

LÍDIA JORGE TASIMA

**Análise da variação bioquímica e biológica do veneno da serpente
Bothrops pauloensis em diferentes estágios ontogenéticos**

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

São Paulo

2021

LÍDIA JORGE TASIMA

**Análise da variação bioquímica e biológica do veneno da serpente
Bothrops pauloensis em diferentes estágios ontogenéticos**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Tasima, Lidia Jorge
Análise da variação bioquímica e biológica do
veneno da serpente *Bothrops pauloensis* em
diferentes estágios ontogenéticos / Lidia Jorge
Tasima; orientadora Anita Mitico Tanaka-Azevedo. --
São Paulo, 2021.

107 p.

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Lídia Jorge Tasima

Título da Dissertação: Análise da variação bioquímica e biológica do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* em diferentes estágios ontogenéticos.

Orientador: Prof. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo

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

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

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente:
Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise da variabilidade ontogenética do veneno da serpente *Bothrops pauloensis*", protocolada sob o CEUA nº 2820040219 (ID 001626), sob a responsabilidade de **Anita Mítico Tanaka Azevedo e equipe; Lídia Jorge Tasima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 15/05/2019.

We certify that the proposal "Analysis of ontogenic variability of venom of snake *Bothrops pauloensis*", utilizing 64 Reptiles (males and females), 80 Heterogenics mice (80 males), protocol number CEUA 2820040219 (ID 001626), under the responsibility of **Anita Mítico Tanaka Azevedo and team; Lídia Jorge Tasima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 05/15/2019.

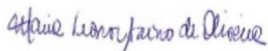
Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2019** a **05/2021** Área: **Herpetologia**

Origem:	Animais provenientes de outros estudos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 20 anos	N:	64
Espécie:	Répteis			Peso:	50 a 3000 g		
Linhagem:	Bothrops pauloensis						
Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos	idade:	2 a 4 semanas	N:	80
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	18 a 23 g		
Linhagem:	Swiss						

Local do experimento: Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

São Paulo, 15 de maio de 2019



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



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



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 07 de julho de 2021
CEUA N [2820040219](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Anita Mítico Tanaka Azevedo
Área: Herpetologia

Título da proposta: "Análise da variação bioquímica e biológica do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* em diferentes estágios ontogenéticos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB (ID 003453)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: alteração do nome do projeto de "Análise da variabilidade ontogenética do veneno da serpente *Bothrops pauloensis*" para "Análise da variação bioquímica e biológica do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* em diferentes estágios ontogenéticos".

Comentário da CEUA: "".

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

AGRADECIMENTOS

À minha família e meus amigos por estarem sempre ao meu lado, mesmo que distantes fisicamente. Minha família que é maravilhosa como é e eu acredito ter muita sorte de fazer parte dela. E meus amigos, que são incríveis e sei que posso contar com eles para tudo. Obrigada pela companhia, loucuras, conselhos, risadas e, acima de tudo, pelo carinho. Sou extremamente grata pela presença de vocês em minha vida. Amo todos vocês.

Meus pais, minha irmã e meu namorado, que sempre acreditaram em mim e me deram todo apoio necessário. Meu pai e minha mãe, por confiarem em mim, desde a época da escola, e por cuidarem de mim, com todo amor e carinho que eu preciso. Obrigada por tudo que vocês já fizeram por mim, sempre me levando a ser uma pessoa melhor. Espero poder retribuir tudo isso algum dia. Minha irmã, Luisa, que sempre foi uma amiga acima de tudo, companheira e conselheira para todas as horas. Obrigada por todas as brigas bestas de infância, todas as artes planejadas em conjunto, todos os esforços para termos um monte de pets e todos os sorrisos em geral. Você me inspirou muito e parte do que sou hoje, sou graças a você. Ao Heitor, meu namorado, o melhor companheiro que eu poderia pedir. Obrigada por todos os momentos, conversas, discussões filosóficas (ou não tão filosóficas), todos os açaís, todas as risadas e bobagens... enfim, muito obrigada por ser você. Você é alguém muito especial pra mim, é meu porto seguro e eu sou muito grata por poder ter você ao meu lado por todo esse tempo. Espero que esse tempo se estenda muito mais daqui pra frente!

À Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo, por ter me orientado e acompanhado desde a minha iniciação científica. Você é como uma guia para mim, é alguém em que eu me inspiro e que eu admiro muito. Obrigada por ser mais do que uma orientadora, ser uma amiga e companheira, e ter me permitido fazer parte dessa família que chamamos de lab. Sou grata não apenas por todos os ensinamentos, mas também pelas conversas e risadas que compartilhamos juntas. Muito obrigada por tudo!

A todos os colegas do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Karen de Moraes Zani, Caroline Serino Silva, Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues, Wesley da Silva Aguiar, Daniela Miki Hatakeyama, Nathália da Costa Galizio, Juan David Gutierrez Marin, Victor Koiti Kavazoi, Eduardo Oliveira Venâncio de Lima, Daniel Carvalho de Souza e Lucas Daniel Padueli. Obrigada

pelo companheirismo e clima agradável e familiar que vocês proporcionam no laboratório. Também não poderia deixar de agradecer ao Danylo Marques Ferreira, que deixou sua marca durante sua passagem pelo laboratório e se mantém próximo de nós, sempre está nos atualizando dos assuntos do instituto. Em especial gostaria de agradecer à Karen, que desde o início da minha jornada me deu apoio e suporte, nos ajudando seja com ideias novas ou com soluções para problemas, e também sendo uma amiga e companheira de muitas risadas. À Caroline Serino, que foi a primeira aluna que conheci do laboratório, sendo então minha companheira de mais longa data. Obrigada por me ensinar praticamente tudo que sei fazer no laboratório, por toda a paciência comigo e com todos, por ser uma amiga além das 4 paredes do laboratório e ser uma companheira de corrida e dança. À Daniela, por todos os momentos e risadas compartilhadas, seja no laboratório ou pelo computador. Obrigada por sempre estar ao meu lado, me ajudando a discutir resultados dos experimentos ou os acontecimentos de algum jogo/anime. Não importa onde, seremos sempre B1 e B2. Ao Wesley, meu conselheiro oficial de jogos e promoções. Obrigada por todos os momentos, todo o carinho e companheirismo que você me dá. Você é um companheiro muito querido e espero que eu consiga te fazer sorrir da mesma maneira que você me faz. Ao Eduardo, por ser aquele parceiro para qualquer coisa, inclusive para surtos. Obrigada por sua amizade, por conseguir me fazer rir não importa meu humor e ser aquela pessoa que eu sei que posso contar sempre. Na verdade, os melhores momentos são quando estamos todo juntos, e eu espero que possamos nos reunir logo. Gostaria de agradecer todos vocês de coração, amo muito vocês!

Aos meus amigos da vida, que não estão presentes diariamente, mas que o amor e carinho entre nós se mantém firme e forte, Mariana Hokamura, Nicholas Akio Tanigami, Octavio Sakahara Saito, Orlando Watanabe Junior, Tafarel Yan, Patrícia Tiemi Koyama, Fernando Takeda e Willian Iwamoto. Vocês são amigos que eu tenho muito a agradecer, tantos anos e de tantas histórias vividas juntas, que sempre serão motivo de sorriso em minhas lembranças. Às minhas amigas que ganhei na faculdade e que espero levar para toda vida, Michelle Guzmán de Fernandes e Bruna Rodrigues Shintate. A melhor sinergia para trabalhos em grupo é com vocês. Gostaria também de agradecer aos meus companheiros do grupo escoteiro, jovens e adultos, e aos demais amigos que me fazem companhia em diversos momentos e me dão apoio pra vida, de forma que acredito que vocês nem percebem. Só tenho a agradecer a presença de pessoas tão especiais em minha vida. Amo vocês!

Aos nossos colaboradores da UNIFESP, Dr. Alexandre Keiji Tashima e Jackson Gabriel Miyamoto, pela análise de espectrometria de massas e por todo apoio na análise dos resultados.

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

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

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

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, por permitir a realização desse trabalho e ter fornecido todo o apoio necessário para conclusão do mesmo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código de Financiamento 001) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo Nº 2018/25899-0), pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

Resumo

TASIMA, L.J. **Análise da variação bioquímica e biológica do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* em diferentes estágios ontogenéticos.** 2021. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os venenos de serpentes apresentam heterogeneidade considerável e alterações ontogenéticas na composição do veneno já foram observadas em diferentes espécies de serpentes dentro da família Viperidae. Visto que o veneno de filhotes e de adultos causam efeitos patológicos distintos, e que com isso o soro pode apresentar menor eficácia na neutralização de envenenamento por serpentes filhotes em relação aos adultos, é de suma importância entender a variação ontogenética do veneno das serpentes. Com isso, o presente estudo teve como objetivo analisar e comparar o veneno de serpentes *B. pauloensis*, buscando possíveis influências da ontogenia e do sexo em seus aspectos bioquímicos e biológicos. O veneno dos indivíduos mais novos se mostrou mais complexo em relação às proteínas de alta massa, com uma maior abundância de metaloproteases, enquanto os adultos apresentaram uma abundância maior de proteínas de média e baixa massa, como as fosfolipases A₂ (PLA₂), lectinas tipo C e serinoproteases. O soro antiofídico apresentou um imunorreconhecimento melhor com o veneno das serpentes adultas do que as mais jovens, além de uma deficiência no reconhecimento de proteínas de média massa molecular, sugerindo uma necessidade de um aperfeiçoamento do soro antiofídico. As serpentes mais jovens apresentaram uma maior atividade coagulante, caseinolítica e hemorrágica, enquanto as adultas apresentaram maior atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO) e agiram mais rapidamente em relação à letalidade. Diferenças entre machos e fêmeas foram observadas principalmente na velocidade de perda da atividade coagulante, na alteração da atividade de PLA₂ e no tempo de ação letal. Além disso, considerando apenas os grupos dos adultos, os machos apresentaram uma maior atividade de LAAO e de trombina-símile, enquanto as fêmeas apresentaram uma maior atividade de caseinolítica e de hialuronidase. Com os resultados obtidos nesse trabalho foi possível concluir que há uma variação ontogenética da composição e de algumas atividades do veneno da serpente *B. pauloensis*, além de possíveis diferenças entre o veneno dos machos e das fêmeas, reforçando que há uma variação intraespecífica que pode resultar em diferentes sintomas em seu envenenamento e, conseqüentemente, diferenças na resposta ao tratamento com o soro antiofídico.

Palavras-chave: Biotecnologia. Antiveneno. Proteoma. Dimorfismo sexual.

Abstract

TASIMA, L.J. **Analysis of biochemical and biological variation of *Bothrops pauloensis* snake venom at different ontogenetic stages.** 2021. 107 f. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Snake venoms show considerable heterogeneity and ontogenetic changes in venom composition have already been observed in different species of snakes within the Viperidae family. Since the venom of young and adults cause distinct pathological effects, and with that the serum may be less effective in neutralizing envenoming by young snakes compared to adults, it is of paramount importance to understand the ontogenetic variation of snake venom. Thus, the present study aimed to analyze and compare the venom of *B. pauloensis* snakes, searching for possible influences of ontogeny and sex in their biochemical and biological aspects. The venom of younger individuals was more complex in relation to high weight proteins, with a greater abundance of metalloproteinases, while adults showed a greater abundance of medium and low weight proteins, such as phospholipases A₂ (PLA₂), C-type lectins and serine proteases. The antithropic serum showed better immunorecognition with the venom of adult snakes than younger ones, in addition to a deficiency in the recognition of medium molecular weight proteins, suggesting a need for an improvement in the antithropic serum. Younger snakes showed higher coagulant, caseinolytic and hemorrhagic activity, while adult snakes showed higher L-amino acid oxidase (LAO) activity and acted faster in lethality. Differences between males and females were observed mainly in the rate of loss of coagulant activity, change in PLA₂ activity and lethality action time. Furthermore, considering only the adult groups, males showed a higher LAO and thrombin-like activity, while females showed a higher caseinolytic and hyaluronidase activity. With the results obtained in this work, it was possible to conclude that there is an ontogenetic variation in the composition and some activities of the *B. pauloensis* snake venom, in addition to possible differences between the venom of males and females, reinforcing that there is an intraspecific variation that may result in different symptoms in their envenoming and, consequently, differences in the response to treatment with the antivenom.

Keywords: Biotechnology. Antivenom. Proteome. Sexual dimorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Foto de um espécime de *B. pauloensis* filhote. Fonte: Sávio S. Sant’Anna. 22
- Figura 2.** Dosagem de proteínas dos venenos de *B. pauloensis* realizada pela metodologia de Bradford. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade. 38
- Figura 3.** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 15% dos venenos de *B. pauloensis* em ordem crescente de idade em cada gel. Os painéis superiores são de amostras em estado reduzidas e os inferiores de amostras em estado não reduzido do grupo das fêmeas (A e C) e dos machos (B e D). N – Neonatos; 1 – 1 ano; 2 – 2 anos; A – Adultos. PDE – fosfodiesterases; SVMP - metaloproteases; SVSP - serino proteases; CTL - lectina tipo C; PLA₂ - fosfolipase A₂; LAAO - L-amino ácido oxidase; CRISP - proteína secretada rica em cisteína, VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; PLB – fosfolipase B; NT – nucleotidases..... 40
- Figura 4.** Eletroforese bidimensional (2-DE) dos venenos de *B. pauloensis* neonatos (A e B) e adultos (C e D), fêmeas (A e C) e machos (B e D). As proteínas do veneno foram focalizadas em seus pontos isoeletrônicos (primeira dimensão) e separadas por SDS-PAGE 15% (segunda dimensão)..... 42
- Figura 5.** Perfil cromatográfico, obtidos por RP-HPLC, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. DIS – disintegrinas; SVMP - metaloproteases; SVSP - serino proteases; CTL - lectina tipo C; PLA₂ - fosfolipase A₂; LAAO - L-amino ácido oxidase; CRISP - proteína secretada rica em cisteína. A identificação das proteínas presentes em cada região do cromatograma foi baseada nos resultados obtidos pelo trabalho de Rodrigues e colaboradores (2012). 44
- Figura 6.** Abundância relativa das famílias de proteínas encontradas por espectrometria de massas nos *pools* de venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades, machos e fêmeas. SVMP - metaloproteases; SVSP - serino proteases; CTL - lectina tipo C; PLA₂ - fosfolipase A₂; LAAO - L-amino ácido oxidase; CRISP - proteína secretada rica em cisteína, VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; PLB – fosfolipase B; NT – nucleotidases; Outros – hialuronidase, fosfodiesterase, glutaminil-peptídeo ciclotransferase e fator de crescimento neural. 46

Figura 7. *Western blotting* dos venenos de *B. pauloensis* incubada com soro antibotrópico em ordem crescente de idade. Os painéis superiores são de amostras reduzidas e os inferiores de amostras não reduzidas do grupo das fêmeas (A e C) e dos machos (B e D). N – Neonatos; 1 – 1 ano; 2 – 2 anos; 3 – 3 anos; A – Adultos. A imagem do SDS-PAGE (Fig. 2) está inserida para melhor comparação. 48

Figura 8. Titulação de anticorpos do soro antibotrópico por ELISA dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. O cálculo da titulação de anticorpos é realizado a partir do valor da diluição do soro antibotrópico multiplicado pelo valor da leitura a 492 nm. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade. 49

Figura 9. Atividade de LAAO, utilizando L-metionina como substrato, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade de LAAO é expressa pela quantidade de nmols de H_2O_2 liberados por micrograma de proteína por minutos de incubação. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade. 50

Figura 10. Atividade de PLA_2 , utilizando NOBA como substrato, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade de PLA_2 é expressa em unidades (U - nmols de cromóforos liberados) por minutos de incubação por microgramas de proteína, sendo que o aumento de 0,1 unidade da leitura equivale à liberação de 25,8 nmol de cromóforo. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade. 51

Figura 11. Atividade de hialuronidase, utilizando ácido hialurônico como substrato, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade foi determinada pela redução da turbidez das amostras, considerando como 100% de turbidez a absorbância da reação em que não foi adicionado veneno. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade. 52

Figura 12. Atividade caseinolítica dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade específica é expressa em unidades (U - quantidade de veneno que causa um aumento de

0,005 unidade de absorvância a 450 nm) por minuto de incubação por miligramas de proteína. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade. 53

Figura 13. Atividade de colagenolítica dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade específica é expressa em unidades (U - quantidade de veneno que causa um aumento de 0,003 unidade de absorvância a 540 nm) por minuto de incubação por miligramas de proteína. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade. 54

Figura 14. Zimografia em SDS-PAGE 15% dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo, contendo caseína (A e B) e gelatina (C e D) como substrato. N – Neonatos; 1 – 1 ano; 2 – 2 anos; A – Adultos..... 56

Figura 15. Dose mínima coagulante em plasma humano dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade. 57

Figura 16. Atividade de trombina-símile, utilizando substrato S-2238, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade. 58

Figura 17. Atividade hemorrágica em camundongos injetados, via intradérmica, 3 μ g de veneno de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. O painel A apresenta dados da área total de hemorragia e o painel B da área de hemorragia intensa. 59

Figura 18. Tempo de ação letal em camundongos ($n=5$) injetados, via intraperitoneal, 100 μ g de veneno de *B. pauloensis* de diferentes idades, fêmeas (A) e machos (B)..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de indivíduos de cada idade e sexo que tiveram o veneno extraído para a composição dos *pools*. 27

Tabela 2. Resumo das diferenças encontradas entre as atividades analisadas do veneno da serpente *B. pauloensis* em relação a idade e ao sexo. A – adultos; N – neonatos; F – fêmeas; M – machos. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE – Eletroforese bidimensional

ANOVA – Análise de variância

B. diporus – *Bothrops diporus*

B. jararaca – *Bothrops jararaca*

B. jararacussu – *Bothrops jararacussu*

B. lutzi – *Bothrops lutzi*

B. marmoratus – *Bothrops marmoratus*

B. mattogrossensis – *Bothrops mattogrossensis*

B. moojeni – *Bothrops moojeni*

B. neuwiedi – *Bothrops neuwiedi*

B. pauloensis – *Bothrops pauloensis*

B. pubescens – *Bothrops pubescens*

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

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

CO₂ – Dióxido de carbono

CRISP – Proteína secretora rica em cisteína

CTL – Lectina tipo C

DIS – Disintegrina

DMC – Dose Mínima Coagulante

DMH – Dose Mínima Hemorrágica

DTT – Ditioneítrito

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HYA – Hialuronidase

IAA – Iodoacetamida

IEF – Focalização isoeletrica

KCl – Cloreto de potássio

KH_2PO_4 – Fosfato monopotássico
LAAO – L-aminoácido oxidase
 MgCl_2 – Cloreto de magnésio
MS – Espectrometria de massas
 Na_2CO_3 – Carbonato de sódio
 Na_2HPO_4 – Fosfato dissódico
NaCl – Cloreto de Sódio
 NaHCO_3 – Bicarbonato de sódio
 NaN_3 – Azida de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
 NH_4HCO_3 – Bicarbonato de Amônio
NOBA – 4-nitro-3-octanoloxo ácido benzóico
NT – Nucleotidase
OPD – Ortofenilenodiamina
PBS – Tampão fosfato salino
PDE – Fosfodiesterase
 PLA_2 – Fosfolipase A2
PLB – Fosfolipase B
PVDF – Fluoreto de polivinilideno
QPCT – Glutaminil-peptídeo ciclotransferases
RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance - Fase Reversa
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SVMP – Metaloprotease
SVSP – Serinoprotease
TCA - Ácido tricloroacético
TFA – Ácido trifluoroacético
VEGF – Fator de crescimento endotelial
VNGF – Fator de crescimento neural

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVO GERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. VENENOS E SORO ANTIBOTRÓPICO	27
3.2. CAMUNDONGOS	28
3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS POR BRADFORD	28
3.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS (SDS-PAGE)	28
3.5. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)	28
3.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE – FASE REVERSA (RP-HPLC)	29
3.7. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)	30
3.8. WESTERN BLOTTING	31
3.9. ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)	32
3.10. ATIVIDADE DE L-AMINOÁCIDO OXIDASE (LAAO)	33
3.11. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA (PLA ₂)	33
3.12. ATIVIDADE DE HIALURONIDASE	34
3.13. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE A CASEÍNA	34
3.14. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE O COLÁGENO	34
3.15. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA PELO MÉTODO DE ZIMOGRAFIA	35
3.16. DOSE MÍNIMA COAGULANTE SOBRE O PLASMA (DMC)	35
3.17. ATIVIDADE DE TROMBINA-SÍMILE	36
3.18. ATIVIDADE HEMORRÁGICA	36
3.19. ATIVIDADE LETAL - TEMPO DE MORTE	36
3.20. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS	38
4.1. CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DOS VENENOS	38
4.1.1. Dosagem de proteínas	38
4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	39
4.1.3. Eletroforese Bidimensional (2-DE)	41
4.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Performance – Fase Reversa (RP-HPLC)	43
4.1.5. Espectrometria de massas (MS)	45
4.2. ANÁLISE DO IMUNORRECONHECIMENTO DOS VENENOS PELO SORO ANTIBOTRÓPICO	47
4.2.1. Western blotting	47
4.2.2. ELISA	49
4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E BIOLÓGICAS DOS VENENOS	50
4.3.1. Atividade de LAAO	50
4.3.2. Atividade de PLA ₂	51
4.3.3. Atividade de hialuronidase	52
4.3.4. Atividade proteolítica sobre a caseína	53
4.3.5. Atividade proteolítica sobre o colágeno	54
4.3.6. Zimografia	55
4.3.7. Dose Mínima Coagulante (DMC)	57

4.3.8.	<i>Atividade de trombina-símile</i>	58
4.3.9.	<i>Atividade Hemorrágica</i>	59
4.3.10.	<i>Atividade Letal - Tempo de Morte</i>	60
5.	DISCUSSÃO	61
6.	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	APÊNDICE	85

1. Introdução

O envenenamento por serpentes peçonhentas ocorre em muitos países tropicais e subtropicais e é classificada como uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde. Em todo o mundo, cerca de 1,8 a 2,7 milhões de casos de envenenamento por serpentes ocorrem por ano, resultando de 81.410 a 137.880 mortes e um número três vezes maior de incapacidades permanentes (WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2021). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, foram registrados 30.703 casos de acidentes ofídicos, que resultaram em 152 óbitos em 2019 (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN NET, 2021). Apesar do elevado número de acidentes, somente 0,36% dos casos vêm ao óbito. Esse baixo número de óbitos ocorre devido à eficácia da soroterapia, sendo este o único tratamento disponível para o tratamento do envenenamento por animais peçonhentos (BON, 1996; GUTIÉRREZ et al., 2017a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A soroterapia antiveneno foi desenvolvida em 1894 e, desde então, houve algumas melhorias tecnológicas em seus processos de produção e nos protocolos de controle de qualidade e eficácia. Porém, em sua essência, a soroterapia permanece a mesma até os dias de hoje (BON, 1996; CUNHA, 2017). Para produção do soro, um animal é inoculado sucessivamente, durante vários meses, com doses crescentes de um único veneno, produzindo um antiveneno monoespecífico, ou com uma mistura de venenos, produzindo um antiveneno poliespecífico (LALLOO; THEAKSTON, 2003). Tradicionalmente são utilizados cavalos para a produção do soro antiveneno, já que são animais dóceis, produzem grandes quantidades de soro e podem tolerar grandes doses de veneno. No entanto, alguns indivíduos são sensíveis às proteínas equinas, tornando as reações antivenenos mais prováveis (LALLOO; THEAKSTON, 2003). Diversos estudos buscam a melhoria do soro antiofídico, tanto avaliando sua eficácia em diferentes espécies de serpentes, como buscando alternativas para a produção deste. Bermúdez-Méndez e colaboradores (2018) citam algumas dessas possíveis melhorias na produção do antiveneno, como a produção com proteínas recombinantes ou sintéticas, produção de um soro apenas com uma parte do veneno (utilizando, no caso, frações que mais causam danos em acidentes), adição de inibidores específicos ao soro e também a utilização de adjuvantes para melhorar a resposta imunológica dos animais utilizados para produção do soro.

