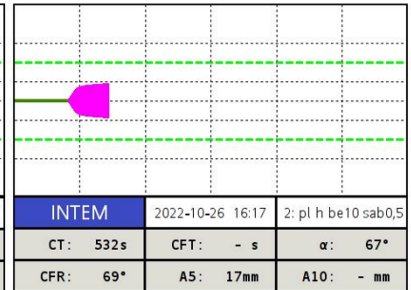
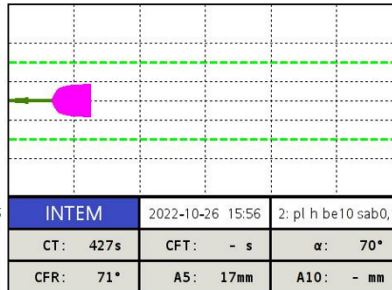
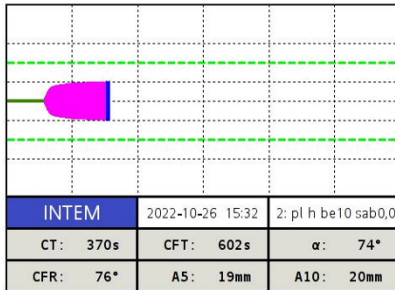
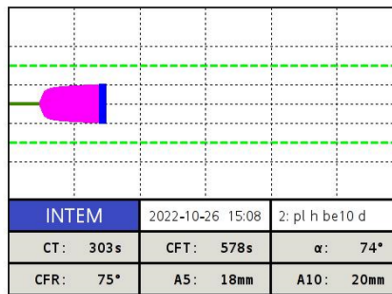
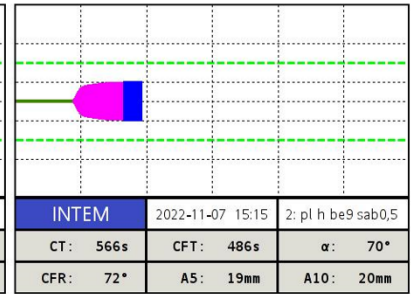
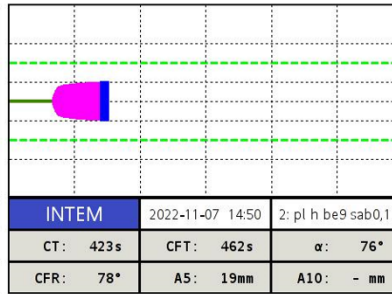
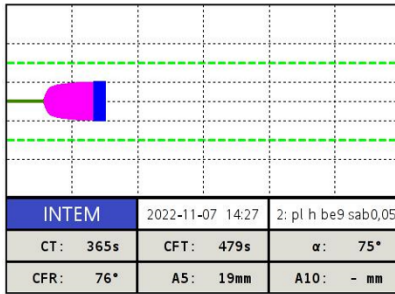
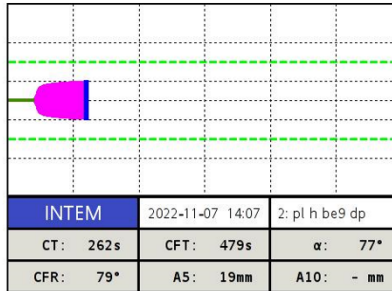
INTEM 2022-07-21 15:15 2: pl h bl13 2,5ng CT: 355s CFT: 228s α : 71° CFR: 73° A5: 21mm A10: - mm	INTEM 2022-07-21 15:32 2: pl h bl13 5ng CT: 315s CFT: 228s α : * 71° CFR: * 73° A5: - mm A10: - mm	INTEM 2022-07-21 15:47 2: pl h bl13 10ng CT: 257s CFT: 203s α : * 72° CFR: * 75° A5: 21mm A10: - mm
INTEM 2022-07-21 16:15 2: pl h bl13 20ng CT: 216s CFT: 237s α : 69° CFR: 73° A5: 21mm A10: - mm	INTEM 2022-07-21 15:03 2: pl h bl13 40ng CT: 195s CFT: 214s α : * 74° CFR: * 76° A5: - mm A10: - mm	INTEM 2022-07-21 16:28 2: pl h bl13 80ng CT: 170s CFT: 161s α : * 74° CFR: * 75° A5: - mm A10: - mm