No Brasil, ocorrem duas famílias de serpentes peçonhentas, a família Elapidae (representada pelo gênero *Micrurus*) e a família Viperidae (representada pelos gêneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Crotalus* e *Lachesis*) (BÉRNILS; COSTA, 2015). Dentre esses grupos, a família Viperidae é a que representa maior importância para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos registrados, não somente no Brasil, mas também em outros países americanos (MELGAREJO, 2009). No ano de 2019, cerca de 85,4% dos acidentes causados por serpentes peçonhentas no Brasil foram atribuídos às serpentes do gênero *Bothrops*, enquanto 10,8% foram atribuídos ao gênero *Crotalus* e os gêneros *Lachesis* e *Micrurus* representam aproximadamente 3,9% das ocorrências registradas ao ano pelo Ministério da Saúde (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN NET, 2021).

As espécies do gênero *Bothrops* mais significativas para a saúde pública são abundantes, com uma ampla distribuição geográfica (MELGAREJO, 2009), como a *Bothrops pauloensis*. Essa espécie ocorre em uma grande área do Brasil (Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná), no Paraguai e na Bolívia (UETZ; FREED; HOŠEK, [s.d.]). Inicialmente, a *B. pauloensis* era classificada como *B. neuwiedi pauloensis*, uma das subespécies que compunham o “complexo neuwiedi” (DO AMARAL, 1925; SILVA; RODRIGUES, 2008). Em 2008, esse complexo foi submetido a uma revisão taxonômica e, com os resultados dessa análise, Silva e Rodrigues (2008) propuseram que esse complexo é, na verdade, formado por 7 espécies plenas (*B. neuwiedi*, *B. diporus*, *B. lutzi*, *B. mattogrossensis*, *B. pauloensis*, *B. pubescens* e *B. marmoratus*), distinguidas principalmente por caracteres qualitativos.

A *B. pauloensis* (Figura 1) é uma serpente terrestre de tamanho médio (40-80 cm) que habita áreas de cerrado e possui uma dieta generalista, que inclui de centípedes até roedores. Essa espécie apresenta dimorfismo sexual, com as fêmeas maiores do que os machos, mas sem diferença na dieta entre os sexos (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002; VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002). Entretanto, ocorre uma variação ontogenética na dieta dessa espécie, que altera suas presas de ectotérmicos para endotérmicos (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002). Os efeitos de sua picada em humanos são semelhantes aos de outras *Bothrops* (CHIACCHIO et al., 2011; GUTIÉRREZ; LOMONT, 1995).

Figura 1. Foto de um espécime de *B. pauloensis* filhote. Fonte: Sávio S. Sant'Anna.



Sávio Sant'Anna

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* possui três atividades fisiopatológicas principais, descritas didaticamente como proteolítica, mais bem definida como inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica (ROSENFELD, 1971). Essas atividades 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; MALAQUE, 2009).

Cerca de 90% do peso seco dos venenos é constituído por proteínas, que pertencem apenas a algumas famílias proteicas, que se dividem em dois grandes grupos: as enzimas (serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases, fosfolipases e hialuronidas) e proteínas sem atividade enzimática (disintegrinas, lectinas, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP, fatores de crescimento neural e endotelial, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz) (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; FRY; WÜSTER, 2004; FRY, 2005; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; MARKLAND, 1998; SERRANO et al., 2005). As frações não proteicas são representadas por carboidratos, lipídeos, metais (frequentemente na forma de glicoproteínas e metaloproteases), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (FRANÇA; MALAQUE, 2009). A principal função destas toxinas é imobilizar, paralisar e matar a presa a fim de que a mesma possa ser ingerida de maneira segura (RICHARDS; BARLOW; WÜSTER, 2012).

As serinoproteases, importantes enzimas presentes nos venenos botrópicos, contém um resíduo de serina no sítio reativo, que é estabilizado pela presença de histidina e de ácido aspártico. Estas enzimas apresentam massa molecular variando entre 26 e 67 kDa. Embora homogêneas em suas características estruturais, as serinoproteases de peçonhas podem apresentar uma grande diversidade de perfis farmacológicos, atuando em diversos componentes da cascata da coagulação e nos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina (SERRANO; MAROUN, 2005; VILCA-QUISPE et al., 2010).

As metaloproteases são enzimas que dependem de íons metálicos para serem ativadas. Estas enzimas estão envolvidas em diversos processos decorrentes do envenenamento, tais como: degradação de fatores da cascata da coagulação sanguínea, inibição de agregação plaquetária, edema, degradação de componentes da matriz extracelular e hemorragia (FOX; SERRANO, 2005; TEIXEIRA et al., 2005). As metaloproteases podem ser divididas em três classes: Classe P-I: enzimas de massa molecular entre 20 e 30 kDa, que apresentam apenas o domínio protease (ou domínio catalítico). Classe P-II: enzimas de massa molecular de cerca de 30 a 50 kDa que, além do domínio catalítico, apresentam um domínio desintegrina. Nesta classe pode haver uma autocatálise que leva à separação da metaloprotease PII em uma PI e uma desintegrina. Classe P-III: são enzimas que apresentam intensa atividade hemorrágica dos venenos. Apresentam o domínio catalítico, o desintegrina e um terceiro domínio, rico em cisteínas. Apresentam massa molecular variando entre 50 e 80 kDa. Podem apresentar-se na forma monomérica (Classe P-IIIa) e também na forma dimérica (P- IIIb). Classe P-IIIc: são proteases com massa molecular entre 80 e 100 kDa, que apresentam, além dos 3 domínios anteriores, dois domínios tipo-lectina, ligados por pontes dissulfeto no final de sua estrutura (BJARNASON; FOX, 1995; FOX; SERRANO, 2005; HITE et al., 1994).

As L-Aminoácido Oxidases (LAAOs) são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos em alfa-cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio, que são compostos responsáveis pela sua atividade citotóxica. Com uma massa molecular entre 110 e 150 kDa (em condições não redutoras), essa classe de enzimas está amplamente distribuída em várias espécies de seres vivos tanto nas peçonhas de serpentes quanto em insetos, fungos, bactérias e até mesmo plantas (TAN; FUNG, 2008). As LAAOs são substâncias de grande interesse na área científica por apresentarem alto potencial citotóxico sobre diversos patógenos e linhagens celulares tumorais (DU; CLEMETSON, 2002; LEE et al., 2011;

SUN et al., 2010). Outros trabalhos descrevem seus efeitos biológicos como: indução de apoptose, citotoxicidade, indução e/ou inibição de agregação plaquetária, hemorragia, hemólise, edema, atividade bactericida, anti-HIV e, mais recentemente, anti-tumoral (SOUZA et al., 1999; STÁBELI et al., 2007; SUHR; KIM, 1996; TAN; BAY; GOPALAKRISHNAKONE, 2018). Muitos dos efeitos biológicos de LAAOs são creditados aos efeitos secundários do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido durante a reação enzimática e que induz a apoptose celular, agindo assim como um auxiliador no processo de envenenamento (ANDE et al., 2006; DU; CLEMETSON, 2002; RODRIGUES et al., 2009).

As fosfolipases são uma superfamília de enzimas que atuam sobre membranas celulares realizando a clivagem de fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios. Dentre os diferentes tipos de fosfolipases, as fosfolipases A₂ (PLA_{2s}), envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, catalisam especificamente a hidrólise de fosfolipídios na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos em uma reação dependente de cálcio, o que resulta em inflamação tecidual na região afetada pela picada (ARNI; WARD, 1996; DENNIS et al., 1991; KUDO; MURAKAMI, 2002; OLIVEIRA et al., 2008). São enzimas de baixa massa molecular, de cerca de 14 kDa (DENNIS et al., 2011), e apresentam um importante papel nas funções celulares, como manutenção dos fosfolipídios celulares, geração de prostaglandinas e leucotrienos, transdução de sinais, proliferação celular e contração muscular. Entre os efeitos conhecidos para essa enzima estão a neurotoxicidade, miotoxicidade, inflamação, hemorragia, edema, ação anticoagulante, entre outras (DE PAULA et al., 2009; KINI, 2003; KINI; EVANS, 1989).

Os venenos de serpentes apresentam heterogeneidade considerável, tanto de forma quantitativa como qualitativa. Essa variação ocorre de forma intra e interespecífica, de acordo com a sazonalidade, distribuição geográfica, idade ou sexo (AMAZONAS et al., 2018; AMORIM et al., 2018; BARLOW et al., 2009; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; DE ROODT et al., 2018; FURTADO; COLLETO; SILVA, 1991; GUBENŠEK et al., 1974; QUEIROZ et al., 2008; TAN et al., 2017; WILLIAMS; WHITE, 1992). Desta forma, o estudo dessas variações e o controle de qualidade desses venenos têm sido objeto de intensa investigação, vista a sua utilização na produção de soros antiofídicos e em busca de novos produtos de interesse biotecnológicos (FURTADO; COLLETO; SILVA, 1991; KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006).

Alterações ontogenéticas na composição do veneno são observadas em diferentes espécies de serpentes em grande parte das pesquisas na área de proteômica (ANDRADE; ABE, 1999; CALVETE, 2017; GIBBS et al., 2011; MACKESSY, 1988; PLA et al., 2017a; ROKYTA et al., 2017; ZELANIS et al., 2009). Em espécies como *Crotalus durissus durissus*, indivíduos recém-nascidos e jovens apresentam maior toxicidade do que adultos, enquanto estes apresentam uma maior atividade proteolítica. Em outra espécie do mesmo gênero, a *Crotalus viridis*, os adultos também apresentam maior atividade proteolítica enquanto os jovens apresentam uma maior atividade fosfolipásica. Com relação à espécie *Lachesis muta*, o veneno de recém-nascidos apresenta menor toxicidade e menor atividade proteolítica quando comparado com adultos (GUTIÉRREZ et al., 1991, 1990; LOMONTE et al., 1983; MACKESSY, 1988).

O veneno dos filhotes de outras espécies do gênero *Bothrops* apresentam maior atividade coagulante em relação ao dos indivíduos adultos, enquanto estes últimos geralmente apresentam maior atividade proteolítica (ANDRADE; ABE, 1999; FURTADO et al., 1991; GUÉRCIO et al., 2006; KAMIGUTI, 1988; PEREIRA, 2006). Furtado e colaboradores (1991) observaram que uma fêmea de *B. pauloensis* (ainda considerada *B. neuwiedi pauloensis*) possuía uma menor atividade coagulante do que seus filhotes. Além disso, o veneno dos filhotes apresentou uma toxicidade menor. Porém, nesse estudo, foi comparado somente o veneno da mãe com de seus filhotes, desconsiderando a variação individual e foi comparado o veneno de recém-nascidos com a mãe adulta, sem dados da variação do veneno durante o passar dos anos.

Visto que o veneno de filhotes e de adultos causam efeitos patológicos distintos, e que o soro pode apresentar menor eficácia na neutralização de envenenamento por serpentes filhotes em relação aos adultos (ANTUNES et al., 2010), é de suma importância entender a variabilidade ontogenética do veneno das serpentes. É esperado que a *B. pauloensis* apresente diferenças, tanto em sua composição como em seus efeitos, entre o veneno de filhotes e adultos, assim como observado para outras espécies dentro do gênero *Bothrops*. Com isso, o presente estudo teve como objetivo analisar e comparar o veneno de *B. pauloensis* de diferentes idades, buscando elucidar os mecanismos de ação do veneno ao longo do desenvolvimento destes animais e melhorar o tratamento do envenenamento por serpentes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo analisar a composição bioquímica e as atividades biológicas do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* em diferentes estágios ontogenéticos, comparando tais aspectos entre os diferentes grupos de idade e sexo.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a composição proteica dos venenos por meio de dosagem proteica, eletroforese em gel de acrilamida 1DE e 2DE, cromatografia líquida de alta performance e análise por espectrometria de massas;
- Analisar o imunorreconhecimento dos venenos pelo soro antibotrópico por meio de ELISA e *western blotting*;
- Determinar as atividades enzimáticas e biológicas dos venenos, tais como proteolítica, fosfolipásica, de L-amino ácido oxidase, de hialuronidase, de trombina-símile, coagulante, hemorrágica e sua letalidade;
- Comparar o veneno dos diferentes grupos nos aspectos investigados.

3. Material e Métodos

3.1. Venenos e Soro antibotrópico

Os venenos das serpentes *B. pauloensis* foram obtidos por meio da extração manual, conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. As amostras foram separadas em *pools* de acordo com a idade e sexo: neonatos (1-3 meses), 1 ano, 2 anos e adultos (maiores de 4 anos). As serpentes são consideradas adultas com três anos de idade, quando são transferidas da “sala berçário” para a “sala de manutenção” (GREGO et al., 2021). Posteriormente, os venenos foram centrifugados a 1700 g por 15 minutos, liofilizados e armazenados a -20°C, até o momento da análise. O soro antibotrópico, fornecido pelo Instituto Butantan, foi produzido pela imunização em cavalos com uma mistura de veneno de *B. jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu* (12.5%), *Bothrops alternatus* (12.5%), *Bothrops moojeni* (12.5%) e do complexo *neuwiedi* (12.5%). A Tabela 1 mostra a quantidade de serpentes utilizadas para confecção dos *pools* e informações adicionais sobre a biometria e procedência dos animais podem ser encontradas no Apêndice 1.

Tabela 1. Quantidade de indivíduos de cada idade e sexo que tiveram o veneno extraído para a composição dos *pools*.

Amostra	Sexo	Idade	Nº Indivíduos
Neonato	Macho	1 - 3 meses	12
Neonato	Fêmea	1 - 3 meses	17
1 ano	Macho	~ 1 ano	8
1 ano	Fêmea	~ 1 ano	4
2 anos	Macho	~ 2 anos	7
2 anos	Fêmea	~ 2 anos	8
Adulto	Macho	> 4 anos	5
Adulto	Fêmea	> 4 anos	5

3.2. **Camundongos**

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos, pesando entre 18 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB N° 2820040219).

3.3. **Dosagem de proteínas por Bradford**

Um mg de veneno liofilizado foi reconstituído em 1 mL de solução salina 0,85% e a quantificação proteica dos venenos foi realizada pelo ensaio colorimétrico de Bradford (1976) para assegurar, com maior precisão, a quantidade de proteínas utilizada nos procedimentos seguintes.

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

As amostras dos venenos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% segundo a metodologia de Laemmli (1970). Por canaleta, foram aplicados 20 µg de proteína em condições reduzidas ou não reduzidas. Foi utilizado o padrão proteico de massa molecular Dual Color Precision Plus (Bio-Rad) como referência em todos os géis. Os géis foram corados utilizando-se *Coomassie Blue* R350, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

3.5. **Eletroforese bidimensional (2-DE)**

3.5.1. *Primeira dimensão – focalização isoelétrica*

Sessenta µg de veneno liofilizado foi ressuspendido em 125 µL de DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) contendo IPG Buffer 3-10 0,5% (GE Healthcare). Em seguida, a amostra foi aplicada em uma fita Immobiline DryStrip de 7 cm, com pH variando de 3 a 10 (GE Healthcare). A fita foi reidratada durante a noite em temperatura ambiente e submetida à focalização isoelétrica (IEF) em IPGphor Manifold System (GE Healthcare).

Inicialmente, foi aplicada uma voltagem constante de 100 V por 4 horas, seguida de uma voltagem de 300 V até acumular 200 volts hora (Vh), seguido de um gradiente de 300 a 1000 V até acumular 300 Vh e novamente um gradiente foi realizado até acumular 4000 Vh. Finalmente, foi aplicada uma voltagem constante de 5000 V até acumular 1250 Vh.

3.5.2. Segunda dimensão – SDS-PAGE

Antes de ser aplicada à segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em 1,5 mL de solução de equilíbrio (tampão tris-HCl 75 mM pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 29,3%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,002%) contendo 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,26 mM, sob agitação, durante 15 minutos. Após este período, as fitas foram transferidas para uma segunda solução (composta pela mesma solução de equilíbrio), sem DTT, mas contendo iodoacetamida (IAA) 0,54 mM e agitadas por 15 minutos. Na segunda dimensão, as fitas, contendo as proteínas separadas pela IEF, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com 1,5 mm de espessura, utilizando uma cuba Ettan DALT (GE Healthcare). As fitas foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida polimerizado, juntamente com um padrão proteico de massa molecular Dual Color Precision Plus (Bio-Rad). Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Coomassie G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

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

Um mg de veneno liofilizado dissolvido em 1 mL de solução salina 0,85% e em seguida foi centrifugado a 13.000 RPM por 10 minutos. Dessa solução, foram aplicados 75 µL em uma coluna Teknokroma Europa 300 C-18 25 x 0,4 mm de fase reversa, equilibrada previamente com solução A (0,1% de ácido tricloroacético), utilizando-se o cromatógrafo JASCO LC-4000 Series. Seguindo um método anteriormente descrito por Calvete e colaboradores (2011), as amostras foram eluídas por meio de um gradiente da solução B (ácido tricloroacético 0,1% e acetonitrila 95%) nas seguintes condições: 5% (solução B) por 5 minutos, 5-25% (solução B) por 10 minutos, 25-45% (solução B) por 60 minutos, 45-70% (solução B) por 10 minutos, 70-100% por 10 minutos e mais 10 min de 100% de solução B, em um fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi monitorizada com comprimentos de onda de A₂₁₅.

3.7. Espectrometria de massas (MS)

3.7.1. Digestão enzimática, dessalinização e limpeza das amostras

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

3.7.2. Proteômica quantitativa – aquisição de espectrometria de massa (LC-MS/MS)

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

bloco de 100 °C e voltagem do cone de 40 V. A temperatura da coluna foi ajustada para 55 °C e as amostras foram mantidas em amostrador automático a 10 °C. Para calibração do sistema, uma solução de [Glu1]-Fibrinopeptídeo B (500 fmol/mL em 50% de metanol, 0,1% de ácido fórmico; Peptídeo 2.0) foi infundida através do pulverizador de referência a 2 µL / min e amostrada a cada 60 s para externo calibração (PEDROSO et al., 2017).

3.7.3. *Processamento de dados e identificação de proteínas*

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

3.8. *Western Blotting*

O método *Western blotting* (HARLOW, 1988) foi utilizado para verificar a ocorrência de reação imunológica entre as proteínas do veneno das serpentes *B. pauloensis* de diferentes idades e o soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan.

As proteínas presentes no veneno, após serem separadas por eletroforese em gel como descrito na seção 3.4, foram transferidas para uma membrana de PVDF (Sigma) previamente equilibrada em tampão de transferência (Tris 48 mM glicina 39 mM etanol 20% SDS 0,037%) em sistema BioRad por 35 min com voltagem constante (25 V). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução bloqueadora (leite desnatado em pó 5% contendo tween 20 0,01%) a 4 °C durante a noite. Esta foi, então, submetida à 3 lavagens sucessivas, sendo cada lavagem de 5 minutos, com solução de lavagem (tampão Tris 10 mM, pH 7,5 contendo NaCl 150 mM e tween 20 0,1%). A membrana foi então incubada com o anticorpo antibotrópico diluído 1:2.000 em solução de bloqueio, por 2 horas à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagens, a membrana foi incubada com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase), diluído 1:10.000 em solução de bloqueio, por 2 horas, à temperatura ambiente. Após mais um ciclo de lavagens, a reação foi revelada adicionando-se substrato cromogênico (5 mg de 3,3'-diaminobenzidina (tetrahidrocloreto), 10 mL de tampão imidazol 0,1 M, 125 µL de CaCl₂ 0,2 M e 3,4 µL H₂O₂ 30 %). A reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.9. *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*

A capacidade do soro antibotrópico comercial de reconhecer o veneno da *B. pauloensis* foi avaliada pelo teste de ELISA.

Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com 100 µg/mL de solução de antígeno (veneno de *B. pauloensis*) em tampão carbonato (Na₂CO₃ 34 mM, NaHCO₃ 15 mM) com pH 9,6 (100 µL/poço), em incubação durante a noite a 4 °C em câmara úmida. Após a fixação do antígeno, a placa foi lavada três vezes, durante 5 minutos, utilizando uma solução tampão de lavagem (PBS - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ com pH 7,4 + Tween 20 0,5%). O bloqueio foi realizado com a incubação de 200 µL/poço de solução bloqueadora (tampão carbonato + leite desnatado em pó 3%) por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após a segunda incubação, foi aplicada uma diluição seriada do soro antibotrópico, inicialmente diluído em 1:20.000 em tampão de incubação (PBS + leite desnatado em pó 1% + Tween 20 0,05% - 100 µL/poço) e incubada novamente por 1 hora a 37°C em câmara úmida. A placa foi então lavada como anteriormente descrito. O conjugado imunoenzimático (anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase) foi aplicado (100 µL/poço) diluído em 1:10.000 em tampão de incubação e incubado por mais 1 hora

a 37°C. Após o processo de lavagem, foi aplicado o substrato (OPD 1 mg/mL, H₂O₂ 0,1%) diluído em tampão citrato pH 5,0 e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico 30% (50 µL/poço) e a absorbância foi mensurada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices) utilizando-se o comprimento de onda de 492nm.

3.10. **Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO)**

A atividade de LAAO dos venenos foi determinada utilizando a metodologia de Kishimoto e Takahashi (2001). Os venenos liofilizados foram diluídos em solução salina 0,85% a uma concentração de 1 mg/mL. Dez µL das amostras foram incubados em microplacas com 90 µL de mistura reativa (Tris 50 mM pH 8,0, L-metionina 250 mM, o-fenilendiamina 2 mM (OPD) e peroxidase de rábano 0,8 U/mg) por uma hora a 37 °C. Em seguida, a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 2M e a leitura foi realizada a 492 nm. A atividade de LAAO é expressa pela quantidade de nmols de H₂O₂ liberados por micrograma de proteína por minutos de incubação (nmol/mg/min).

3.11. **Atividade fosfolipásica (PLA₂)**

Para a dosagem da atividade fosfolipásica foi utilizada a metodologia descrita por Holzer e Mackessy (1996), com algumas modificações. Esta atividade baseia-se na clivagem do substrato 4-nitro-3-(octanoloxo) benzoic acid (NOBA) na presença de fosfolipases. Em microplaca colorimétrica, foram pipetados 20µL de água deionizada, 20µL de NOBA em uma concentração final de 4,16 mM em acetonitrila, 200µL de tampão Tris 10mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 100mM pH 8,0 e 20µL da amostra a 1 mg/mL. A reação foi incubada a 37° C e a medição foi realizada a 425nm a cada 10 min. A atividade é expressa em unidades (U - nmols de cromóforos liberados) por minutos de incubação por microgramas de proteína (U/min/mg), sendo que o aumento de 0,1 unidade da leitura equivale à liberação de 25,8 nmol de cromóforo.

3.12. **Atividade de hialuronidase**

A atividade de hialuronidase foi determinada de acordo com Pukrittayakamee e colaboradores (1988), com algumas modificações. Em microtubos de 1,5 mL, 30 µg de veneno ressuspensos em solução salina 0,85% (30 µL) foram incubados com o substrato ácido hialurônico (1 mg/mL) (50 µL) e tampão acetato (acetato de sódio-ácido acético 0,2 M, pH 6,0, contendo 0,15 M de NaCl) (170 µL) por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, 500 µL de brometo de cetiltrimetilamônio 2,5% em NaOH 2% foram adicionados à reação e, após um intervalo de 10 minutos, a absorvância da reação foi mensurada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices) utilizando-se o comprimento de onda de 400 nm. A atividade foi determinada pela redução da turbidez das amostras, considerando como 100% de turbidez a absorvância da reação em que não foi adicionado veneno. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.13. **Atividade proteolítica sobre a caseína**

A atividade proteolítica sobre a caseína foi determinada conforme descrito por Antunes e colaboradores (2010), com modificações. Em um microtubo foram adicionados 10 µL de solução de veneno (1 mg/mL) e 85 µL de uma solução de azocaseína 4,25 mg/mL (Sigma) solubilizada em solução tampão Tris-HCl 100 mM CaCl₂ 10 mM pH 8,8. A mistura foi incubada por 90 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1700 g por 5 minutos a 4°C e a absorvância dos sobrenadantes com adição e 100 µL 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 absorvância a 450 nm. A atividade específica foi expressa como unidades por miligramas de proteína (U/min/mg).

3.14. **Atividade proteolítica sobre o colágeno**

A atividade proteolítica sobre o colágeno foi determinada segundo Vachova e Maravcova (1993), utilizando azocoll (Sigma) como substrato. Foram incubados 6,25 µL de uma solução de veneno 1 mg/mL com 197,75 µL em tampão Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄

3 mM, HEPES 10 mM, dextrose 5,4 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM) e 50 µL de uma solução de azocoll 5 mg/mL solubilizado em tampão Tyrode por 1 hora a 37°C em termomixer, com agitação constante (1000 RPM). A reação foi interrompida com gelo por 5 minutos e, em seguida, foi realizada uma centrifugação a 5.000 g por 3 minutos. A absorbância dos sobrenadantes (200 µL) foi mensurada em leitor de placas Spectra Max i3 (Molecular Devices) utilizando-se o comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de veneno que causa um aumento de 0,003 unidade de absorbância. A atividade específica foi expressa como unidades por miligrama de proteína por minuto (U/min/mg). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.15. **Atividade proteolítica pelo método de Zimografia**

Para a zimografia em gel foi utilizado o método descrito por Heussen e Dowdle (1980) com algumas modificações. Os venenos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo caseína ou gelatina (Sigma) na concentração final de 1 mg/mL. Após a corrida, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em solução de 2,5% do detergente triton X-100 e, em seguida, os géis foram lavados por 5 minutos em H₂O₂ deionizada. Por fim, os géis foram mantidos em solução tampão (Tris-HCl 30 mM, NaCl 200 mM, 0,02% NaN₃, pH 7,4) durante a noite a 37 °C. Os géis foram corados utilizando-se *Coomassie Blue* R350, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

3.16. **Dose mínima coagulante sobre o plasma (DMC)**

A Dose Mínima Coagulante (DMC) é definida como a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução padronizada de plasma citratado em 60 segundos a 37 °C (THEAKSTON; REID, 1983). Os venenos foram diluídos em solução salina 0,85%, em diferentes concentrações, e os tempos de coagulação foram obtidos adicionando-se 50 µL de CaCl₂ 25 mM previamente à adição de 50 µL de cada solução de veneno às alíquotas de 100 µL de plasma humano mantidos a 37°C. O tempo de coagulação foi cronometrado imediatamente após a adição da solução de veneno. Esse teste foi realizado em coagulômetro Maxcoag.

3.17. **Atividade de trombina-símile**

A atividade de trombina-símile foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante utilizando o substrato S-2238 (Chromogenix). Os venenos liofilizados foram diluídos em solução salina 0,85% a uma concentração de 1 mg/mL. Em uma placa colorimétrica, foram incubados 5 µL de veneno, 10 µL do substrato (3,5 mg/mL) e 90 µL de tampão (Tris 50 mM pH 8,0) por 5 minutos à 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 90 µL de ácido acético 20% e foi realizada a leitura a 405 nm.

3.18. **Atividade Hemorrágica**

A proposta do teste é comparar a área hemorrágica em tecido abdominal de camundongos após eles terem sido submetidos à injeção de mesma quantidade de diferentes venenos. A quantidade de veneno utilizado foi baseada no cálculo da Dose Mínima Hemorrágica (DMH) já realizado pelo grupo (DMH *B. pauloensis* = 2,96 ug/animal).

Grupos de três camundongos foram inoculados com 3 µg de veneno diluídos em 100 µL de solução salina, via intradérmica, na região abdominal dos animais. Após 3 horas, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, o tecido abdominal foi removido, colocado sobre um transiluminador e a área hemorrágica foi avaliada através do programa ImageJ.

3.19. **Atividade Letal - Tempo de morte**

Como sugestão da comissão de ética, para evitar o uso de muitos animais, foi proposto um teste de tempo de morte, em substituição ao teste de dose letal 50%.

A proposta do teste é comparar o tempo de morte em camundongos após os diferentes grupos terem sido submetidos à injeção da mesma dose de veneno. O teste foi determinado de acordo com o trabalho de Del-Rei e colaboradores (2019), com adequações para a espécie utilizada. Foi injetado pela via intraperitoneal 100 µg de veneno diluído em 500 µL de salina em cada camundongo. Foi marcado o horário após ser injetado o último animal do grupo (n =5) e os tempos de morte de cada indivíduo/grupo foram registrados. Os animais foram monitorados durante 24h, período em que os sobreviventes não apresentavam mais sinal de instabilidade.

3.20. **Análise estatística**

Para a análise dos dados, foram realizados o teste ANOVA de duas vias para comparação entre as idades e o sexo. As comparações entre macho e fêmea foram realizadas em cada grupo de idade. Detalhes da estatística realizada entre todos os grupos segue no Apêndice 2 e 3. As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 7. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$.

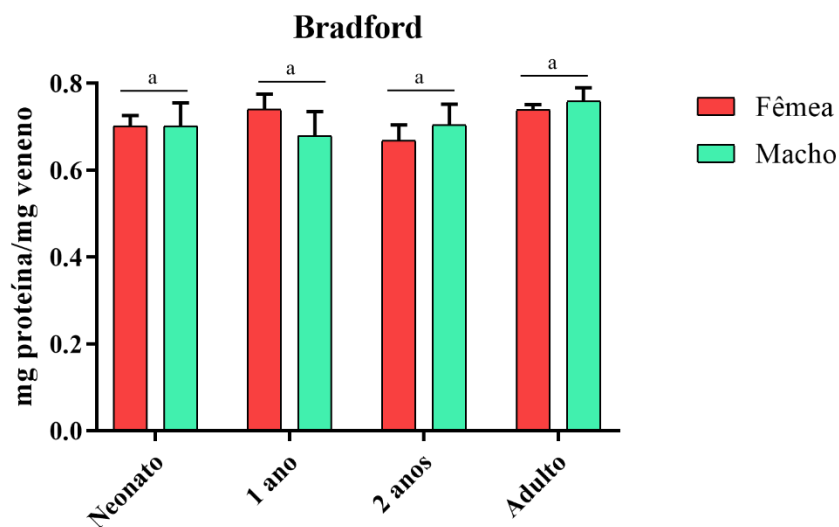
4. Resultados

4.1. Caracterização proteica dos venenos

4.1.1. Dosagem de proteínas

Com intuito de avaliar o conteúdo proteico dos venenos, foi realizada a dosagem de proteínas pela metodologia de Bradford (Figura 2). Não foi encontrada diferença na concentração proteica entre nenhum dos grupos, tanto entre as idades quanto aos sexos.

Figura 2. Dosagem de proteínas dos venenos de *B. pauloensis* realizada pela metodologia de Bradford. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade.



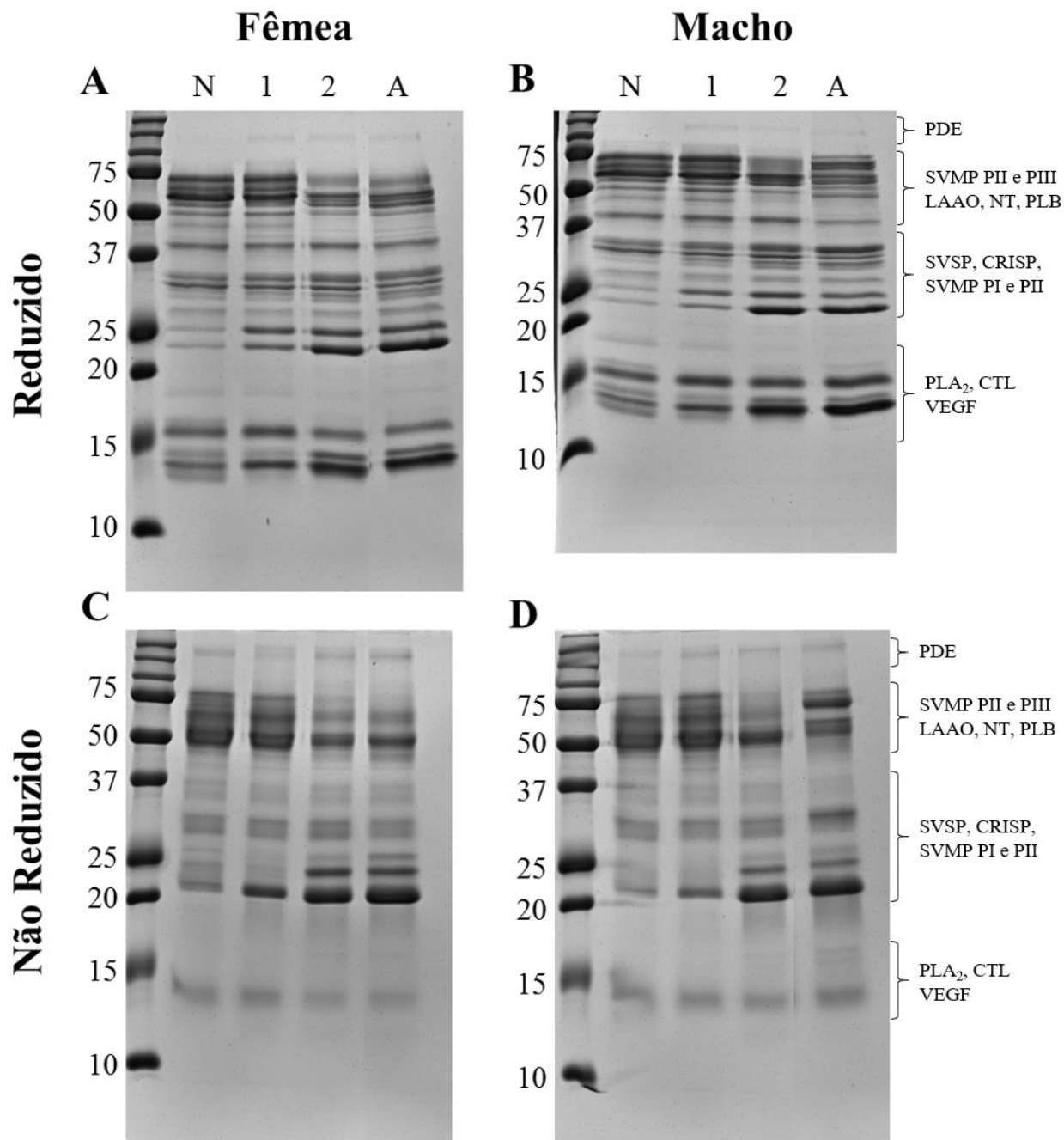
4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE foi realizado com as amostras em condições reduzidas e não reduzidas. Para facilitar a comparação, os géis foram agrupados por gênero: amostras das fêmeas em ordem crescente de idade (Figura 3A e C) e amostras do macho em ordem crescente de idade (Figura 2 B e D). A discussão em relação às possíveis proteínas presentes em cada região do gel será baseada nos resultados obtidos por análise por espectrometria de massas (Apêndice 6).

Com relação aos géis com amostra reduzida (Figura 3A e B), podemos observar que as bandas próximas a 15 kDa diminuem em quantidade, mas há um aumento de intensidade de três bandas principais conforme os indivíduos ficam mais velhos. Essas bandas próximas de 15 kDa podem ser fosfolipases A₂ (PLA₂), lectinas tipo c (CTL) ou fatores de crescimento endotelial (VEGF). Na região próxima a 25 kDa há duas bandas que se intensificam no avanço da idade das serpentes. Essa região pode conter serinoproteases (SVSP), proteínas secretada rica em cisteína (CRISP) e até metaloproteases (SVMP) tipo I e II. É notável que na região entre 50 e 75 kDa, possivelmente contendo SVMP, nucleotidasas (NT), fosfolipases B (PLB) e L-amino oxidases (LAAO), os venenos de neonatos e de um ano apresentam maior quantidade de bandas, que parece reduzir nas idades posteriores. Uma banda acima de 75 kDa, possivelmente uma fosfodiesterase (PDE), está presente em todas as idades, exceto nos neonatos de ambos dos sexos. A principal diferença evidente entre o *pool* de machos e de fêmeas está na idade adulta, em que o macho apresenta uma maior variedade de bandas de alta massa molecular (acima de 50 kDa).

Os géis com amostras não reduzidas (Figura 2C e D) apresentaram diferenças ontogenéticas na composição do veneno semelhantes ao gel com amostras reduzidas: aumento significativo em uma banda de aproximadamente 20 kDa, o surgimento de duas bandas próximas a 25 kDa nos 2 anos de idade e, além disso, o surgimento de duas bandas com massas moleculares acima de 15 kDa nos machos de 3 anos e adultos que aparece levemente no *pool* das fêmeas. Novamente é possível observar a diferença entre o grupo de adultos machos e fêmeas na região entre 50 e 75 kDa, em que aparece uma forte banda nos machos que não está presente nas fêmeas.

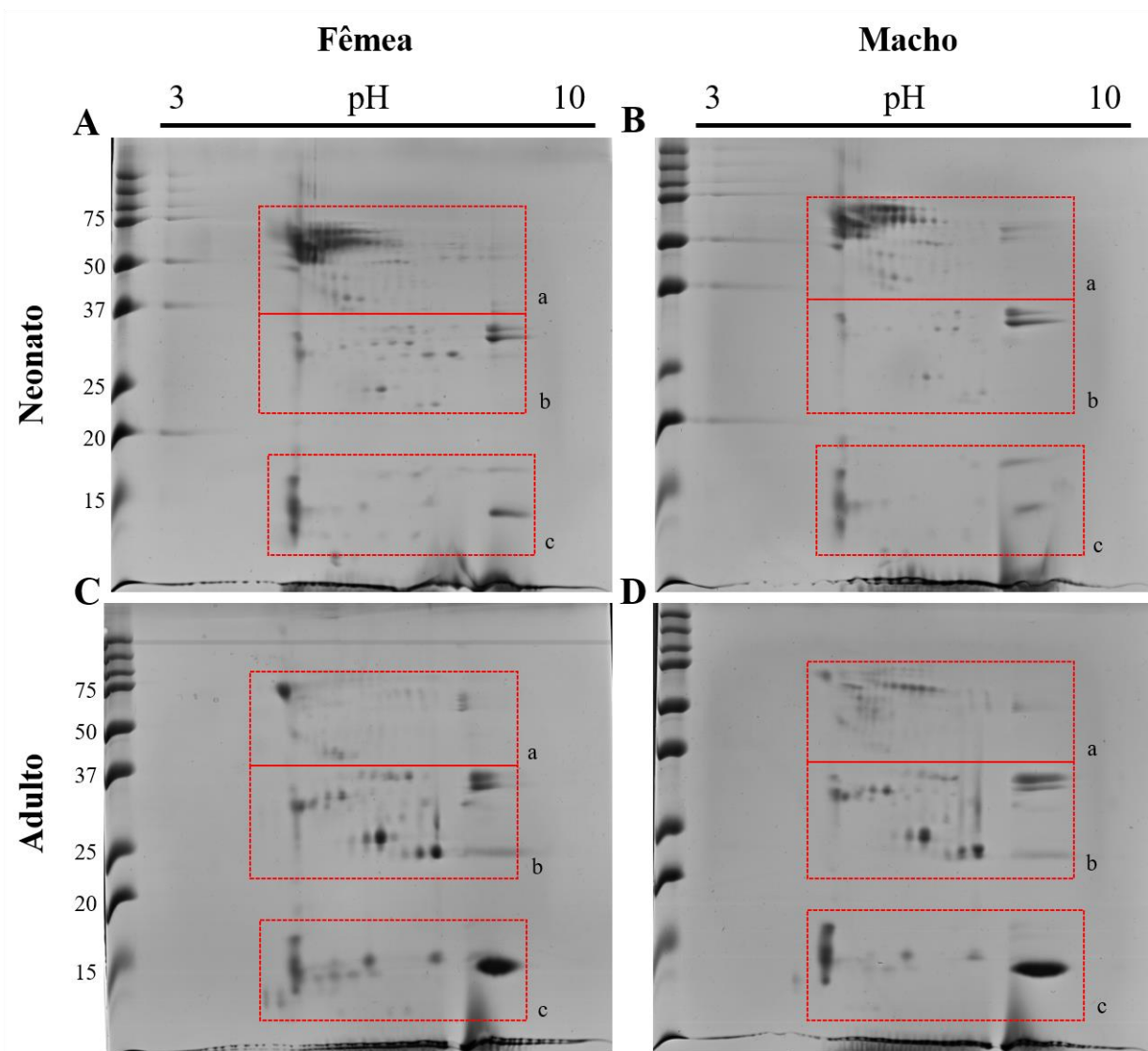
Figura 3. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 15% dos venenos de *B. pauloensis* em ordem crescente de idade em cada gel. Os painéis superiores são de amostras em estado reduzidas e os inferiores de amostras em estado não reduzido do grupo das fêmeas (A e C) e dos machos (B e D). N – Neonatos; 1 – 1 ano; 2 – 2 anos; A – Adultos. PDE – fosfodiesterases; SVMP - metaloproteases; SVSP - serino proteases; CTL - lectina tipo C; PLA₂ - fosfolipase A₂; LAAO - L-amino ácido oxidase; CRISP - proteína secretada rica em cisteína, VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; PLB – fosfolipase B; NT – nucleotidases.



4.1.3. Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Os géis de eletroforese bidimensional (2-DE) apresentaram diferenças semelhantes às observadas no SDS-PAGE (Figura 4). Os neonatos, de ambos dos sexos, apresentaram uma maior quantidade de proteínas de alta massa molecular (região a). Os machos adultos apresentaram mais proteínas nessa região do que as fêmeas adultas, característica que também pôde ser observada no SDS-PAGE. Nessa região, entre 37 e 75 kDa, são encontradas as LAAOs, NTs, PLBs e SVMPs (Apêndice 6). A região b, central no gel, podemos notar um aumento do número e de intensidade de *spots* nos adultos quando comparados com os neonatos. Essa região contém as proteínas entre 20 e 37 kDa, que correspondem às SVSPs, SVMPs PI e PII e CRISPs. Na região c, onde são encontradas proteínas entre 10 e 20 kDa como as CTLs, VEGFs e as PLA₂s, é possível observar um aumento do número de *spots* no grupo dos adultos em relação aos neonatos, de forma mais intensa nas fêmeas. Os adultos, tanto machos quanto fêmeas, apresentaram a intensificação da banda do lado mais alcalino dessa região.

Figura 4. Eletroforese bidimensional (2-DE) dos venenos de *B. pauloensis* neonatos (A e B) e adultos (C e D), fêmeas (A e C) e machos (B e D). As proteínas do veneno foram focalizadas em seus pontos isoelétricos (primeira dimensão) e separadas por SDS-PAGE 15% (segunda dimensão).



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

Assim como observado nos SDS-PAGEs, os cromatogramas apresentaram uma variação na composição bioquímica do veneno das serpentes nas diferentes idades (Figura 5 e Apêndice 4). A figura 4 apresenta os cromatogramas dos *pools* de machos e fêmeas sobrepostos para melhor comparação. Os cromatogramas individuais estão no Apêndice 4. A discussão em relação às famílias de proteínas atribuídas a cada região dos cromatogramas será embasada no trabalho de venômica realizado por Rodrigues e colaboradores (2012) e nas proteínas identificadas por espectrometria de massas (Apêndice 6).