INTEM 2022-09-01 12:15 2: pl h blp 1,25ng CT: 372s CFT: 297s α : 71° CFR: 73° A5: 20mm A10: - mm	INTEM 2022-09-01 12:41 2: pl h blp 2,5ng CT: 350s CFT: 334s α : 71° CFR: 73° A5: 20mm A10: - mm	INTEM 2022-09-01 12:56 2: pl h blp 5ng CT: 256s CFT: 128s α : * 69° CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm
INTEM 2022-09-01 13:08 2: pl h blp 10ng CT: 225s CFT: 211s α : * 70° CFR: * 73° A5: - mm A10: - mm	INTEM 2022-09-01 13:19 2: pl h blp 20ng CT: 186s CFT: 118s α : * 73° CFR: * 76° A5: - mm A10: - mm	INTEM 2022-09-01 13:29 2: pl h blp 40ng CT: 169s CFT: 126s α : * 74° CFR: * 76° A5: - mm A10: - mm
INTEM 2022-08-09 12:17 2: pl h bj 2,5ng CT: 406s CFT: 220s α : * 71° CFR: * 74° A5: 21mm A10: - mm	INTEM 2022-08-09 11:43 2: pl h bj 5ng CT: 374s CFT: 179s α : * 75° CFR: * 77° A5: - mm A10: - mm	INTEM 2022-08-09 12:56 2: pl h bj 10ng CT: 336s CFT: 367s α : 71° CFR: 72° A5: 19mm A10: - mm
INTEM 2022-08-09 13:12 2: pl h bj 20ng CT: 317s CFT: 274s α : 72° CFR: 74° A5: 21mm A10: - mm	INTEM 2022-08-09 13:26 2: pl h bj 40ng CT: 266s CFT: 159s α : * 73° CFR: * 76° A5: - mm A10: - mm	INTEM 2022-08-09 13:37 2: pl h bj 80ng CT: 234s CFT: 222s α : * 72° CFR: * 74° A5: - mm A10: - mm