Todos os cromatogramas apresentaram um perfil bem semelhante, cujos picos correspondem às seguintes proteínas: região próxima aos 20 minutos - disintegrinas (DIS); antes dos 50 minutos - PLA₂; entre os 50 e 75 minutos - PLA₂, CTL, CRISPS e SVSP; e, após os 75 min - SVMMP e as LAAOs, respectivamente.

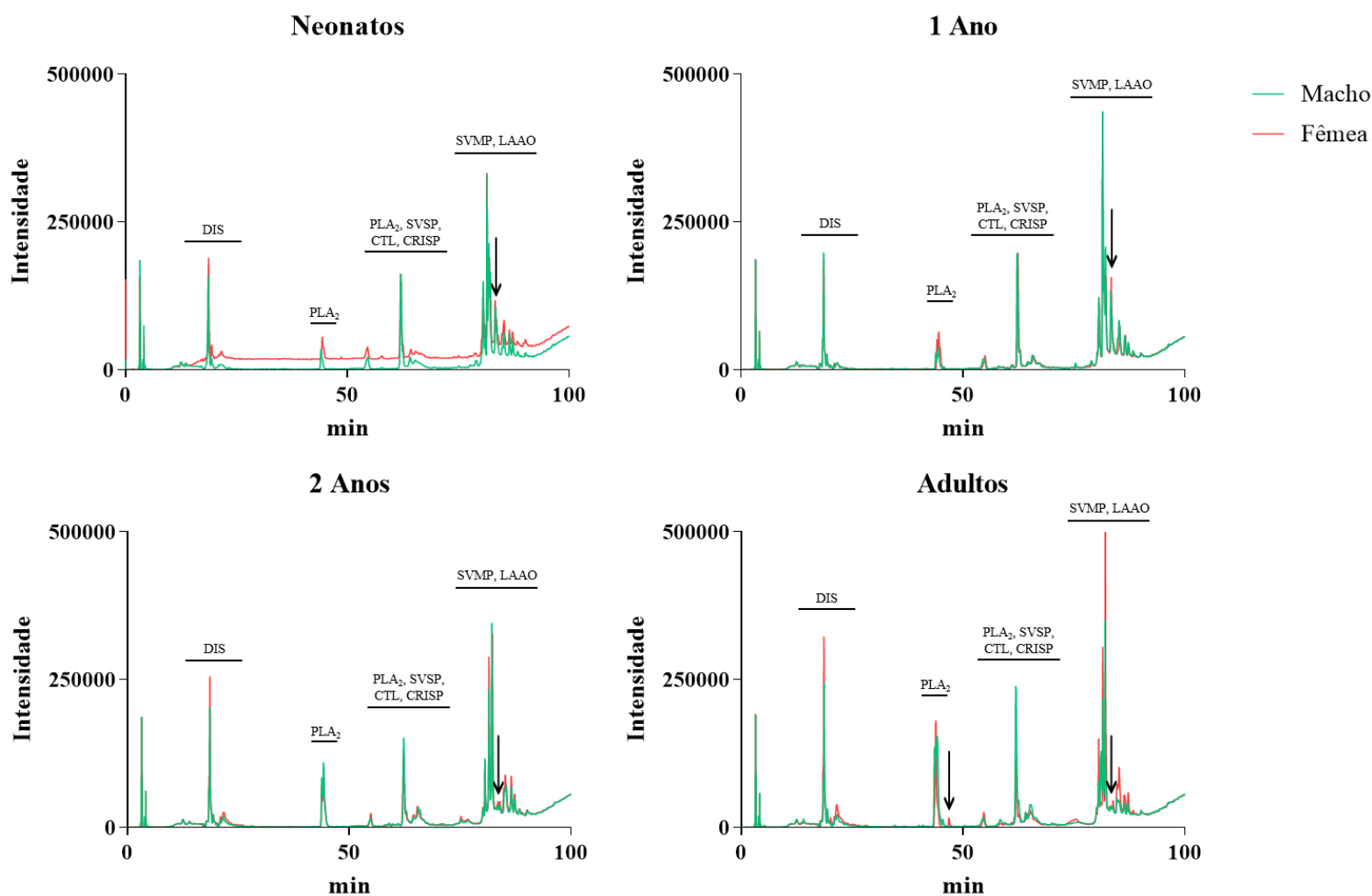
Analisando a primeira parte dos cromatogramas, em que estariam localizados os picos referentes às DIS, é possível notar um aumento em ambos dos sexos dos picos conforme a idade, principalmente nas fêmeas. Apesar de não terem sido encontradas DIS na espectrometria de massas, as DIS poderiam aparecer no HPLC por terem sido clivadas de SVMMPs (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002; KINI; EVANS, 1992). O pico anterior aos 50 min também apresenta um aumento de intensidade conforme a idade avança. Próximo a esse pico, podemos observar no cromatograma das fêmeas adultas um pico pequeno que não está presente em mais nenhum outro grupo (indicado por uma seta).

A região entre 50 e 75 min apresenta um pequeno pico no começo, um pico mais alto central e, após esse pico, um conjunto de picos menores em todos os cromatogramas. No caso do pico central, ele apresenta uma intensidade maior nos machos do que nas fêmeas na idade adulta. No grupo das fêmeas de 2 anos e adultas a intensidade desse pico é mais baixa do que nas demais idades. Na região após esse pico central há um aumento de intensidade nos 2 anos que se mantém na idade adulta. É notável também o aumento de alguns picos entre o primeiro pico e o pico central nos adultos de ambos dos sexos.

A região final, após 75 min, apresentou a maior quantidade de picos em todos os grupos. Um pico, no meio dos demais picos (indicado por uma seta), está presente nos grupos de neonatos e de 1 ano de ambos os sexos, mas não dos grupos mais velhos. Também é possível notar um aumento de intensidade nos picos nos grupos de 1 ano, que depois retorna a valores mais baixos

nas demais idades. No caso das fêmeas, podemos observar que há um aumento da intensidade desses picos na idade adulta. O grupo dos machos, com exceção a idade de 1 ano, aparenta sofrer menos alteração de intensidade nessa região, com uma leve diminuição da intensidade dos picos finais na idade adulta.

Figura 5. Perfil cromatográfico, obtidos por RP-HPLC, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. DIS – disintegrinas; SVMP - metaloproteases; SVSP - serino proteases; CTL - lectina tipo C; PLA₂ - fosfolipase A₂; LAAO - L-amino ácido oxidase; CRISP - proteína secretada rica em cisteína. A identificação das proteínas presentes em cada região do cromatograma foi baseada nos resultados obtidos pelo trabalho de Rodrigues e colaboradores (2012).



4.1.5. Espectrometria de massas (MS)

A análise por espectrometria de massas dos venenos identificou 144 proteínas no total, distribuídas em 13 grandes famílias (Figura 6; Apêndice 5 e 6). As famílias identificadas foram as fosfolipases A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidases (LAAO), serino proteases (SVSP), metaloproteases (SVMP), lectinas tipo C (CTL), fatores de crescimento endotelial (VEGF), fatores de crescimento neural (VNGF), hialuronidases (HYA), glutaminil-peptídeo ciclotransferases (QPCT), fosfolipases B (PLB), CRISPs, nucleotidases (NT) e fosfodiesterases (PDE).

Assim como encontrado no trabalho de Rodrigues e colaboradores (2012), a família mais abundante nos venenos das *B. pauloensis* foi a SVMP em todos os grupos analisados nesse trabalho. É notável uma queda da abundância relativa das SVMPs nos grupos mais velhos. O grupo de neonatos e 1 ano, em ambos dos sexos, apresentam por volta de 54% de SVMPs, enquanto os grupos de 2 anos e adultos apresentam entre 32-36% dessa mesma família. O oposto foi observado para o grupo das SVSPs, que apresentou um aumento de abundância nos animais mais velhos. No caso das fêmeas, a abundância dessa família se eleva de 9% nos neonatos até próximo de 14% nos 2 anos, valor que se mantém aproximado nos adultos. Nos machos a abundância aumentou de 9,5% nos neonatos para 16% no grupo de 2 anos, e se eleva para 18% no grupo dos adultos, resultando em uma abundância maior do que encontrado nas fêmeas adultas. Assim como as SVSPs, as CTLs apresentaram um aumento de abundância nos grupos mais velhos. Os grupos de neonatos apresentaram 7,8% e 10,2% de CTLs nos machos e fêmeas, respectivamente. Em ambos dos sexos a abundância decaí no grupo de 1 ano de idade, mas se eleva nos grupos de 2 anos e se mantém em valores próximos nos adultos. As fêmeas apresentaram uma maior abundância de CTL do que os machos em todas as idades, com valores próximos a 25% nos grupos mais velhos, enquanto os machos apresentaram valores próximos a 15%.

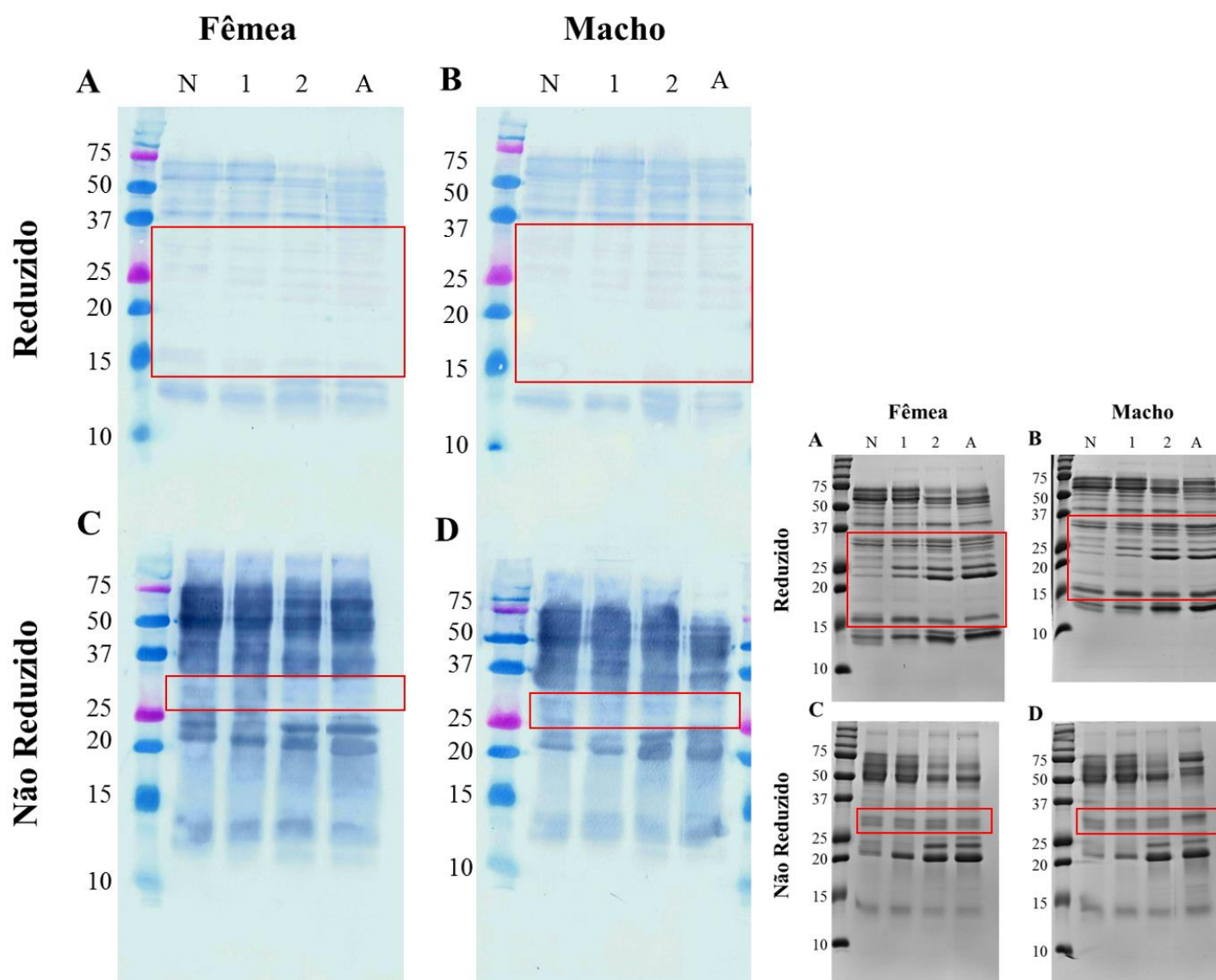
A alteração de abundância de PLA₂ entre as idades se mostrou diferente para machos e fêmeas. Enquanto nos machos o valor se mantém próximo a 9% nos neonatos, 1 e 2 anos, e se eleva para próximo de 12,5% nos adultos, as fêmeas apresentam menos estabilidade nessas abundâncias, além de uma queda de abundância quando comparado o grupo de neonatos (8,4%) com o grupo adulto (6,5%). Houve um aumento da abundância de LAAO conforme os grupos ficavam mais velhos no caso das fêmeas, de 3,7% nos neonatos para 9,4% nos adultos. Já no caso dos machos, a abundância de LAAO se manteve nos neonatos e 1 ano (3,7%), se elevando para 9,3% no grupo de 2 anos e decaindo nos adultos para 7,3%. Em ambos dos sexos, os animais mais

4.2. Análise do imunorreconhecimento dos venenos pelo soro antitetrápico

4.2.1. *Western blotting*

Observando o *western blotting* (Figura 7), notamos que não há uma variação evidente de reconhecimento do soro entre o veneno de serpentes de diferentes idades e gênero. Em todas as amostras é notável a deficiência do soro em reconhecer proteínas entre 15 e 37 kDa, região onde há um conjunto de bandas claramente esmorecidas em comparação às que estão presentes na mesma região do SDS-PAGE (inserido na Figura 6). Mesmo a intensificação de bandas observada no SDS-PAGE nessa região em idades mais avançadas não ocorre no *western blotting*. Essa região corresponde as PLA₂, VEGF, SVSPs, SVMP tipo I, CTL e CRISPs.

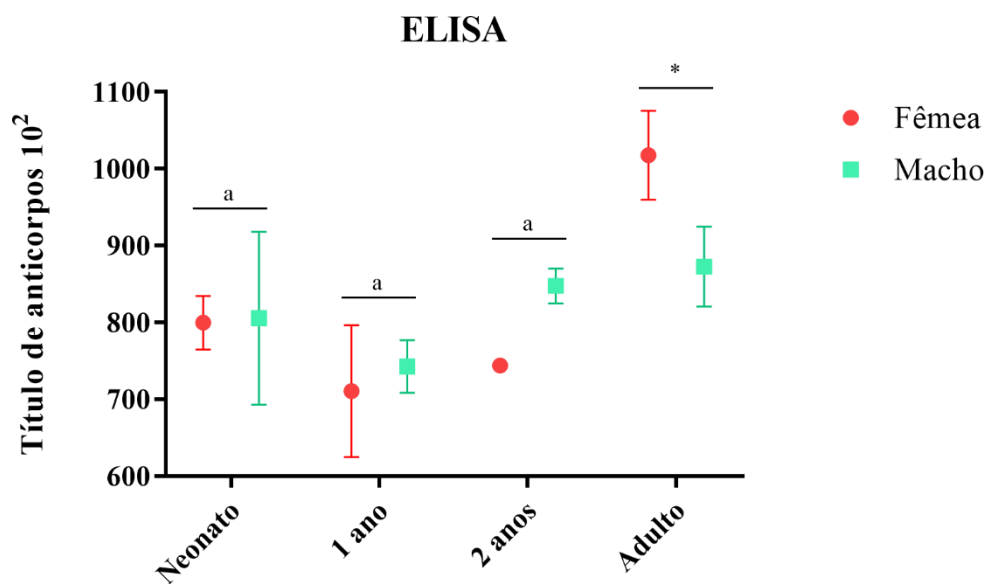
Figura 7. Western blotting dos venenos de *B. pauloensis* incubada com soro antitoxico em ordem crescente de idade. Os painéis superiores são de amostras reduzidas e os inferiores de amostras não reduzidas do grupo das fêmeas (A e C) e dos machos (B e D). N – Neonatos; 1 – 1 ano; 2 – 2 anos; 3 – 3 anos; A – Adultos. A imagem do SDS-PAGE (Fig. 2) está inserida para melhor comparação.



4.2.2. ELISA

O resultado do ELISA mostrou que os três primeiros grupos não apresentaram diferença de imunointeração tanto entre as idades como entre os sexos (Figura 8). Na idade adulta, no entanto, existe uma diferença entre os *pools* de machos e fêmeas, com um reconhecimento do soro antibotrópico 16% maior do veneno das fêmeas em relação aos machos. O grupo de adultos apresentou um maior imunorreconhecimento do que os demais grupos, com um reconhecimento de aproximadamente 20% maior em relação ao grupo de 2 anos.

Figura 8. Titulação de anticorpos do soro antibotrópico por ELISA dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. O cálculo da titulação de anticorpos é realizado a partir do valor da diluição do soro antibotrópico multiplicado pelo valor da leitura a 492 nm. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade.

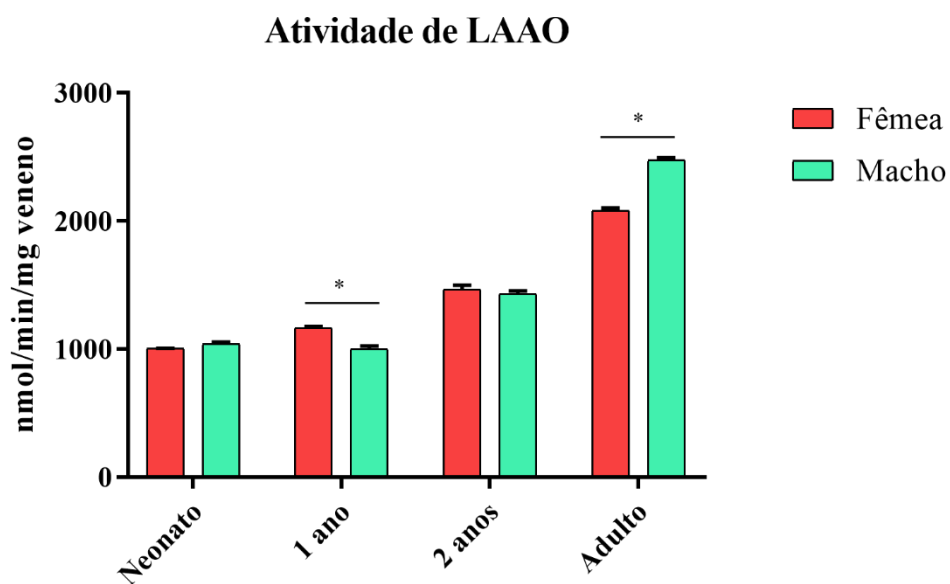


4.3. Caracterização das atividades enzimáticas e biológicas dos venenos

4.3.1. Atividade de LAAO

Durante as extrações dos venenos já foi possível observar um degradê de amarelo, que foi ficando mais intenso conforme os animais eram mais velhos. A cor amarelada em venenos é associada à riboflavina, um cofator presente na LAAO (IZIDORO et al., 2014). Como esperado, a atividade dessa enzima foi crescente com a idade dos animais (Figura 9). Há uma diferença significativa na atividade entre os *pools* de macho e de fêmea nas idades de 1 ano e adulta, em que na idade de 1 ano o *pool* das fêmeas apresentou uma atividade 16% maior, enquanto na idade adulta os machos apresentaram uma atividade 19% maior.

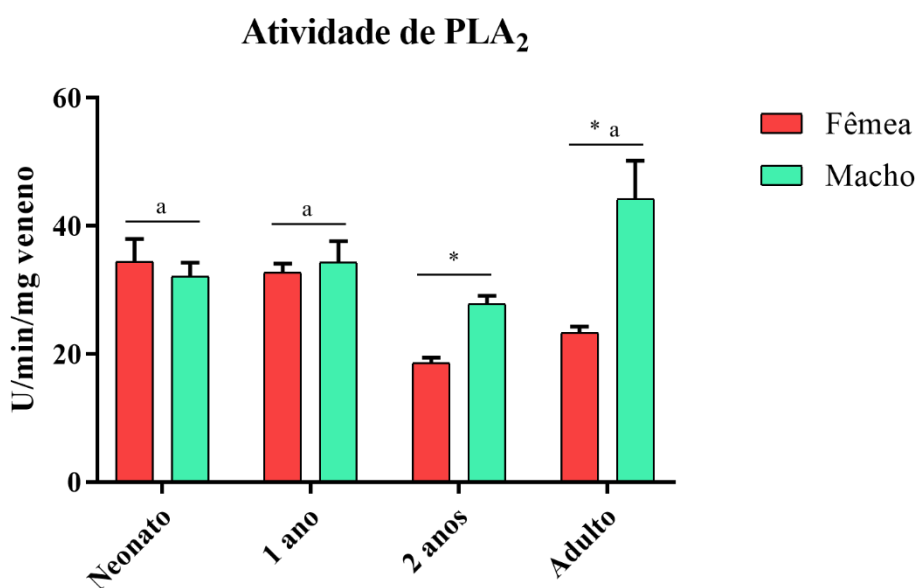
Figura 9. Atividade de LAAO, utilizando L-metionina como substrato, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade de LAAO é expressa pela quantidade de nmols de H₂O₂ liberados por micrograma de proteína por minutos de incubação. Todos os grupos de idade apresentaram diferenças estatísticas. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade.



4.3.2. Atividade de PLA₂

A atividade de PLA₂ não mostrou um padrão definido de variação durante a ontogenia (Figura 10). A atividade se mantém constante nos grupos de neonatos e de 1 ano, decaindo em ambos dos sexos no grupo de 2 anos. No grupo das fêmeas, a atividade se mantém baixa na idade adulta, diferente do grupo dos machos, em que a atividade aumenta significativamente nos adultos, resultando em uma atividade 90% maior do que das fêmeas.