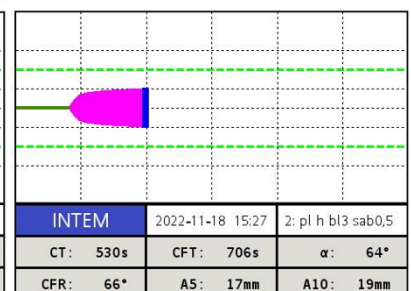
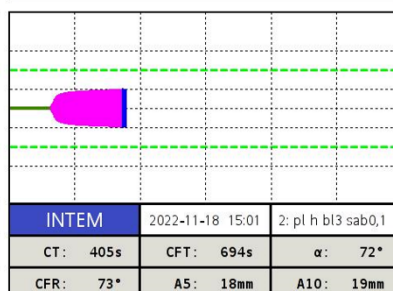
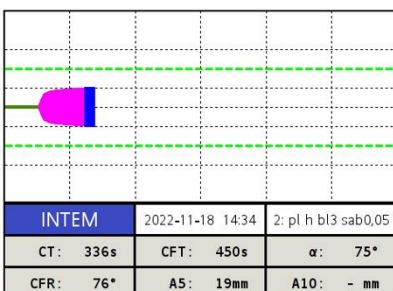
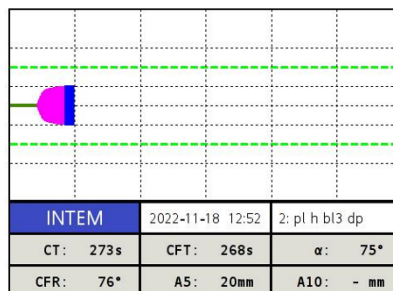
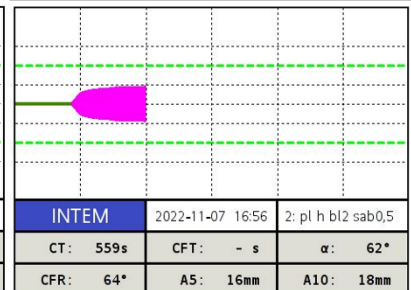
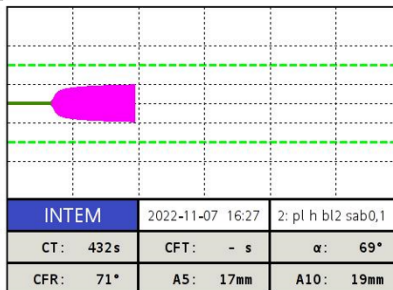
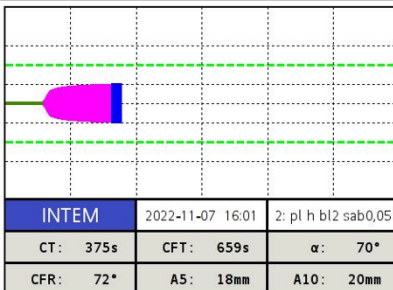
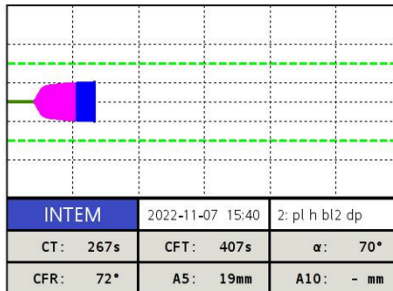
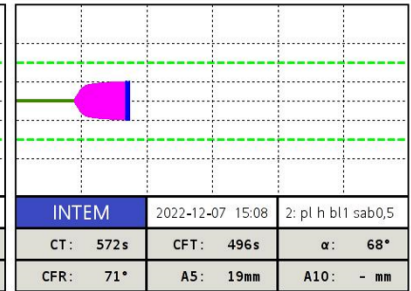
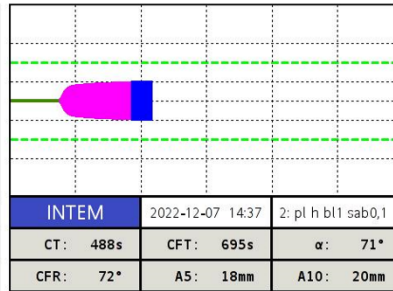
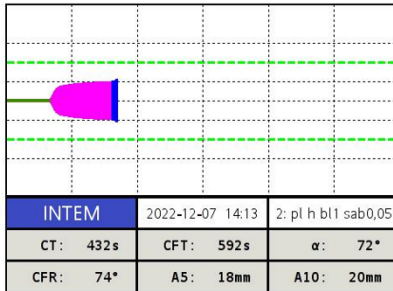
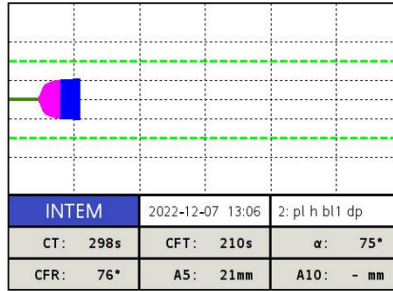
Apêndice C - Neutralização da atividade pró-coagulante pelo soro antibotrópico. Foi incubada a DP50 de cada uma das amostras de venenos em equipamento de tromboelastometria (ROTEM), juntamente com o CaCl₂ (20 µL), o plasma humano (260 µL), doses fixas de soro antibotrópico (0,05 µL, 0,1 µL e 0,5 µL) e solução salina 0,9% (quantidade suficiente para completar 360 µL). Os ensaios foram realizados pelo teste de ativação por contato (INTEM).

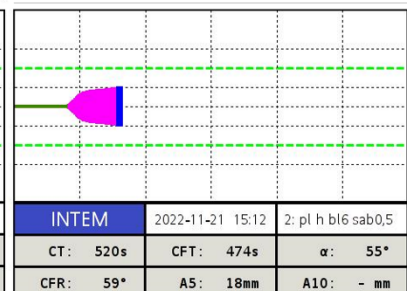
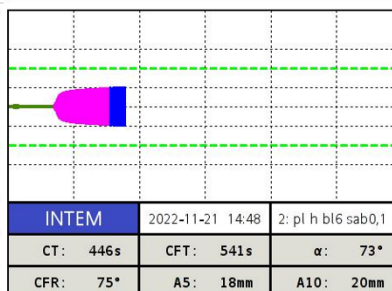
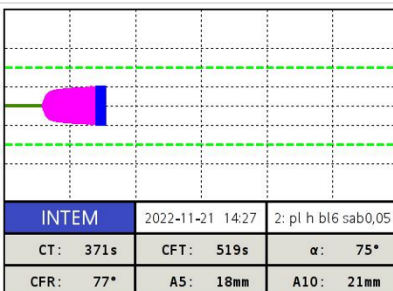
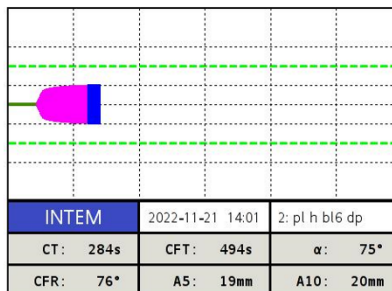
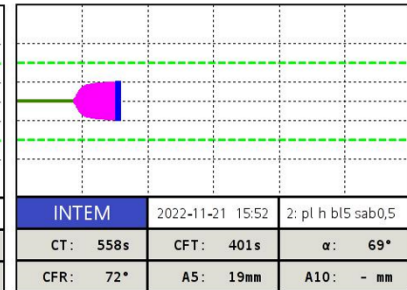
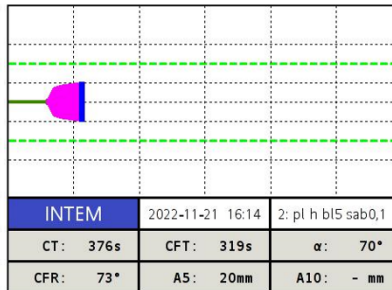
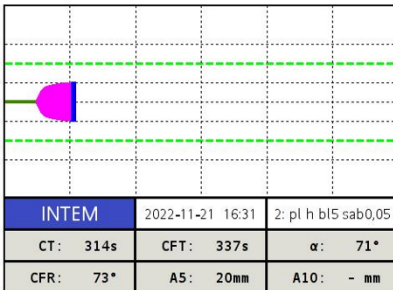
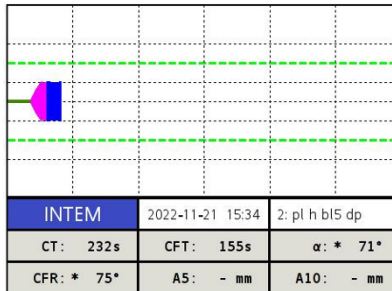
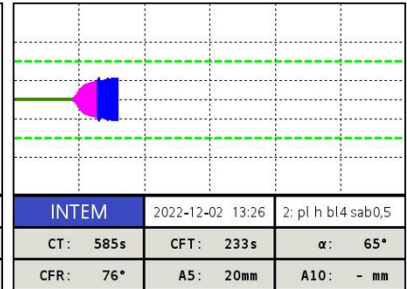
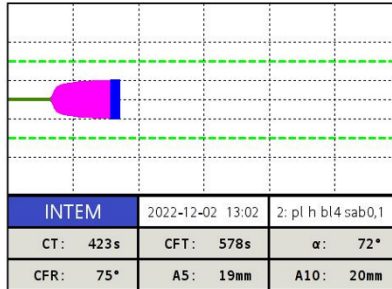
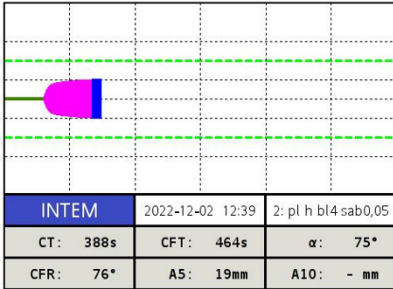
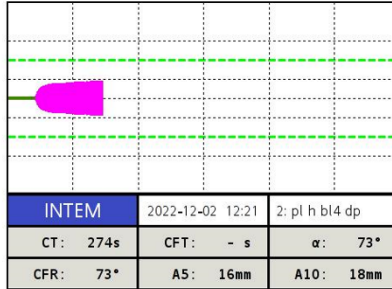


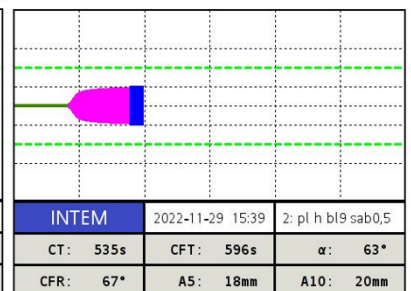
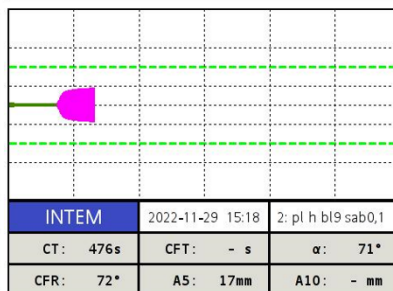
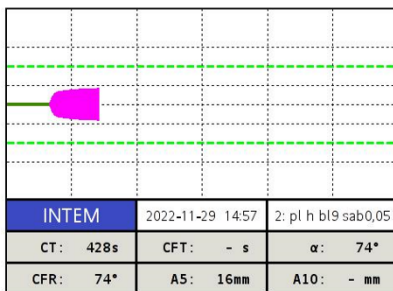