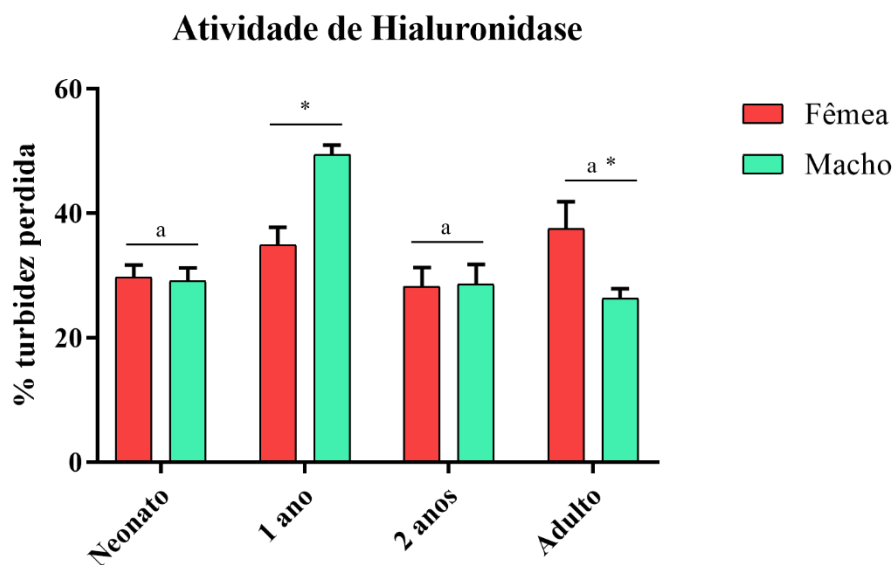
Figura 10. Atividade de PLA₂, utilizando NOBA como substrato, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade de PLA₂ é expressa em unidades (U - nmols de cromóforos liberados) por minutos de incubação por microgramas de proteína, sendo que o aumento de 0,1 unidade da leitura equivale à liberação de 25,8 nmol de cromóforo. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade.



4.3.3. Atividade de hialuronidase

A atividade de hialuronidase parece não ter nenhuma relação com a idade e o sexo dos animais (Figura 11). O grupo de 1 ano tem um aumento de 43% da atividade em relação aos neonatos, mais acentuado no grupo dos machos, que volta a atividades mais baixas a partir dos 2 anos. As fêmeas mostram um aumento da atividade novamente na idade adulta, resultando em uma atividade 43% mais alta do que os machos.

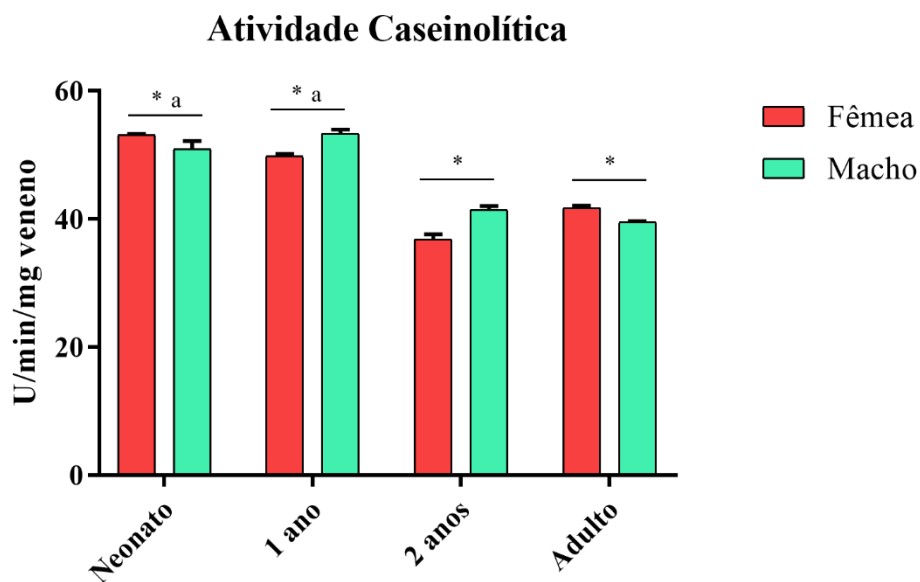
Figura 11. Atividade de hialuronidase, utilizando ácido hialurônico como substrato, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade foi determinada pela redução da turbidez das amostras, considerando como 100% de turbidez a absorbância da reação em que não foi adicionado veneno. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade.



4.3.4. Atividade proteolítica sobre a caseína

A atividade proteolítica sobre a caseína apresentou valores aproximadamente 30% maiores para os mais jovens (grupo de neonatos e de 1 ano) quando comparado aos mais velhos (Figura 12). Em todos os grupos de idade há uma diferença significativa entre a atividade dos *pools* de macho e fêmea, entretanto, de forma não padronizada. Nas idades de 1 e 2 anos a atividade é 7% e 12% mais alta nos machos, respectivamente, enquanto nos neonatos e nos adultos a atividade é aproximadamente 5% maior nas fêmeas.

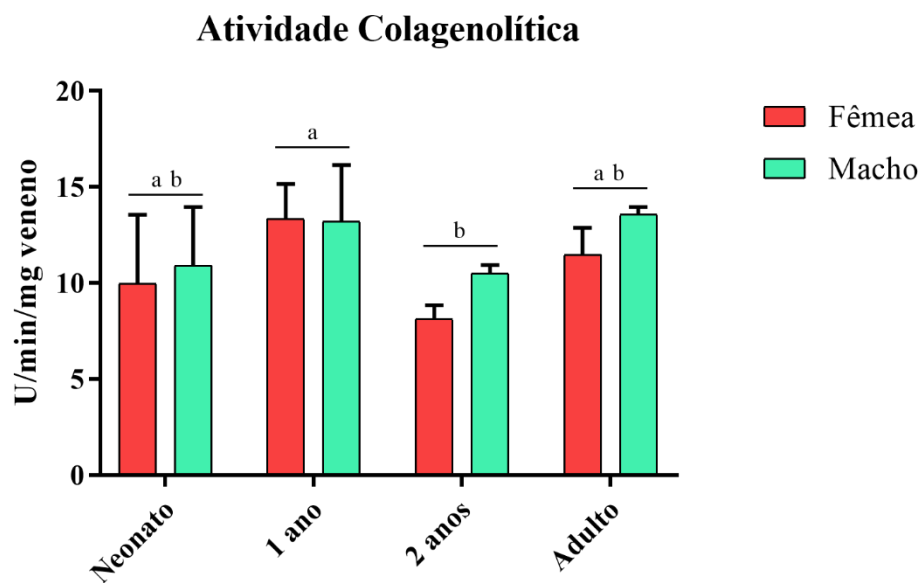
Figura 12. Atividade caseinolítica dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade específica é expressa em unidades (U - quantidade de veneno que causa um aumento de 0,005 unidade de absorvância a 450 nm) por minuto de incubação por miligramas de proteína. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade.



4.3.5. Atividade proteolítica sobre o colágeno

Na atividade colagenolítica não foram encontradas diferenças nas atividades entre os sexos de nenhuma idade, assim como nenhuma tendência de aumento ou diminuição de atividade conforme a idade (Figura 13). Há apenas uma diferença na idade de 2 anos, que possui o valor relativamente mais baixo do que os demais, assim como observado para essa idade na atividade sobre a caseína. O grupo de 1 ano apresentou uma atividade 46% mais alta quando comparada ao grupo de 2 anos.

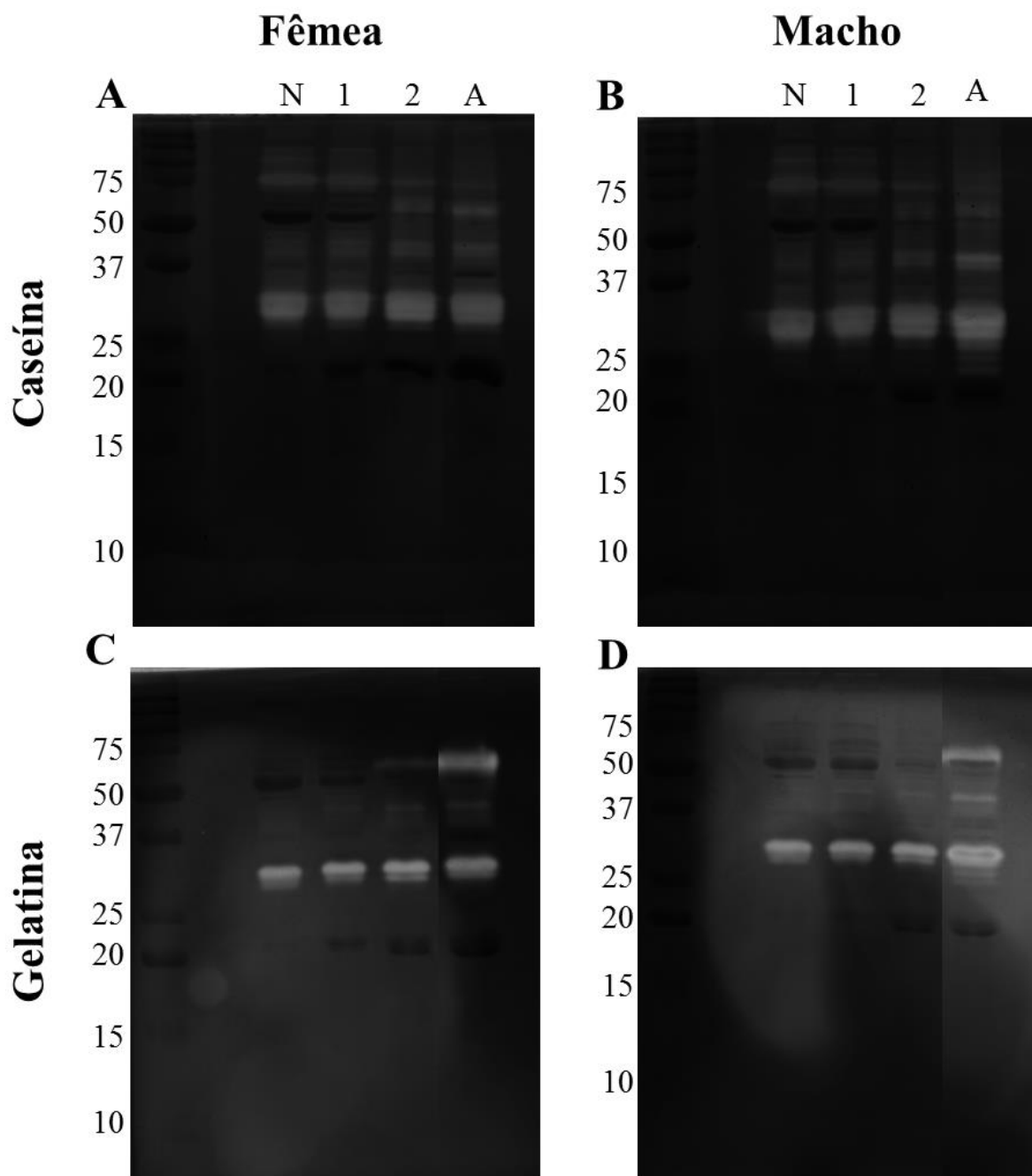
Figura 13. Atividade de colagenolítica dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. A atividade específica é expressa em unidades (U - quantidade de veneno que causa um aumento de 0,003 unidade de absorbância a 540 nm) por minuto de incubação por miligramas de proteína. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade.



4.3.6. Zimografia

Analisando o gel com caseína como substrato (Figura 14 A e B), podemos observar que uma banda próxima aos 75 kDa diminui levemente de intensidade conforme a idade. Essa banda aparenta ser a única cuja atividade diminui com a idade. Uma banda entre 37 e 50 kDa se intensifica, ficando bem evidente na idade adulta nos machos. Uma banda surge um pouco acima de 50 kDa aos 2 anos de idade em ambos dos sexos. A banda entre 25 e 37 kDa apresenta a maior atividade proteolítica, e aparenta uma leve intensificação conforme os animais ficam mais velhos. Algumas bandas surgem abaixo de 25 kDa exclusivamente no grupo dos machos adultos. A zimografia utilizando gelatina como substrato mostrou um perfil parecido (Figura 14 C e D): intensificação das bandas entre 37 e 50 kDa, e entre 25 e 37 kDa; e o surgimento de uma banda entre 50 e 75 kDa, que aparece primeiramente fraca nas fêmeas aos 2 anos e que fica bem intensa nos adultos, enquanto nos machos ela surge já bem intensa na idade adulta. Novamente no gel dos machos adultos surgem duas bandas abaixo de 25 kDa, que não são observadas no gel das fêmeas. A banda próxima a 75 kDa, que é mais intensa no grupo dos neonatos e de 1 ano, não aparece no gel com substrato de gelatina, sugerindo que provavelmente essa banda corresponde a uma SVSP, considerando que o colágeno é um substrato preferencialmente degradado por SVMP.

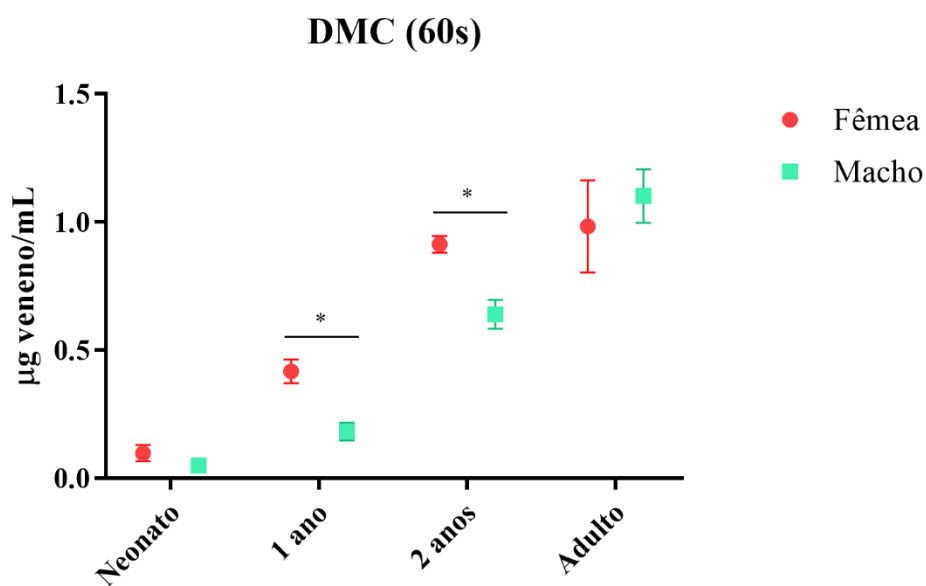
Figura 14. Zimografia em SDS-PAGE 15% dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo, contendo caseína (A e B) e gelatina (C e D) como substrato. N – Neonatos; 1 – 1 ano; 2 – 2 anos; A – Adultos.



4.3.7. Dose Mínima Coagulante (DMC)

A DMC mostrou uma maior atividade coagulante no grupo dos neonatos que diminui conforme os animais ficam mais velhos (Figura 15). A atividade diminui a partir do 1 ano de idade, e continua diminuindo gradativamente até a idade adulta. Diferenças entre o grupo de machos e fêmeas foram observadas apenas nos grupos de 1 e 2 anos, com a atividade do macho maior nesses grupos.

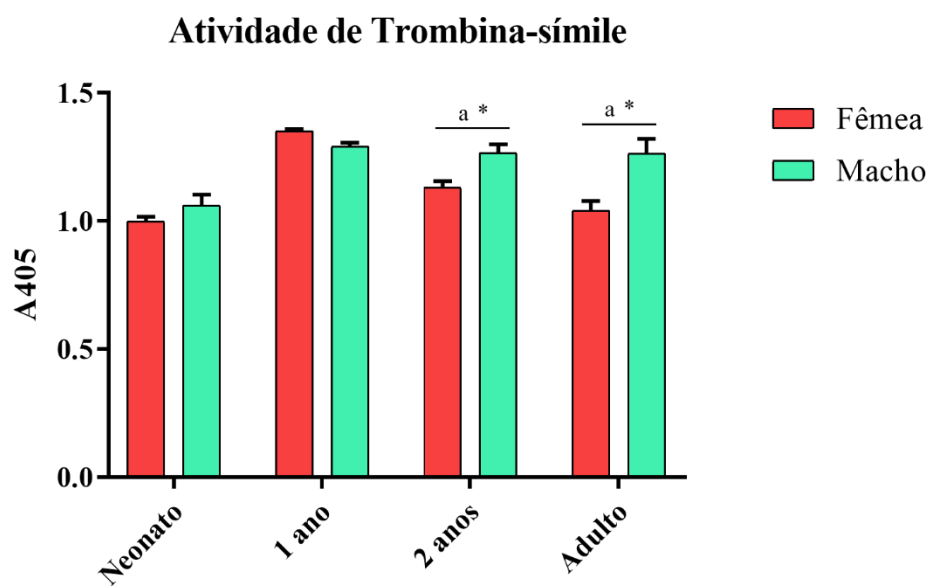
Figura 15. Dose mínima coagulante em plasma humano dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. Todos os grupos de idade apresentaram diferenças estatísticas. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade.



4.3.8. Atividade de trombina-símile

A atividade, realizada utilizando substrato S-2238, não demonstrou ter relação com a idade dos animais, intercalando atividades levemente mais baixas ou mais altas nos grupos de idade (Figura 16). Foram observadas diferenças entre o *pool* de machos e fêmeas nas idades de 2 anos e adultos, com a atividade dos machos 11% e 21% mais elevada, respectivamente.

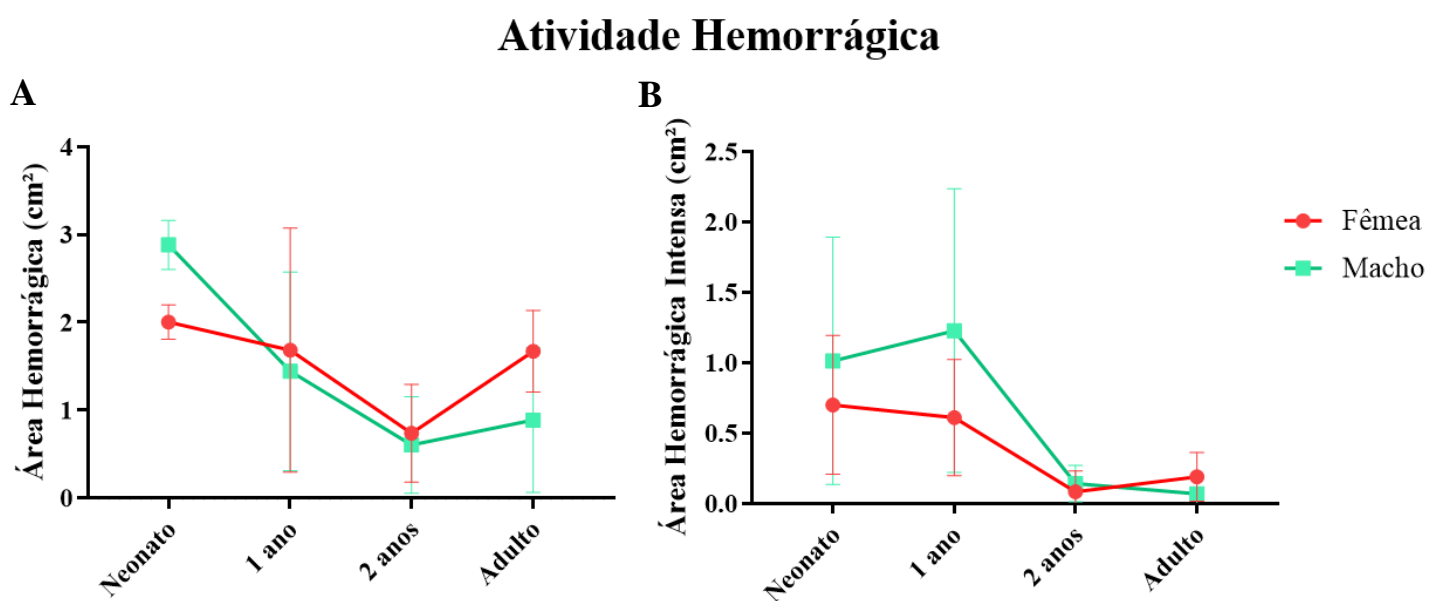
Figura 16. Atividade de trombina-símile, utilizando substrato S-2238, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos de idade; * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os sexos no mesmo grupo de idade.



4.3.9. Atividade Hemorrágica

Para analisar a atividade hemorrágica, foram comparadas a área total de hemorragia (Figura 17A) e área de hemorragia intensa (Figura 17B). Em ambos os casos, foi observada diferenças entre os grupos de idade, com o grupo de 2 anos apresentando uma área menor e os neonatos apresentando uma maior área de hemorragia. Não foram encontradas diferenças entre os sexos em nenhum dos grupos, apesar de uma aparente tendência de os neonatos machos apresentarem uma atividade um pouco maior.

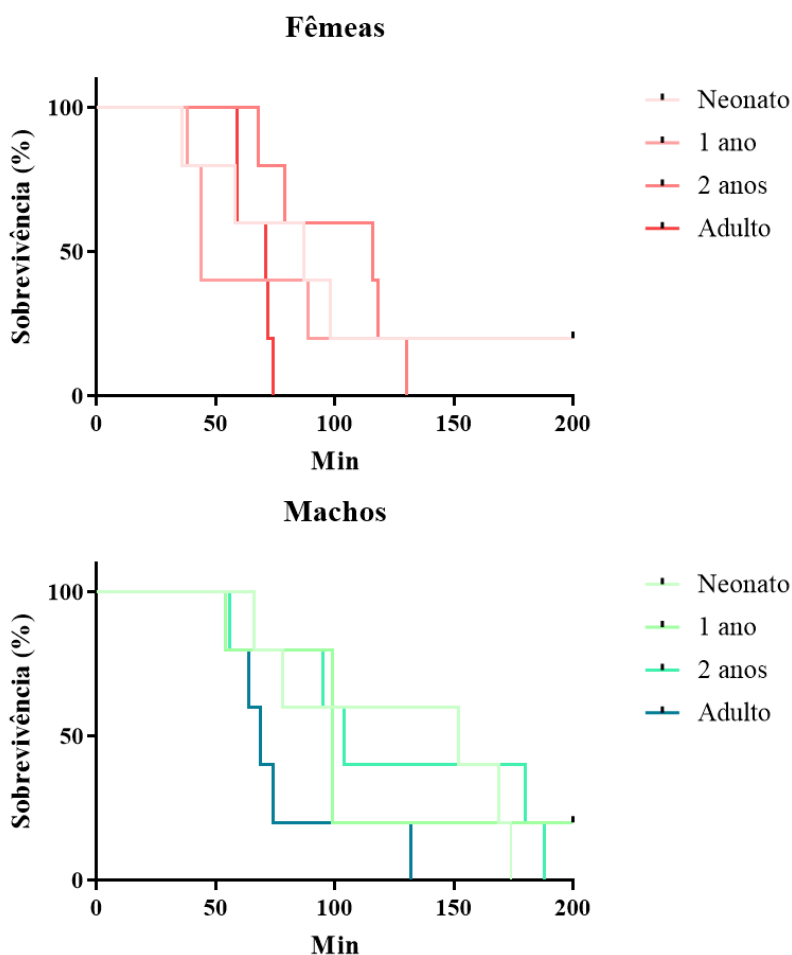
Figura 17. Atividade hemorrágica em camundongos injetados, via intradérmica, 3 μ g de veneno de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. O painel A apresenta dados da a área total de hemorragia e o painel B da área de hemorragia intensa.