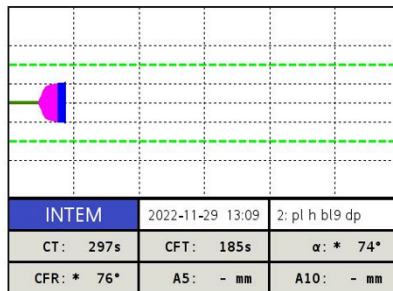
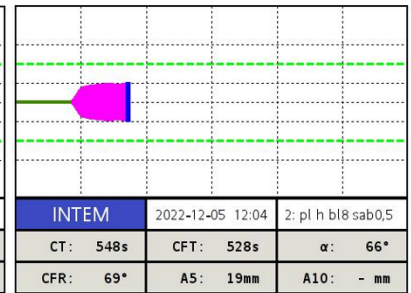
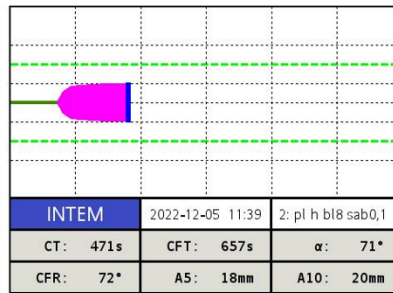
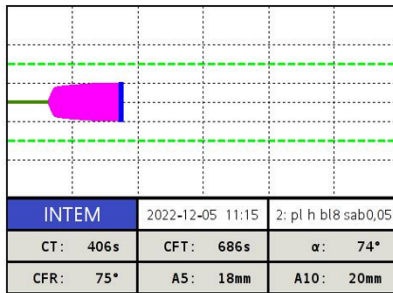
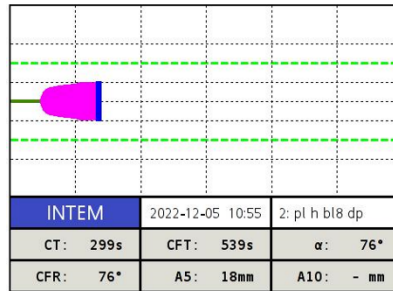
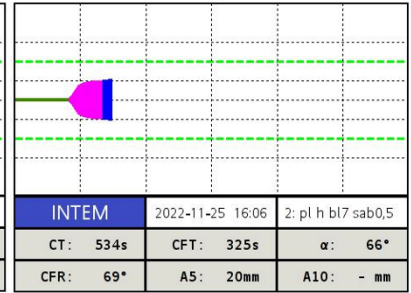
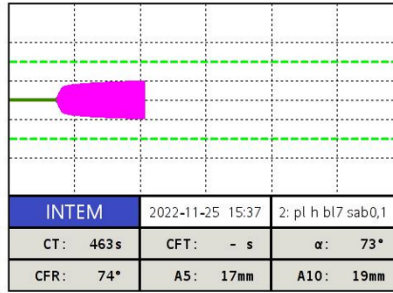
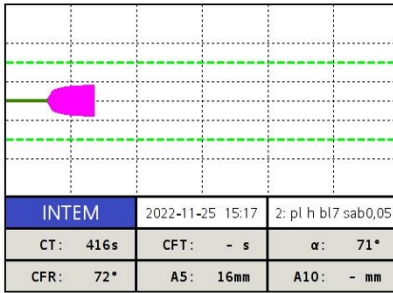
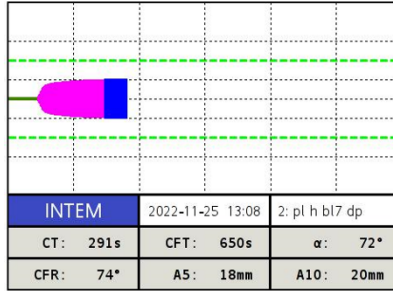


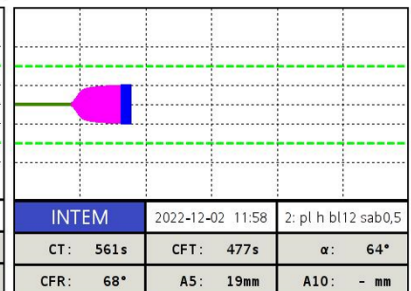
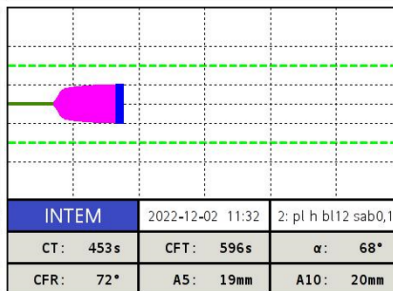
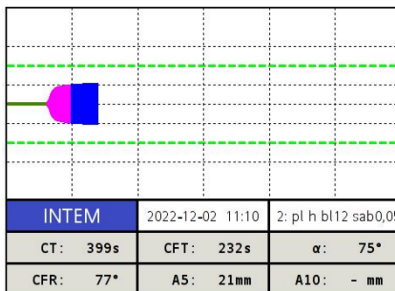
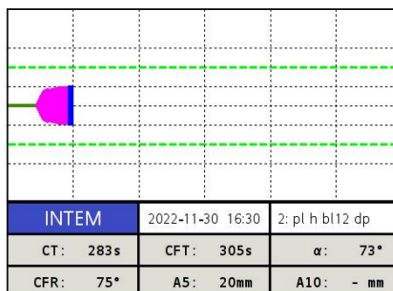
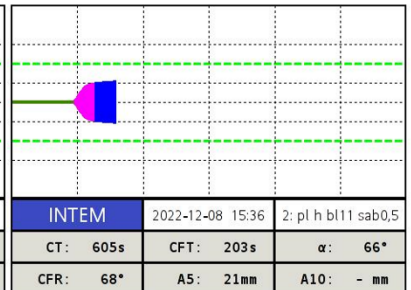
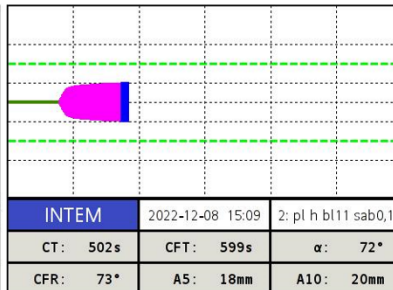
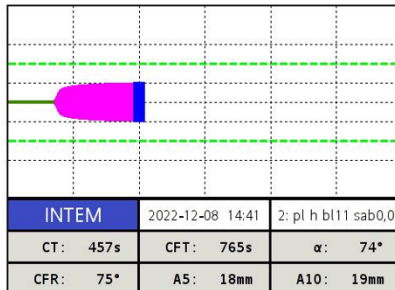
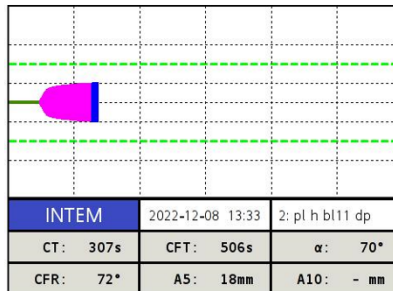
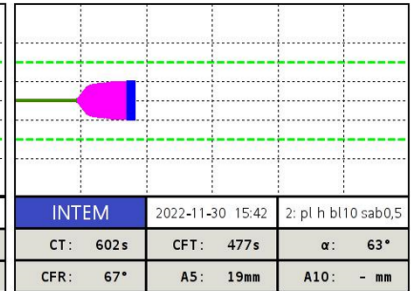
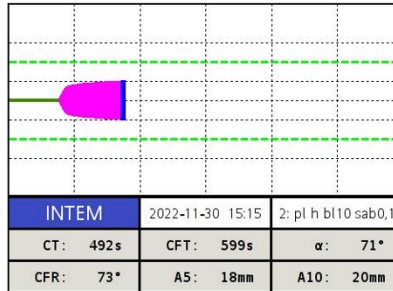
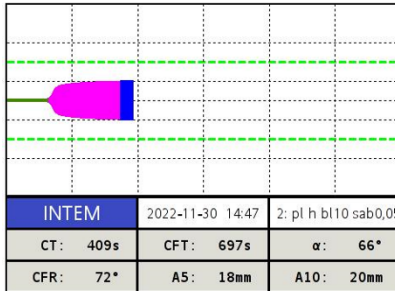
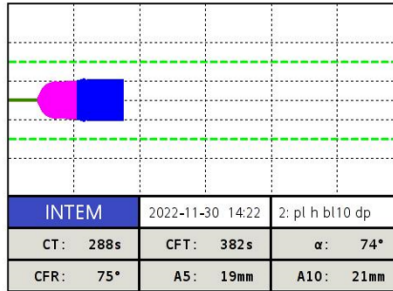


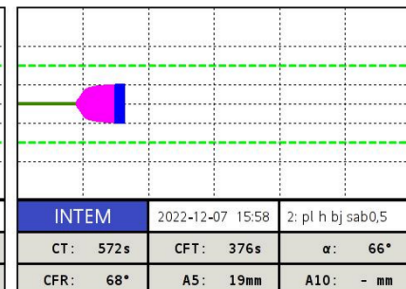
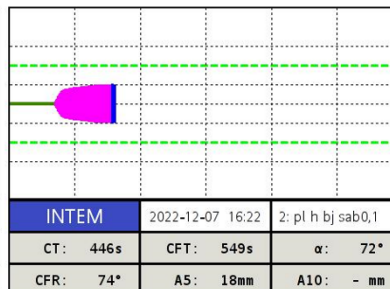
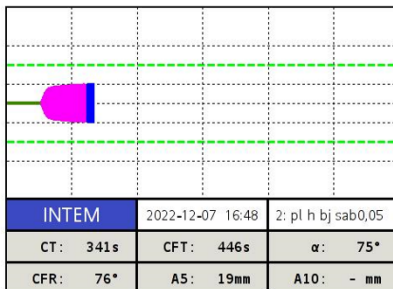
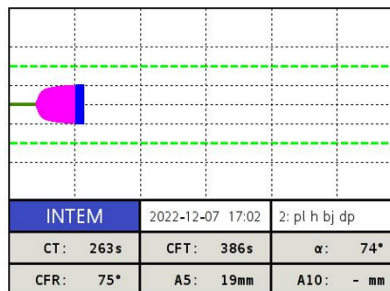
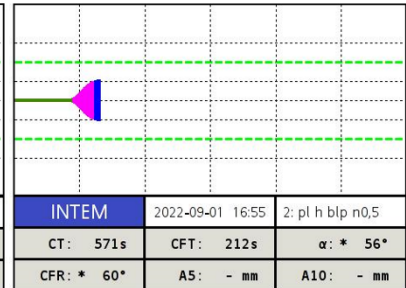
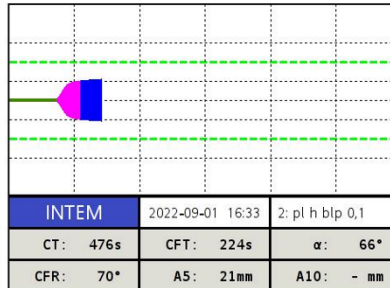
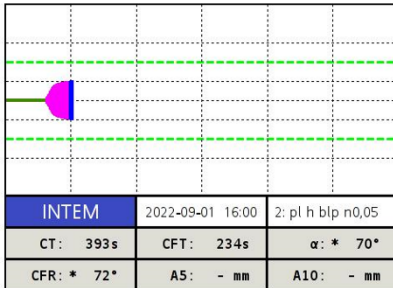
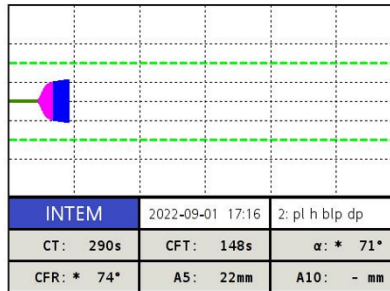
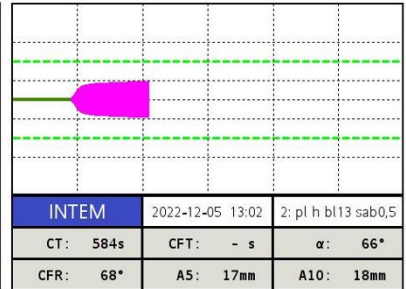
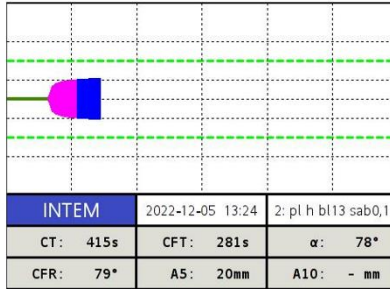