4.3.10. Atividade Letal - Tempo de Ação Letal

O tempo de ação letal mostrou, em ambos os sexos, que o veneno dos adultos matou os animais mais rapidamente (Figura 18). Nas fêmeas, os dois grupos mais velhos chegaram a 0% de sobrevivência. Sendo que, o grupo dos adultos chegou antes dos 100 minutos e o grupo de 2 anos em 130 minutos. Houve um camundongo sobrevivente nos grupos dos neonatos e de 1 ano, e em ambos o último registro de morte foi antes dos 100 minutos. No caso dos machos, apenas o grupo de 1 ano teve um sobrevivente restante, com o último registro de morte aos 99 minutos. Para os grupos que alcançaram 0% de sobrevivência dos machos, os adultos apresentaram o menor tempo, com 132 minutos, enquanto os de 2 anos com 188 min e os neonatos com 174 min. O grupo das fêmeas apresentou ação letal mais rápida, porém tiveram 2 camundongos sobreviventes enquanto nos machos apenas um sobreviveu.

Figura 18. Tempo de ação letal em camundongos (n=5) injetados, via intraperitoneal, 100 μ g de veneno de *B. pauloensis* de diferentes idades, fêmeas (A) e machos (B).



5. Discussão

A variabilidade intraespecífica já foi reportada em diversas espécies de serpentes, sendo um importante fator a ser considerado ao se realizar pesquisas acerca do veneno de serpentes (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; GIRÓN et al., 2018; PLA et al., 2017b; YU; YU; LI, 2020). Estes estudos contribuem para um melhor entendimento do mecanismo de funcionamento dos venenos ofídicos e suas características clínicas em caso de envenenamento, além de servirem como base para o aprimoramento de soros antiofídicos (CASEWELL et al., 2020). Com isso, os ensaios realizados neste trabalho tiveram como objetivo analisar e comparar a composição proteica e as atividades do veneno de *B. pauloensis* de diferentes grupos de idades e sexo.

A concentração proteica não demonstrou uma correlação com a idade nem com o sexo dos animais, diferente do que foi encontrado por Furtado e colaboradores (1991) que compararam a dosagem de proteínas de uma mãe com sua ninhada e encontraram um valor maior para os recém-nascidos quando comparado ao veneno da mãe.

A composição proteica, analisada por SDS-PAGE, 2-DE, HPLC e MS apresentou variações evidentes entre os grupos de idade. Dentre as espécies do gênero *Bothrops*, diferenciações ontogenéticas na composição do veneno já foram encontradas em diversas espécies (BRAGA et al., 2020; DA SILVA AGUIAR et al., 2020; GUÉRCIO et al., 2006; HATAKEYAMA et al., 2021; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002; SALDARRIAGA et al., 2003; SANTORO et al., 2015; ZELANIS et al., 2009; ZELANIS; TRAVAGLIA-CARDOSO; FURTADO, 2008). A variação do perfil eletroforético apresentado pelas *B. pauloensis* de diferentes idades neste trabalho se assemelha ao encontrado para *B. moojeni* por Hatakeyama e colaboradores (2021), em que as serpentes mais jovens apresentaram um veneno com mais proteínas de alta massa molecular, e, conforme ficavam mais velhas, essas bandas diminuem e as de média e baixa massa molecular aumentam. Em relação à variação sexual, no presente trabalho foi observado uma maior quantidade de bandas de alta massa molecular nos machos adultos do que nas fêmeas, oposto do resultado encontrado por Aguiar e colaboradores (2020) para *B. jararacussu*, que encontrou uma maior quantidade de bandas de alta massa molecular nas fêmeas.

Apesar de diferenças bem visíveis no SDS-PAGE, com surgimento e desaparecimento de bandas nas diferentes faixas de idade, as diferenças encontradas no HPLC e no MS foram

principalmente de intensidade e de quantidade de proteínas. A diferença mais significativa no HPLC em relação à idade dos animais é o pico próximo aos 83 minutos que está presente nas duas idades mais jovens (Neonatos e 1 ano) e ausente nas demais. É possível observar que no SDS-PAGE que esses dois grupos apresentaram uma maior intensidade de bandas na região entre 50 e 75 kDa, na qual estariam localizadas as SVMPs que poderiam corresponder a esse pico. Esse pico também pode ser o responsável pela banda degradada próxima de 75 kDa na zimografia, apesar de ela aparecer somente no substrato de caseína e não no de colágeno como seria esperado de uma SVMP. Além da atividade proteolítica *in vitro*, as SVMPs estão envolvidas em diversos processos decorrentes do envenenamento, tais como: coagulopatia, mionecrose, formação de bolhas e edema, inibição de agregação plaquetária, degradação de componentes da matriz extracelular e hemorragia (FOX; SERRANO, 2005; GUTIÉRREZ et al., 2017b; TEIXEIRA et al., 2005). O aumento de intensidade do pico anterior aos 50 min conforme os animais ficam mais velhos é uma característica também observada no veneno das serpentes *B. moojeni* e *B. jararacussu* (DA SILVA AGUIAR et al., 2020; HATAKEYAMA et al., 2021). O único grupo que apresentou um pico exclusivo foi o das fêmeas adultas um pouco antes dos 50 min. Esse pico pode ser oriundo de um único indivíduo utilizado para formar o *pool*, não representando necessariamente uma característica das fêmeas adultas de *B. pauloensis*.

Pela maneira como a análise foi realizada não foram encontradas proteínas exclusivas em nenhum dos grupos pelo resultado de MS, apenas destacando uma variação de abundância entre eles. Essas variações de abundância corroboraram com o que já havia sido observado no SDS-PAGE: uma diminuição das SVMPs, que seriam proteínas de alta massa molecular, e aumento das proteínas de média e baixa massa molecular, como as SVSPs, PLA₂s e CLTs, nos animais mais velhos. Cada uma dessas famílias de proteínas atua de diversas formas no envenenamento. As SVSPs atuam principalmente na cascata de coagulação, edema e hipotensão (GUTIÉRREZ et al., 2017b; SERRANO; MAROUN, 2005; VILCA-QUISPE et al., 2010), enquanto as CTLs afetam a agregação plaquetária e os fatores de coagulação (ARLINGHAUS; EBLE, 2012; GUTIÉRREZ et al., 2017b). As PLA₂s desempenham uma maior variedade de efeitos, como a neurotoxicidade, miotoxicidade, nefrotoxicidade, inflamação, hemorragia, edema e ação anticoagulante (DE PAULA et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2017b; KINI, 2003; KINI; EVANS, 1989). Também há um aumento da concentração de LAAO, resultado já esperado devido ao fato que já havia sido notado uma intensificação da coloração amarela nos venenos e também o aumento gradual da

atividade de LAAO conforme os animais ficavam mais velhos. Os efeitos relacionados às LAAOs são creditados ao H₂O₂ produzido durante sua reação enzimática, que é responsável por ações como miotoxicidade, hemorragia, edema, citotoxicidade e hemólise (ANDE et al., 2006; CISCOTTO et al., 2009; DU; CLEMETSON, 2002; PIŠLAR et al., 2016; RODRIGUES et al., 2009). As CTLs também apresentaram um aumento de concentração nos grupos mais velhos (2 anos e adultos). Essa família de proteína apresentou uma abundância bem elevada nos venenos analisados, resultado divergente do encontrado no trabalho de Rodrigues e colaboradores (2012) que, apesar de ter encontrado transcritos de CTL no transcriptoma, não encontrou CTLs no proteoma do veneno de *B. pauloensis*. Dispondo de todos esses resultados de composição dos venenos, é notável que o veneno dos neonatos e de 1 ano são mais semelhantes e que os de 2 anos se assemelham mais aos adultos, indicando que a alteração na composição do veneno de jovem para adulto ocorre entre 1 e 2 anos.

Para verificar a imunointeração entre as proteínas presentes no veneno da *B. pauloensis* e o soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan foram realizados dois testes: o *western blotting* e o ELISA. Apesar de apenas 12,5% do *pool* de veneno utilizado para produção do soro antiofídico ser do complexo *neuwiedi*, no qual não há uma quantidade certa de veneno de *B. pauloensis* utilizado, aparentemente há um bom reconhecimento do soro antibotrópico aos venenos utilizados neste trabalho. Há um fraco reconhecimento pelo soro na região entre 15 e 37 kDa, que pode ocorrer devido a uma baixa imunogenicidade (em cavalos) das proteínas presentes nessa região (CALVETE et al., 2011). As diferenças de reconhecimento do soro de acordo com as idades e sexo dos animais só pôde ser notada nas duas idades mais avançadas (2 anos e adultos). O fato de o soro antibotrópico ter um reconhecimento mais fraco por veneno de *B. jararaca* jovens já foi observado por outros autores (ANTUNES et al., 2010; KAMIGUTI, 1988). O soro antibotrópico é produzido por hiperimunização em cavalos, utilizando um *pool* de venenos de diferentes espécies de serpentes de *Bothrops*, composto majoritariamente por veneno de serpentes adultas (ANTUNES et al., (2010), comunicação pessoal Kathleen Grego). Esse fato poderia explicar o motivo do soro antibotrópico ter um melhor reconhecimento do veneno de serpentes adultas e, conseqüentemente, uma possível ineficácia em neutralizar os efeitos de uma picada de uma serpente jovem.

A maioria das atividades testadas neste projeto apresentou alguma alteração durante a ontogenia dos animais, com exceção das atividades de hialuronidase, colagenolítica e de trombina-

símile. A atividade de LAAO, assim como a presença dessa enzima, mostrou fortes indícios de uma variação ontogenética no veneno de *B. pauloensis*, e, apesar da atividade aumentar primeiramente nas fêmeas (1 ano), a atividade se apresenta maior nos machos no grupo dos adultos. Uma maior atividade de LAAO no veneno dos adultos foi observada também na *B. moojeni* (HATAKEYAMA et al., 2021). A atividade de PLA₂ sugeriu uma tendência de os machos apresentarem uma maior atividade do que as fêmeas a partir dos 2 anos de idade, e que, durante a ontogenia, a atividade aumenta para os machos e diminui para as fêmeas. Esse resultado é corroborado pela MS, em que os machos apresentaram um aumento da abundância de PLA₂s em seu veneno no grupo dos adultos quando comparado aos neonatos, enquanto as fêmeas apresentaram uma diminuição. A família de PLA₂s do grupo dos Viperídeos é dividida em dois grupos: as cataliticamente ativas (D-49) e enzimaticamente inativas (K-49, S-49, R-49, Q-49 e N-49) (DOS SANTOS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2020; YAMAZAKI; HYODO; MORITA, 2003). Em um veneno pode haver diferentes proporções entre esses tipos de PLA₂s e diferenças em sua eficiência catalítica (atividade específica), podendo resultar em um veneno com baixa atividade enzimática mesmo que com grande concentração dessa proteína (LOMONTE et al., 2020; VITORINO et al., 2020). No caso dos venenos aqui estudados, a abundância de PLA₂ D49 é bem próxima entre machos e fêmeas nas idades mais novas, sendo aproximadamente 8% nos neonatos e 9% no grupo de 1 ano. Já nos mais velhos, a abundância nos machos cai para 7,5% no grupo de 2 anos e aumenta para 10,3% nos adultos, enquanto nas fêmeas essa abundância decai para próximo de 5% em ambas as idades (Apêndice 5). Tal resultado segue em concordância com a atividade de PLA₂ encontrada para esses venenos (Figura 9). Os resultados obtidos divergem do que foi encontrado por Antunes e colaboradores (2010), que apresentaram maior atividade nos jovens do que nos adultos de *B. jararaca* tanto para as atividades de PLA₂ e LAAO, e também no caso da hialuronidase.

A alteração de um veneno mais tóxico para um veneno mais proteolítico conforme a idade do animal avança já foi observada em outras serpentes por outros autores que sugeriram que essa alteração no veneno seria vinculada à alteração da dieta (ANDRADE; ABE, 1999; MACKESSY, 1988). Apesar da *B. pauloensis* apresentar essa mudança de alimentação, não foi observado um aumento na atividade proteolítica realizada em placa dos venenos dos adultos. De forma inesperada, o contrário foi observado para atividade caseinolítica, que apresentou maior atividade para as serpentes mais jovens. Os dois grupos que apresentaram as maiores atividades também

apresentam uma maior variedade de proteínas de alta massa molecular no SDS-PAGE e uma abundância de SVMPs acima de 50% de seu veneno. Na zimografia utilizando caseína como substrato há uma digestão mais forte na região dessas mesmas proteínas nesses grupos, o que indica que, provavelmente, elas são as responsáveis por elevar essa atividade. Em relação ao sexo, não é observado um padrão de atividade maior nos machos ou fêmeas, mas na idade adulta as fêmeas apresentam uma atividade caseinolítica mais elevada do que os machos. A serpente *B. jararacussu* também apresentou uma atividade caseinolítica mais elevada nos animais jovens em comparação aos adultos, e nas fêmeas em comparação aos machos na idade adulta (DA SILVA AGUIAR et al., 2020). A zimografia apresentou resultados divergentes dos enzimáticos. Tanto na zimografia com substrato de caseína como de gelatina (colágeno) foi observado uma maior quantidade de bandas digeridas no gel conforme os animais foram ficando mais velhos, além de uma intensificação da digestão de algumas bandas. No trabalho realizado por Furtado e colaboradores (1991) foi observado que a mãe apresentava atividade sobre a caseína maior do que os neonatos, mas o oposto foi observado na atividade sobre o colágeno.

Observações clínicas de envenenamento causadas por serpentes da espécie *B. jararaca* apontaram que animais adultos têm maior ação proteolítica do que coagulante (RIBEIRO; JORGE, 1990). Além dessas observações, já foi constatado uma maior atividade coagulante em jovens do que em adultos em diversas espécies de serpentes (ANTUNES et al., 2010; FURTADO et al., 1991; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002; PEREIRA, 2006), incluindo a *B. pauloensis*, indicando uma tendência de o veneno de serpentes mais jovens serem mais coagulantes do que de adultos. Nossos resultados corroboram com essa tendência, com o veneno dos neonatos com uma elevada atividade coagulante, que se perde conforme os animais ficam mais velhos. Os resultados obtidos nos sugerem que as fêmeas perdem a atividade coagulante mais cedo do que os machos, mas não há diferença significativa depois que ambos estão na fase adulta. Sendo assim, podemos sugerir que a atividade coagulante sofre uma variação ontogenética e que essa variação difere entre os sexos apenas na velocidade em que ocorre. Apesar da nítida influência da idade na atividade coagulante, o mesmo não se observa na atividade de trombina-símile, o que sugere que, provavelmente, a atividade está mais relacionada à ativação de outros fatores na cascata e não diretamente ao fibrinogênio. Furtado e colaboradores (1991) encontraram resultados similares, no qual para 9 diferentes espécies de *Bothrops* estudadas, todas

as mães apresentaram uma atividade coagulante menor que sua ninhada, mas esse resultado não foi refletido na coagulação do fibrinogênio.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que, no caso das *B. pauloensis*, o veneno dos neonatos é mais hemorrágico do que o veneno dos adultos. No veneno dos viperídeos a principal família de proteína responsável pela hemorragia, tanto local como sistêmica, é das SVMPs (ESCALANTE et al., 2011; SEO et al., 2017), que estão em maior abundância nos grupos dos neonatos e de 1 ano. Esses grupos mais novos apresentaram a maior área hemorrágica intensa e, com exceção das fêmeas adultas, maior área hemorrágica total. Sobretudo, é possível notar algumas SVMPs específicas que possuem evidente atividade hemorrágica (P15167; Q9PSN7; Q8AWX7; P0DM97; P0C6E3; Q92043; C5H5D4; Q0NZX8; B8K1W0) e que estão em maior concentração nos grupos de neonatos e 1 ano em comparação com os grupos de 2 anos e adultos (Apêndice 6). Esse resultado é divergente do encontrado para as serpentes *B. moojeni* (HATAKEYAMA et al., 2021) e *B. jararaca* (ANTUNES et al., 2010; ZELANIS et al., 2009), que apresentaram uma atividade hemorrágica mais elevada no veneno das serpentes adultas do que das jovens.

A variação ontogenética da dieta é conhecida em diferentes espécies de serpentes, incluindo a *B. pauloensis*, que pode ser devido à mudança de preferência alimentar ou simplesmente considerando características relevantes para a predação, como o tamanho da presa (DAVIES; ARBUCKLE, 2019; VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002). Diversos estudos encontraram mudanças ontogenéticas na composição ou toxicidade do veneno que parecem corresponder às mudanças na dieta das espécies em questão (ANDRADE; ABE, 1999; CIPRIANI et al., 2017; GIBBS et al., 2011; MACKESSY et al., 2006). Entretanto, não é possível excluir a explicação de coincidência dessas da alteração no veneno e da dieta pois existem estudos que encontram a mudança de um mas não em outro (MODAHL; MUKHERJEE; MACKESSY, 2016; SOLORZANO et al., 1999). Neste trabalho foi possível observar que o veneno dos adultos abateu os camundongos em menor tempo que os mais jovens em ambos os sexos, o que pode ser devido a preferência na dieta desses animais, já que os adultos se alimentam preferencialmente por animais endotérmicos e os jovens de ectotérmicos (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002). A serpente *B. moojeni* também apresenta essa mudança na dieta e, apesar de não haver diferença considerável na dose letal de jovens e adultos, também foi observado que os adultos abateram os camundongos mais rapidamente do que os jovens (HATAKEYAMA et al., 2021). O grupo das

fêmeas apresentou um tempo menor para abater os camundongos, e considerando juntamente o resultado da ontogenia, não é possível fazer uma correlação com nenhuma das atividades testadas neste trabalho com o tempo de morte. Os testes enzimáticos realizados avaliam a atividade de um grupo específico de enzimas, o que não corresponde ao efeito real do veneno em suas presas. Além dos efeitos individuais de cada proteína, também há o efeito sinérgico de todas juntas quando injetadas em um animal vivo (FERRAZ et al., 2019; XIONG; HUANG, 2018).

Vale destacar que todos os animais utilizados neste estudo são mantidos em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, sendo sua alimentação baseada somente em mamíferos. Os filhotes utilizados nasceram de animais mantidos nestas condições e, ainda assim, apresentaram diferenças composicionais e funcionais em seu veneno, indicando que essas alterações se devem a algo mais intrínseco ao desenvolvimento e evolução desses animais. Todas essas variações intraespecíficas do veneno de serpentes encontradas neste e em demais trabalhos ressaltam a importância desses estudos para uma melhor compreensão dos diferentes efeitos do envenenamento e melhor avaliação da eficácia do soro antivenenoso.

6. Conclusão

Com tais resultados apresentados, podemos concluir que há uma variação ontogenética do veneno da serpente *B. pauloensis*, além de possíveis diferenças entre o veneno dos machos e das fêmeas. Além de diferenças na composição dos *pools*, a maioria das atividades avaliadas neste trabalho apresentou alguma tendência de alteração durante o desenvolvimento dos animais. O resumo das diferenças encontradas nesse trabalho está presente na tabela 2. O soro antiofídico apresentou um imunorreconhecimento melhor com o veneno das serpentes adultas do que as mais jovens, além de uma deficiência no reconhecimento de proteínas de média massa molecular, sugerindo uma necessidade de um aperfeiçoamento do soro antiofídico para o tratamento de acidentes causados pela espécie *B. pauloensis*. Todos esses resultados obtidos indicam uma variação intraespecífica no veneno da serpente *B. pauloensis*, que pode resultar em diferentes sintomas em seu envenenamento e, conseqüentemente, diferenças na resposta ao tratamento com o soro antiofídico. Essa variação observada no veneno desta espécie de serpente, além de outras, destaca a importância de estudar a variabilidade intraespecífica dos venenos para fins ecológicos, evolutivos e médicos.

Tabela 2. Resumo das diferenças encontradas entre as atividades analisadas do veneno da serpente *B. pauloensis* em relação a idade e ao sexo. A – adultos; N – neonatos; F – fêmeas; M – machos.

	Idade	Sexo*
ELISA	A > N	F > M
Atividade de LAAO	A > N	M > F
Atividade de PLA ₂	M: A > N F: N > A	M > F
Atividade de hialuronidase	-	F > M
Atividade Caseinolítica	N > A	F > M
Atividade Colagenolítica	-	-
Atividade coagulante	N > A	-
Atividade trombina-símile	-	M > F
Atividade hemorragia	N > A	-
Tempo de ação letal	A > N	F > M

* Considerado apenas o grupo dos adultos.

Referências Bibliográficas

- ABREU, Thiago F. et al. Peptidomics of *Acanthoscurria gomesiana* spider venom reveals new toxins with potential antimicrobial activity. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 151, p. 232–242, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.07.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.012>.
- AMAZONAS, Diana R. et al. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 181, n. January, p. 60–72, 2018. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.03.032. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.032>.
- AMORIM, Fernanda Gobbi; COSTA, Tassia Rafaela; BAIWIR, Dominique; DE PAUW, Edwin; QUINTON, Loic; SAMPAIO, Suely Vilela. Proteopeptidomic, functional and immunoreactivity characterization of *Bothrops moojeni* snake venom: Influence of snake gender on venom composition. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1–18, 2018. DOI: 10.3390/toxins10050177.
- ANDE, Sudharsana Rao; KOMMOJU, Phaneeswara Rao; DRAXL, Sigrid; MURKOVIC, Michael; MACHEROUX, Peter; GHISLA, Sandro; FERRANDO-MAY, Elisa. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 1439–1451, 2006. DOI: 10.1007/s10495-006-7959-9.
- ANDRADE, Denis V; ABE, Augusto S. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 200–204, 1999. DOI: 10.2307/3893080. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/ib/zoologia/denis/reprints - pdf/venom ontogeny.pdf>.
- ANTUNES, Thatiane C.; YAMASHITA, Karine M.; BARBARO, Katia C.; SAIKI, Mitiko; SANTORO, Marcelo L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, [S. l.], v. 56, n. 8, p. 1443–1458, 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.08.011.
- ARLINGHAUS, Franziska T.; EBLE, Johannes A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 512–519, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.03.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.001>.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2 - a structural review. **Toxicon**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 827–841, 1996. DOI: 10.1126/science.281.5381.1322.
- BARLOW, Axel; POOK, Catharine E.; HARRISON, Robert A.; WÜSTER, Wolfgang. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 276, n. 1666, p. 2443–2449, 2009. DOI: 10.1098/rspb.2009.0048.

- BERMÚDEZ-MÉNDEZ, Erick; FUGLSANG-MADSEN, Albert; FØNS, Sofie; LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José María; LAUSTSEN, Andreas Hougaard. Innovative immunization strategies for antivenom development. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1–37, 2018. DOI: 10.3390/toxins10110452.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Répteis brasileiros: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 75–93, 2015. Disponível em: http://www.sbherpetologia.org.br/lista_repteis/ListaRepteis30Setembro2012-PORTUGUES.pdf.
- BJARNASON, Jón B.; FOX, Jay W. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. **Methods in Enzymology**, [S. l.], 1995. DOI: 10.1016/0076-6879(95)48023-4.
- BON, C. Serum therapy was discovered 100 years ago. **Toxicon**, [S. l.], v. 2.34, n. 34, p. 42–143, 1996.
- BRADFORD, M. M. **BradfordAnal. Biochem**, 1976.
- BRAGA, Jacqueline Ramos Machado; DE MORAIS-ZANI, Karen; PEREIRA, Diego dos Santos; SANT'ANNA, Sávio Stefanini; DA COSTA GALIZIO, Nathália; TANAKA-AZEVEDO, Anita Mitico; GOMES VILARINHO, Ariel Rodrigues; RODRIGUES, José Lucca; TEIXEIRA DA ROCHA, Marisa Maria. Sexual and ontogenetic variation of *Bothrops leucurus* venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 184, n. April, p. 127–135, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.05.028.
- CALVETE, Juan J. et al. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 74, n. 4, p. 510–527, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003>.
- CALVETE, Juan J. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. **Biochemical Journal**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1042/BCJ20160577.
- CALVETE, Juan J.; JUÁREZ, Paula; SANZ, Libia. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, [S. l.], 2007. DOI: 10.1002/jms.1242.
- CÂMARA, Guilherme A.; NISHIYAMA-JR, Milton Y.; KITANO, Eduardo S.; OLIVEIRA, Ursula C.; SILVA, Pedro I. d.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, Inácio L.; TASHIMA, Alexandre K. A Multiomics Approach Unravels New Toxins With Possible In Silico Antimicrobial, Antiviral, and Antitumoral Activities in the Venom of *Acanthoscurria rondoniae*. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, n. July, p. 1–14, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.01075.

- CASEWELL, Nicholas R.; JACKSON, Timothy N. W.; LAUSTSEN, Andreas H.; SUNAGAR, Kartik. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 570–581, 2020. DOI: 10.1016/j.tips.2020.05.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>.
- CHIACCHIO, S. B.; MARTINS, G. T. B.; AMORIM, R. M.; GONÇALVES, R. C.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JÚNIOR, R. S. Triple bothropic envenomation in horses caused by a single snake. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 17.1, p. 111–117, 2011.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake Venom Variability : Methods of Study , Results and Interpretation. **Toxicon**, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 1279–1303, 1991.
- CIPRIANI, Vittoria et al. Correlation between ontogenetic dietary shifts and venom variation in Australian brown snakes (Pseudonaja). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 197, n. February, p. 53–60, 2017. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.04.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.04.007>.
- CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 330–341, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.12.004.
- CUNHA, Luis Eduardo Ribeiro. Soros Antiofídicos: História, Evolução E Futuro. **Journal Health Npeps**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1–4, 2017.
- DA SILVA AGUIAR, Wesley; DA COSTA GALIZIO, Nathália; SANT’ANNA, Sávio Stefanini; SILVEIRA, Giovanni Perez M.; DE SOUZA RODRIGUES, Fabíola; GREGO, Kathleen Fernandes; DE MORAIS-ZANI, Karen; TANAKA-AZEVEDO, Anita Mitico. Ontogenetic study of Bothrops jararacussu venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, [S. l.], v. 186, n. May, p. 67–77, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.07.030.
- DALTRY, Jennifer C.; WÜSTER, Wolfgang; THORPE, Roger S. Diet and snake venom variation. **Nature**, [S. l.], v. 379, p. 537–540, 1996.
- DAVIES, Emma-Louise; ARBUCKLE, Kevin. Coevolution of Snake Venom Toxic Activities and Diet: Evidence that Ecological Generalism Favours Toxicological Diversity. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 711, 2019.
- DE PAULA, R. C.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, P. A.; FULY, André L. Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. **Protein and**

- Peptide Letters**, [*S. l.*], v. 16, n. 8, p. 899–907, 2009. DOI: 10.2174/092986609788923365.
- DE ROODT, Adolfo; FERNÁNDEZ, Julián; SOLANO, Daniela; LOMONTE, Bruno. A myotoxic Lys49 phospholipase A2-homologue is the major component of the venom of *Bothrops cotiara* from Misiones, Argentina. **Toxicon**, [*S. l.*], v. 148, p. 143–148, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.04.026.
- DEL-REI, Tiago H. M.; SOUSA, Leijiane F.; ROCHA, Marisa M. T.; FREITAS-DE-SOUSA, Luciana A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, Silvia R.; GREGO, Kathleen; SANT’ANNA, Sávio S.; CHALKIDIS, Hipócrates M.; MOURA-DA-SILVA, Ana M. Functional variability of *Bothrops atrox* venoms from three distinct areas across the Brazilian Amazon and consequences for human envenomings. **Toxicon**, [*S. l.*], v. 164, n. April, p. 61–70, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.04.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.04.001>.
- DENNIS, E. A.; RHEE, Sue Goo; BILLAH, M. Motasim; HANNUN, Yusuf. A. Role of phospholipases signal in transduction. **The FASEB Journal**, [*S. l.*], p. 2068–2077, 1991.
- DENNIS, Edward A.; CAO, Jian; HSU, Yuan-hao; MAGRIOTI, Victoria; KOKOTOS, George. Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical reviews**, [*S. l.*], v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 2011.
- DISTLER, Ute; KUHAREV, Jörg; NAVARRO, Pedro; LEVIN, Yishai; SCHILD, Hansjörg; TENZER, Stefan. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. **Nature Methods**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, p. 167–170, 2014. DOI: 10.1038/nmeth.2767.
- DO AMARAL, Afranio. A general consideration of snake poisoning and observations on neotropical pitvipers. **Harvard university press**, [*S. l.*], v. 2, 1925.
- DOS SANTOS, Juliana I.; CINTRA-FRANCISCHINELLI, Mariana; BORGES, Rafael J.; FERNANDES, Carlos A. H.; PIZZO, Paola; CINTRA, Adélia C. O.; BRAZ, Antonio S. K.; SOARES, Andreimar M.; FONTES, Marcos R. M. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A 2 class. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, [*S. l.*], v. 79, n. 1, p. 61–78, 2011. DOI: 10.1002/prot.22858.
- DU, Xiao Yan; CLEMETSON, Kenneth J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, [*S. l.*], v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002. DOI: 10.1016/S0041-0101(02)00102-2.
- ESCALANTE, Teresa; RUCAVADO, Alexandra; FOX, Jay W.; GUTIÉRREZ, José María. Key

- events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 74, n. 9, p. 1781–1794, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.03.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.026>.
- FERRAZ, Camila R.; ARRAHMAN, Arif; XIE, Chunfang; CASEWELL, Nicholas R.; LEWIS, Richard J.; KOOL, Jeroen; CARDOSO, Fernanda C. Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: From pain to hemorrhage and necrosis. **Frontiers in Ecology and Evolution**, [S. l.], v. 7, n. JUN, p. 1–19, 2019. DOI: 10.3389/fevo.2019.00218.
- FOX, Jay W.; SERRANO, Solange M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, [S. l.], v. 45, p. 969–985, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.012.
- FRANÇA, F. O. .; MALAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: SARVIER (org.). **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo. p. 72–86.
- FRY, B. G.; WÜSTER, W. Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 21, p. 870–883, 2004. DOI: 10.1093/molbev/msh091.
- FRY, Bryan G. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome Res**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 403–20, 2005. DOI: 10.1101/gr.3228405. Disponível em: www.genome.org.
- FURTADO, M. F. D.; COLLETO, G. M. D. .; SILVA, W. D. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. **Mem. Inst. Butantan**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 149–159, 1991.
- FURTADO, Ma F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 219–226, 1991. DOI: 10.1016/0041-0101(91)90106-2.
- GIBBS, H. Lisle; SANZ, Libia; CHIUCCHI, James E.; FARRELL, Terence M.; CALVETE, Juan J. Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). **Journal of Proteomics**, [S. l.], 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.06.013.
- GIRÓN, María E.; PADRÓN, Vanessa; RAMOS, María I.; SÁNCHEZ, Elda E.; GUERRERO, Belsy; GARCÍA, Alberto; UZCÁTEGUI, Néstor L.; NAVARRETE, Luis F.; RODRÍGUEZ-

- ACOSTA, Alexis. Intraspecies geographical variability in the South American tigua mariposa (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom activities. **Toxicon**, [S. l.], v. 144, p. 23–33, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.01.020.
- GREGO, Kathleen Fernandes et al. Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present : a scoping history. [S. l.], n. December 2020, p. 1–11, 2021.
- GUBENŠEK, F.; SKET, D.; TURK, V.; LEBEZ, D. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. **Toxicon**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 167–168, 1974. DOI: 10.1016/0041-0101(74)90241-4.
- GUÉRCIO, Rafael A. P.; SHEVCHENKO, Anna; SHEVCHENKO, Andrej; LÓPEZ-LOZANO, Jorge L.; PABA, Jaime; SOUSA, Marcelo V.; RICART, Carlos A. O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1186/1477-5956-4-11.
- GUTIÉRREZ, J. M.; DOS SANTOS, M. C.; DE FATIMA FURTADO, M.; ROJAS, G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. **Toxicon**, [S. l.], v. 29, n. 10, p. 1273–1277, 1991. DOI: 10.1016/0041-0101(91)90201-2.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONT, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. **Mem Inst Butantan**, [S. l.], v. 33, p. 1405–74, 1995.
- GUTIÉRREZ, José María et al. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. **Toxins**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 1–22, 2017. a. DOI: 10.3390/toxins9050163.
- GUTIÉRREZ, José María; CALVETE, Juan J.; HABIB, Abdulrazaq G.; HARRISON, Robert A.; WILLIAMS, David J.; WARRELL, David A. Snakebite envenoming. **Nature reviews. Disease primers**, [S. l.], v. 3, p. 17063, 2017. b. DOI: 10.1038/nrdp.2017.63.
- GUTIÉRREZ, José María; LOMONTE, Bruno. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 211–223, 1989.
- GUTIÉRREZ, José María; AVILA, Claudio; CAMACHO, Zianne; LOMONTE, Bruno. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. **Toxicon**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 419–426, 1990. DOI: 10.1016/0041-0101(90)90080-Q.

- HARLOW, Edward. Immunoblotting. *In: Antibodies, a Laboratory Manual*. [s.l.: s.n.]. p. 471–510.
- HATAKEYAMA, Daniela Miki et al. From birth to adulthood : An analysis of the Brazilian lancehead (*Bothrops moojeni*) venom at different life stages. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 1–24, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0253050.
- HEUSSEN, Christa; DOWDLE, Eugene B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], 1980. DOI: 10.1016/0003-2697(80)90338-3.
- HITE, L. ...; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA Sequences for Four Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Classification, and Their Relationship to Mammalian Reproductive Proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 308, n. 1, p. 182–191, 1994.
- HOLZER, Matthew; MACKESSY, Stephen P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, [S. l.], v. 34, n. 10, p. 1149–1155, 1996. DOI: 10.1016/0041-0101(96)00057-8.
- IZIDORO, Luiz Fernando M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/196754.
- JUÁREZ, Paula; SANZ, Libia; CALVETE, Juan J. Snake venomomics: Characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, [S. l.], v. 4.2, 2004. DOI: 10.1002/pmic.200300628.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, Inácio De L. M.; HO, Paulo L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, [S. l.], v. 299, n. 1–2, p. 279–291, 2002. DOI: 10.1016/S0378-1119(02)01080-6.
- KAMIGUTI, A. S. **Atividade coagulante, inflamatória e proteolítica dos venenos de *Bothrops jararaca* recém-nascida e adulta**. 1988. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, [S. l.], 1988.
- KINI, R. Manjunatha. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2enzymes. **Toxicon**, [S. l.], v. 42, n. 8, p. 827–840, 2003. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.11.002.

- KINI, R. Manjunatha; EVANS, Herbert J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 613–635, 1989. DOI: 10.1016/0041-0101(89)90013-5.
- KINI, R. Manjunatha; EVANS, Herbert J. Structural domains in venom proteins: Evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 265–293, 1992. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90869-7.
- KISHIMOTO, Masaaki; TAKAHASHI, Tomoko. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 298, n. 1, p. 136–139, 2001. DOI: 10.1006/abio.2001.5381.
- KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 63, n. 24, p. 3030–3041, 2006. DOI: 10.1007/s00018-006-6315-0.
- KUDO, Ichiro; MURAKAMI, Makoto. **Phospholipase A2enzymes**. [s.l: s.n.]. v. 68–69 DOI: 10.1016/S0090-6980(02)00020-5.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- LALLOO, David G.; THEAKSTON, R. David G. Snake antivenoms. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 277–290, 2003. DOI: 10.1081/CLT-120021113.
- LEE, Mui Li; TAN, Nget Hong; FUNG, Shin Yee; SEKARAN, Shamala Devi. Antibacterial action of a heat-stable form of l-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 153, n. 2, p. 237–242, 2011. DOI: 10.1016/j.cbpc.2010.11.001. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.11.001>.
- LOMONTE, Bruno; DÍAZ, Cecilia; CHAVES, Fernando; FERNÁNDEZ, Julián; RUIZ, Marco; SALAS, María; ZAVALA, Alfonso; CALVETE, Juan J.; SASA, Mahmood. Comparative characterization of Viperidae snake venoms from Perú reveals two compositional patterns of phospholipase A2 expression. **Toxicon: X**, [S. l.], v. 7, 2020. DOI: 10.1016/j.toxcx.2020.100044.
- LOMONTE, Bruno; GENÉ, José A.; GUTIÉRREZ, José Maria; CERDAS, Luis. Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares

adultos y recién nacidos. **Toxicon**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 379–84, 1983.

LÓPEZ-LOZANO, Jorge Luis; VALLE, Marcelo; SOUSA, De; ANDRE, Carlos; CHA, Carlos; BU, Paulo F. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, [S. l.], v. 40, p. 997–1006, 2002.

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

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

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

MARTINS, Marcio; MARQUES, Otavio A. V.; SAZIMA, Ivan. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. **Biology of the Vipers**, [S. l.], v. 307, p. 328, 2002.

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

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

OLIVEIRA, Clayton Z.; MENALDO, Danilo L.; MARCUSSI, Silvana; SANTOS-FILHO, Norival A.; SILVEIRA, Lucas B.; BOLDRINI-FRANÇA, Johara; RODRIGUES, Veridiana M.; SOARES, Andreimar M. An alfa-type phospholipase A2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. **Biochimie**, [S. l.], v. 90, n. 10, p. 1506–1514, 2008. DOI: 10.1016/j.biochi.2008.05.009.

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

PEREIRA, André Zelanis Palitot. **Análise da variabilidade ontogenética do veneno de**

Bothrops insularis (Amaral, 1921): implicações adaptativas aos itens alimentares. 2006.

Instituto de Biocências, [S. l.], 2006.

PIŠLAR, A.; SABOTIČ, J.; ŠLENC, J.; BRZIN, J.; KOS, J. Cytotoxic L-amino-acid oxidases from *Amanita phalloides* and *Clitocybe geotropa* induce caspase-dependent apoptosis. **Cell Death Discovery**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1–11, 2016. DOI: 10.1038/cddiscovery.2016.21.

PLA, Davinia et al. Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). **Journal of Proteomics**, [S. l.], 2017. a. DOI:

10.1016/j.jprot.2016.10.006.

PLA, Davinia; SANZ, Libia; WHITELEY, Gareth; WAGSTAFF, Simon C.; HARRISON, Robert A.; CASEWELL, Nicholas R.; CALVETE, Juan J. What killed Karl Patterson Schmidt? Combined venom gland transcriptomic, venomomic and antivenomic analysis of the South African green tree snake (the boomslang), *Dispholidus typus*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1861, n. 4, p. 814–823, 2017. b. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.01.020.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.01.020>.

PUKRITTAYAKAMEE, Sasithon; WARRELL, David A.; DESAKORN, Varunee; MCMICHAEL, Andrew J.; WHITE, Nicholas J.; BUNNAG, Danai. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. **Toxicon**, [S. l.], 1988. DOI: 10.1016/0041-0101(88)90245-0.

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

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

RIBEIRO, Lindioneza Adriano; JORGE, Miguel Tanús. **Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 1990. DOI: 10.1590/s0036-46651990000600008.

RICHARDS, D. P.; BARLOW, A.; WÜSTER, W. Venom lethality and diet: Differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (*Echis*). **Toxicon**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.10.015.

RODRIGUES, Carolina Rego et al. Proteomic and toxinological characterization of Peruvian pitviper *Bothrops brazili* (“jergón shushupe”), venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 184, n. May, p. 19–27, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.05.016.

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

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

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

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America., in *Venomous Animals and their venoms*. In: **Venomous animals and their venoms 2**. [s.l: s.n.]. p. 345–384.

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

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

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

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

SERRANO, Solange M. T.; SHANNON, John D.; WANG, Deyu; CAMARGO, Antonio C. M.;

- FOX, Jay W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, [S. l.], 2005. DOI: 10.1002/pmic.200400931.
- SILVA, Vinícius Xavier Da; RODRIGUES, Miguel Trefaut. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpents, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, [S. l.], v. 7.1, p. 45–90, 2008.
- SINAN. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. 2021. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>. Acesso em: 23 mar. 2021.
- SOLORZANO, Alejandro; ROMERO, Marjorie; GUTIERREZ, José Maria; SASA, Mahmood. Venom Composition and Diet of the Cantil *Agkistrodon bilineatus howardgloydi* (Serpentes: Viperidae). **The Southwestern Naturalist**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 478–483, 1999. DOI: <https://doi.org/10.2307/3672346>. Disponível em: http://www.jstor.org/stable/3650?seq=8#page_scan_tab_contents%5Cnhttp://www.jstor.org/stable/3650?origin=crossref.
- SOUZA, Dulce H. F.; EUGENIO, Luiz M.; FLETCHER, Jeffrey E.; JIANG, Ming Shi; GARRATT, Richard C.; OLIVA, Glaucius; SELISTRE-DE-ARAUJO, Heloisa S. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: Preliminary crystallographic data. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], 1999. DOI: 10.1006/abbi.1999.1287.
- STÁBELI, Rodrigo G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 132–140, 2007. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006.
- SUHR, Sung-min; KIM, Doo-sik. Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis that plays a major role during development (1-3), as a major mechanism for the precise regulation of cell numbers (4), and as a defense mechanism to remove unwanted and potentially i. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 139, n. 224, p. 134–139, 1996.
- SUN, Ming Zhong; GUO, Chunmei; TIAN, Yuxiang; CHEN, Duo; GREENAWAY, Frederick T.; LIU, Shuqing. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: A novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 343–349, 2010. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.01.013. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.013>.

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

TAN, Kok Keong; BAY, Boon Huat; GOPALAKRISHNAKONE, Ponnampalam. L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. **Toxicon**, [S. l.], v. 144, p. 7–13, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.01.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.01.015>.

TAN, Nget-hong; FUNG, Shin-ye. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases and Their Potential Biomedical Applications. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–10, 2008. Disponível em: <http://ejum.fsktm.um.edu.my/article/597.pdf>.

TEIXEIRA, Catarina De Fátima Pereira; FERNANDES, Cristina Maria; ZULIANI, Juliana Pavan; ZAMUNER, Silvia Fernanda. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 100, p. 181–184, 2005. DOI: 10.1590/S0074-02762005000900031.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization**, [S. l.], v. 61, n. 6, p. 949–956, 1983. DOI: 10.1029/2003JD004079.

UETZ, P.; FREED, P.; HOŠEK, Jirí. **The Reptile Database**. [s.d.]. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/>. Acesso em: 14 out. 2018.

VÁCHOVÁ, L.; MORAVCOVÁ, J. Two microassays for determination of a wide range of proteolytic activities using Azocoll as substrate. **Biochemistry and molecular biology international**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 311–318, 1993.

VALDUJO, Paula H.; NOGUEIRA, Cristiano; MARTINS, Marcio. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian. **Source: Journal of Herpetology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 169–176, 2002.

VILCA-QUISPE, Augusto; PONCE-SOTO, Luis Alberto; WINCK, Flavia Vischi; MARANGONI, Sergio. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.11.006.