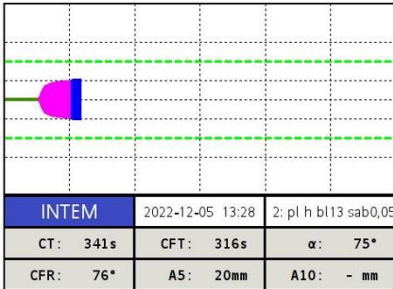
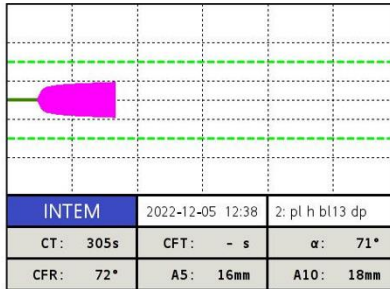












Apêndice D - Informações dos animais utilizados no estudo.

<i>B. erythromelas</i>					
Amostra	ID	Peso (g)	Cumprimento (cm)	Sexo	Localização
Be1	1401-02	400	80-89	♀	Ibitira - BA
Be2	1401-05	80	60,5-70	♂	Ibitira - BA
Be3	1502-05	300	78-86,5	♀	Ibitira - BA
Be4	1601-05	76	55-64	♂	Ibitira - BA
Be5	1601-08	254	77-86	♀	Ibitira - BA
Be6	0904	356	86-95	♀	Ibitira - BA
Be7	0904	325	81-90	♀	Ibitira - BA
Be8	1109	585	86-96,5	♀	Ibitira - BA
Be9	1201-04	280	72-81,5	♂	Ibitira - BA
Be10	1401-08	210	70-81,5	♀	Ibitira - BA

<i>B. leucurus</i>					
Amostra	ID	Peso (g)	Cumprimento (cm)	Sexo	Localização
Bl1	0901-06	1615	150-169,3	♀	Porto Seguro - BA
Bl2	0901-11	775	113-127	♂	Porto Seguro - BA
Bl3	0901-12	1415	138-164	♀	Porto Seguro - BA
Bl4	0901-13	1685	148-167	♀	Porto Seguro - BA
Bl5	1201-08	970	123-140	♀	Porto Seguro - BA
Bl6	1201-18	615	102-113	♂	Porto Seguro - BA
Bl7	1401	400	101-117	♂	Porto Seguro - BA
Bl8	1402	535	117-135	♂	Porto Seguro - BA
Bl9	1504	1240	147-16+2	♀	Porto Seguro - BA
Bl10	1601-03	295	96-109	♂	Porto Seguro - BA
Bl11	1603-05	275	91-105	♀	Porto Seguro - BA
Bl12	1603-13	333	98-111	♀	Porto Seguro - BA
Bl13	1603-14	255	90-105	♂	Porto Seguro - BA