- VITORINO, Keila A. et al. Antimalarial activity of basic phospholipases A2 isolated from Paraguayan Bothrops diporus venom against Plasmodium falciparum. **Toxicon**, [S. l.], v. 8, 2020. DOI: 10.1016/j.toxcx.2020.100056.
- WILLIAMS, V.; WHITE, J. Variation in the composition of the venom from a single specimen of Pseudonaja textilis (common brown snake) over one year. **Toxicon**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 202–206, 1992. DOI: 10.1016/0041-0101(92)90473-I.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. **WHO**, [S. l.], p. 1–134, 2010.
- WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Snakebite envenoming**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/snakebites/epidemiology/en/>. Acesso em: 23 mar. 2021.
- XIONG, Shengwei; HUANG, Chunhong. Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 287, n. February, p. 142–154, 2018. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.02.004.
- YAMAZAKI, Yasuo; HYODO, Fumiko; MORITA, Takashi. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: Isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 412, n. 1, p. 133–141, 2003. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00028-6.
- YU, Chunlin; YU, Huahua; LI, Pengcheng. Highlights of animal venom research on the geographical variations of toxin components, toxicities and envenomation therapy. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 165, n. 7, p. 2994–3006, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.190. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.190>.
- ZELANIS, André; TASHIMA, Alexandre K.; ROCHA, Marisa M. T.; FURTADO, Maria F.; CAMARGO, Antonio C. M.; HO, Paulo L.; SERRANO, Solange M. T. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of Bothrops jararaca reveals different strategies to deal with prey. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 2278–2291, 2009. DOI: 10.1021/pr901027r.
- ZELANIS, André; TRAVAGLIA-CARDOSO, Silvia Regina; FURTADO, Maria de Fátima Domingues. Ontogenetic changes in the venom of Bothrops insularis (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. **South American Journal of Herpetology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 43–50, 2008. DOI: 10.2994/1808-9798(2008)3[43:ocitvo]2.0.co;2.

Apêndice

Apêndice 1. Dados adicionais em relação as serpentes *B. pauloensis* utilizadas para formação de cada *pool*.

Amostra	Ninhada	ID	Procedência	Peso (g)	Tamanho (cm)	
N ♂	1901	1901-05	Mãe - Protânia SP Pai - São Pedro SP	7,1	24-27	
		1904-01		9,4	24-27,5	
		1904-02		8,9	23,3-27	
		1904-03		2,5	14,2-15,9	
	1904	1904-04		9,9	24,5-28,1	
		1904-06	Mãe - Araraquara SP	8,8	24-28	
		1904-08		11,4	25,5-29,5	
		1904-10		10,1	24-27	
		1904-11		9,3	24-27	
		1904-14		9,4	25-29	
	1902	1902-10	Mãe - Araraquara SP	7,8	22,5-25,5	
		1902-02	Pai - Araraquara SP	8,4	22,5-25,5	
	N ♀	1901	1901-01		8	24,5-27
			1901-02		7,1	23,5-27
1901-03				6,6	23-26	
1901-04			Mãe - Protânia SP Pai - São Pedro SP	8,5	23-27	
1901-06				8,1	24-27,5	
1901-07				9,3	24-27,5	
1901-08			9	24,5-27		
1904		1904-05		10	24,5-27,5	
		1904-07		9,5	24,5-28	
		1904-09	Mãe - Araraquara SP	8,9	24-27,5	
	1904-12		10,8	25-28,3		
	1904-13		9,6	23,2-26,5		
1904-15		8,6	23-25,5			

		1902-09		7	21-23,5	
	1902	1902-08	Mãe (1602) Araraquara SP	7,7	22-24,5	
		1902-05	Pai (1201) Araraquara SP	8,7	23-26	
		1902-04		4,4	19-22	
1 ano ♂		1801-02		12,9	26,5-30,5	
		1801-04		13,4	28-32	
		1801-03	Mãe - São Simão Pai- São Pedro	15,3	31-35	
		1801-05		14,9	29,5-33,5	
		1801-07		12,6	30-34,5	
		1802-02		13,8	28-31,5	
		1802-05	Mãe - Araraquara Pai - Analândia	11,9	26-29,5	
		1802-07		15,5	31,5-36	
		1801	1801-06	Mãe - São Simão Pai- São Pedro	10	26,5-30
			1801-08		8	24-27,5
1 ano ♀		1802-01	Mãe - Araraquara Pai - Analândia	16,6	28-31	
		1802-06		15,8	29-32,5	
2 anos ♂		1701	1701-03	Mãe - São Simão	47,5	47-53,5
			1702-03		28,2	41-46,5
			1702-04		40	42-48
		1702	1702-05	Mãe - São Simão	57	53-61
			1702-08		33	42-48,5
			1702-09		49,7	49-56,5
		1703	1703-04	Mãe - São Simão	45,6	47-54
			1701-04		64,4	53,5-58
		1701	1701-05	Mãe - São Simão	92,4	61-68
			1701-07		42,3	47-51,5
2 anos ♀		1702-01		52,5	49-54,5	
		1702-02		74,6	58,5-63	
		1702-06	Mãe - São Simão	69,7	53-59	
		1702-07		62,8	48-51,5	
		1703	1703-02	Mãe - São Simão	96,9	57-64,5

A ♂	-	0704	Analândia - SP	175	70-79
		1002-01	São Pedro - SP	130	69-79
		1201-02	São Simão - SP	180	77-86
		1501	Araraquara - SP	135	70-81
		1201-01	São Simão - SP	110	72-81
A ♀	-	1201-06	São Simão - SP	310	88-96
		1101-02	São Simão - SP	360	94-104
		1101-06	São Simão - SP	410	89-99
		0901	São Pedro - SP	920	121,5-134,5
		1201-05	São Simão - SP	510	101-109

Apêndice 2. Dados estatísticos de atividades enzimáticas e biológicas realizadas comparando apenas a ontogenia. Foram realizados o teste ANOVA de duas vias para comparação entre as idades. NS - Sem diferença estatística; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$.

	<i>Neonato</i>	<i>1 ano</i>	<i>2 anos</i>	<i>Adulto</i>
Bradford				
<i>Neonato</i>	-	NS	NS	NS
<i>1 ano</i>	NS	-	NS	NS
<i>2 anos</i>	NS	NS	-	NS
<i>Adulto</i>	NS	NS	NS	-
ELISA				
<i>Neonato</i>	-	NS	NS	**
<i>1 ano</i>	NS	-	NS	****
<i>2 anos</i>	NS	NS	-	**
<i>Adulto</i>	**	****	**	-

Atividade de LAAO				
<i>Neonato</i>	-	***	****	****
<i>1 ano</i>	***	-	****	****
<i>2 anos</i>	****	****	-	****
<i>Adulto</i>	****	****	****	-
Atividade de PLA₂				
<i>Neonato</i>	-	NS	***	NS
<i>1 ano</i>	NS	-	****	NS
<i>2 anos</i>	***	****	-	****
<i>Adulto</i>	NS	NS	****	-
Atividade de hialuronidase				
<i>Neonato</i>	-	****	NS	NS
<i>1 ano</i>	****	-	****	****
<i>2 anos</i>	NS	****	-	NS
<i>Adulto</i>	NS	****	NS	-
Atividade caseinolítica				
<i>Neonato</i>	-	NS	****	****
<i>1 ano</i>	NS	-	****	****
<i>2 anos</i>	****	****	-	**
<i>Adulto</i>	****	****	**	-
Atividade collagenolítica				
<i>Neonato</i>	-	NS	NS	NS
<i>1 ano</i>	NS	-	*	NS
<i>2 anos</i>	NS	*	-	NS
<i>Adulto</i>	NS	NS	NS	-

DMC				
<i>Neonato</i>	-	**	****	****
<i>1 ano</i>	**	-	****	****
<i>2 anos</i>	****	****	-	***
<i>Adulto</i>	****	****	***	-

Atividade de trombina-símile				
<i>Neonato</i>	-	****	****	****
<i>1 ano</i>	****	-	****	****
<i>2 anos</i>	****	****	-	NS
<i>Adulto</i>	****	****	NS	-

Apêndice 3. Dados estatísticos de atividades enzimáticas e biológicas realizadas comprando os sexos. Foram realizados o teste ANOVA de duas vias para comparação entre os sexos. NS - Sem diferença estatística; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$.

Fêmea x Macho		
Bradford	<i>Neonato</i>	NS
	<i>1 ano</i>	NS
	<i>2 anos</i>	NS
	<i>Adulto</i>	NS
ELISA	<i>Neonato</i>	NS
	<i>1 ano</i>	NS
	<i>2 anos</i>	NS
	<i>Adulto</i>	*

	<i>Neonato</i>	NS
Atividade de LAAO	<i>1 ano</i>	****
	<i>2 anos</i>	NS
	<i>Adulto</i>	****
<hr/>		
	<i>Neonato</i>	NS
Atividade de PLA₂	<i>1 ano</i>	NS
	<i>2 anos</i>	**
	<i>Adulto</i>	****
<hr/>		
	<i>Neonato</i>	NS
Atividade de hialuronidase	<i>1 ano</i>	****
	<i>2 anos</i>	NS
	<i>Adulto</i>	***
<hr/>		
	<i>Neonato</i>	**
Atividade caseinolítica	<i>1 ano</i>	****
	<i>2 anos</i>	****
	<i>Adulto</i>	***
<hr/>		
	<i>Neonato</i>	NS
Atividade colagenolítica	<i>1 ano</i>	NS
	<i>2 anos</i>	NS
	<i>Adulto</i>	NS
<hr/>		
	<i>Neonato</i>	NS
DMC	<i>1 ano</i>	*
	<i>2 anos</i>	**
<hr/>		

	<i>Adulto</i>	NS
	<i>Neonato</i>	NS
Atividade de trombina-símile	<i>1 ano</i>	NS
	<i>2 anos</i>	***
	<i>Adulto</i>	****

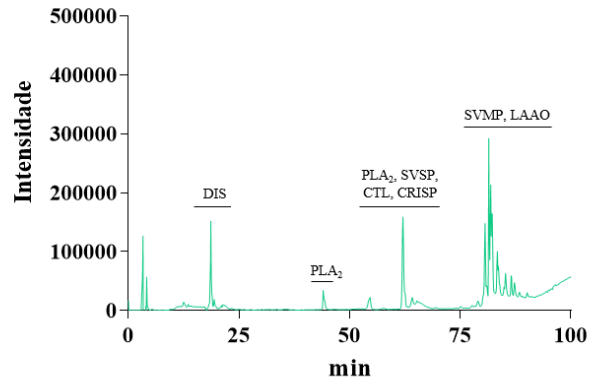
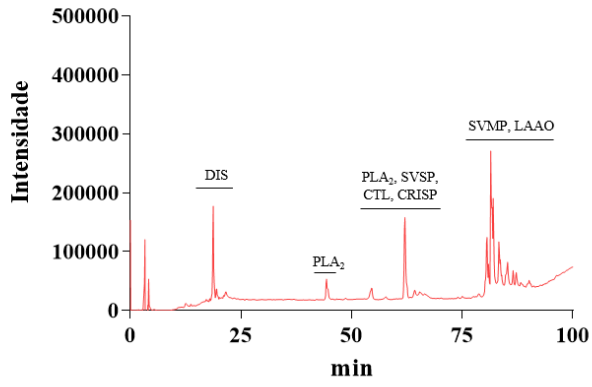
Apêndice 4. Perfil cromatográfico, obtidos por RP-HPLC, dos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. DIS – disintegrinas; SVMP - metaloproteases; SVSP - serino proteases; CTL - lectina tipo C; PLA₂ - fosfolipase A₂; LAAO - L-amino ácido oxidase; CRISP - proteína secretada rica em cisteína. A identificação das proteínas presentes em cada região do cromatograma foi baseada nos resultados obtidos pelo trabalho de Rodrigues e colaboradores (2012).

Fêmeas

Machos

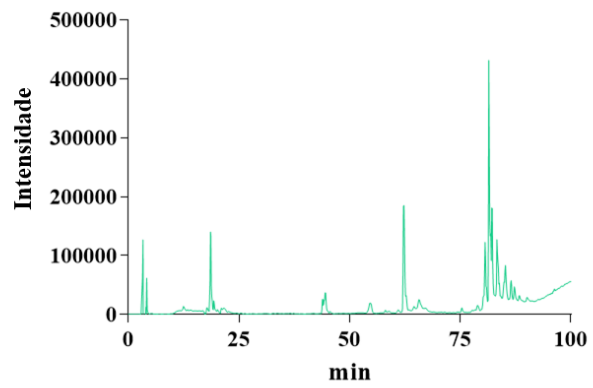
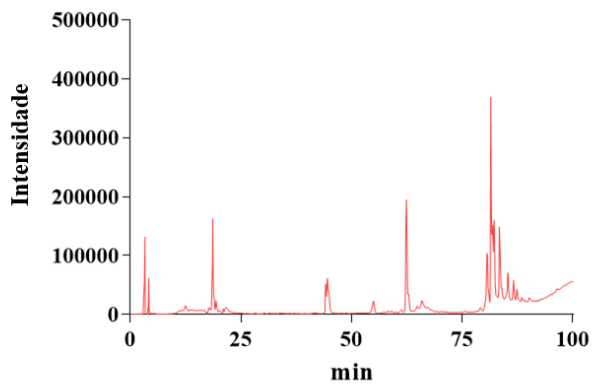
Neonato

Neonato



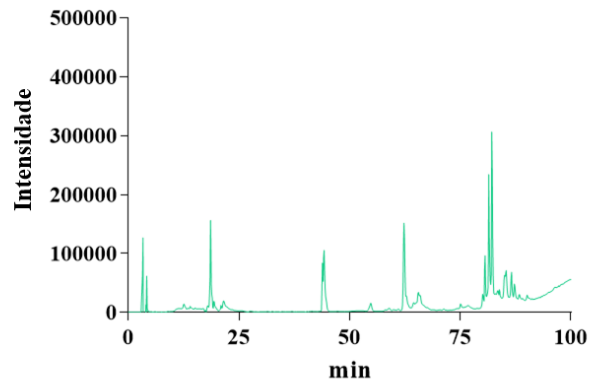
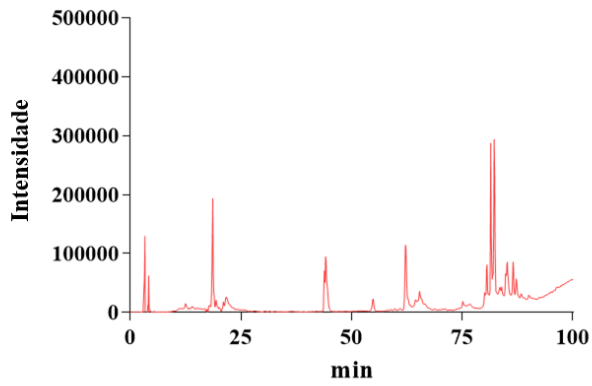
1 ano

1 ano



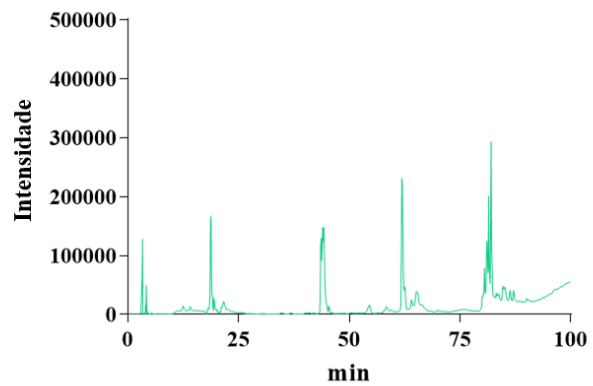
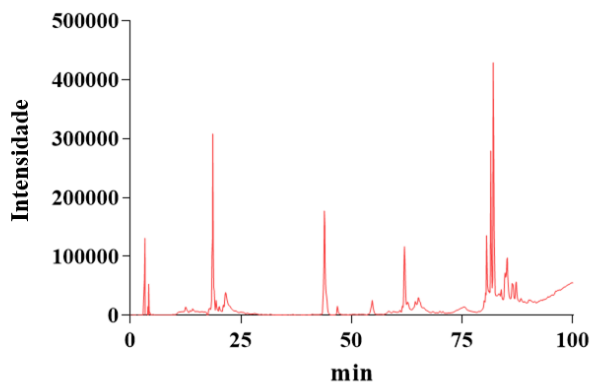
2 anos

2 anos



Adultos

Adultos



Apêndice 5. Abundância relativa das famílias de proteínas nos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. SVMP - metaloproteases; SVSP - serino proteases; CTL - lectina tipo C; PLA₂ - fosfolipase A₂; LAAO - L-amino ácido oxidase; CRISP - proteína secretada rica em cisteína, VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; PLB – fosfolipase B; NT – nucleotidasas; HYA – hialuronidase; PDE – fosfodiesterase; QPCT - glutaminil-peptídeo ciclotransferase; VNGF - fator de crescimento neural.

Família de proteína	Abundância relativa (%)							
	Fêmeas				Machos			
	Neonatos	1 ano	2 anos	Adultos	Neonatos	1 ano	2 anos	Adultos
SVMP	53,64%	54,76%	32,86%	34,26%	54,66%	56,79%	36,61%	32,50%
<i>PI</i>	5,75%	7,43%	10,01%	12,20%	5,86%	6,23%	9,98%	7,64%
<i>PII</i>	14,66%	14,62%	6,41%	4,90%	14,42%	14,74%	6,47%	5,61%
<i>PIII</i>	30,39%	30,58%	15,83%	15,59%	31,14%	32,22%	18,74%	19,02%
SVSP	9,01%	10,30%	14,44%	13,36%	9,48%	10,51%	16,42%	18,06%
CTL	10,20%	5,92%	24,93%	25,86%	7,82%	4,91%	15,73%	15,54%
PLA ₂	8,47%	10,57%	7,32%	6,57%	9,39%	9,84%	9,38%	12,54%
<i>D49</i>	7,52%	9,05%	5,50%	5,09%	7,99%	8,75%	7,54%	10,33%
<i>K49</i>	0,45%	0,92%	1,36%	0,99%	0,77%	0,38%	1,15%	1,54%
CRISP	6,46%	5,93%	5,08%	5,81%	6,28%	6,30%	5,15%	5,19%
LAAO	3,67%	4,68%	7,58%	9,40%	3,75%	3,77%	9,34%	7,30%
NT	0,38%	0,57%	0,76%	0,91%	0,31%	0,65%	0,74%	2,11%
PLB	1,44%	1,59%	1,58%	1,63%	1,49%	1,55%	1,30%	1,27%
VEGF	5,66%	3,86%	3,94%	0,59%	5,97%	4,01%	3,99%	3,68%
Outros	1,05%	1,81%	1,51%	1,59%	0,85%	1,67%	1,33%	1,81%
<i>HYA</i>	0,0024%	0,0015%	0,0016%	0,0034%	0,0012%	0,0004%	0,0012%	0,0030%
<i>PDE</i>	0,24%	0,90%	0,76%	0,75%	0,10%	0,67%	0,43%	0,64%
<i>QPCT</i>	0,54%	0,50%	0,41%	0,48%	0,44%	0,60%	0,45%	0,36%
<i>VNGF</i>	0,21%	0,31%	0,26%	0,25%	0,25%	0,28%	0,36%	0,72%

Apêndice 6. Proteínas identificadas por espectometria de massas, utilizando o banco Uniprot Viperidae, nos venenos de *B. pauloensis* de diferentes idades e sexo. NF- neonato fêmea; NM – neonato macho; 1F – 1 ano fêmea; 1M – 1 ano macho; 2F – 2 anos fêmea; 2M – 2 anos macho; AF – adulto fêmea; AM – adulto macho; SVMP - metaloproteases; SVSP - serino proteases; CTL - lectina tipo C; PLA₂ - fosfolipase A₂; LAAO - L-amino ácido oxidase; CRISP - proteína secretada rica em cisteína, VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; PLB – fosfolipase B; NT – nucleotidases; HYA – hialuronidase; PDE – fosfodiesterase; QPTC - glutaminil-peptídeo ciclotransferase; VNGF - fator de crescimento neural.

Descrição	Organismo	Família da proteína	Acesso	Peptídeos	Peptídeos únicos	Confidence score	Massa	Abundância normalizada							
								NF	NM	1F	1M	2F	2M	AF	AM
<i>L-amino acid oxidase Bs29 (Fragment)</i>	<i>Bothriechis schlegelii</i>	LAAO	sp A0A024BTN9	105	2	6342,97	56376,34	238935	221664	180139	175702	200100	215187	105131	174950
<i>Vaa serine proteinase homolog</i>	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	SVSP	sp A0A1I9KNP0	26	1	1256,01	28927,58	1749,33	2351,28	1820,1	1227,15	1717,82	1914,69	1083,83	1013,65
<i>Hyaluronidase</i>	<i>Echis ocellatus</i>	HYA	sp A3QVN2	1	1	40,38	52543,53	441,933	230,244	257,887	63,3307	320,561	204,214	644,074	648,798
<i>Thrombin-like enzyme</i>	<i>Trimeresurus albolabris</i>	SVSP	sp A7LAC6	25	1	1132,96	29149,8	2878,63	7017,91	15973,4	17609,5	128798	112808	97210,2	83260,3
<i>Cysteine-rich venom protein</i>	<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	CRISP	sp B0VXV6	25	7	1296,63	26542,26	700595	711233	586340	574925	591600	513412	564433	621845
<i>L-amino-acid oxidase</i>	<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	LAAO	sp B0VXW0	104	5	5930,16	58569,22	1779,9	2206,5	1500,86	947,411	4436,64	3339,93	4931,63	64643,7
<i>L-amino-acid oxidase (Fragment)</i>	<i>Bothrops pauloensis</i>	LAAO	sp B5AR80	264	53	18621,29	56799,51	380023	420646	557490	344818	1200147	1253805	1486417	1161635

<i>Serine protease</i>	<i>Echis ocellatus</i>	SVSP	sp B5U6Y3	6	1	213,21	28254,61	4970,94	3914,58	7179,41	2832,77	47432,2	24124,8	36367	43060
<i>Phospholipase A2 homolog (S49)</i>	<i>Echis ocellatus</i>	PLA2	sp B5U6Y4	1	1	27,82	15634,01	1508,82	1038,65	3259,17	1930,63	6137,61	7573,51	7888,49	9624,96
<i>Snake venom 5'-nucleotidase</i>	<i>Gloydius brevicaudus</i>	NT	sp B6EWW8	36	9	3189,75	64433,95	48793,4	33934,7	61429,2	59555,1	77836,3	68368,3	93084,7	255200
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like daborhagin-K (PIIIa)</i>	<i>Daboia russelii</i>	SVMP	sp B8K1W0	10	2	442,51	69555,01	22799,1	22848,7	22861,3	17147,4	14659	10662,8	9208,72	13658,1
<i>Snake venom metalloproteinase BpMP-1 (Fragments) (PI)</i>	<i>Bothrops pauloensis</i>	SVMP	sp C0HJU2	141	38	11917,59	19545,86	304105	299216	538475	284604	1429253	1222467	1758110	1258459
<i>Snake venom vascular endothelial growth factor toxin apiscin</i>	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	VEGF	sp C0K3N2	2	1	154,29	13699,71	470,278	984,183	229,504	227,192	426,99	412,398	13,9645	179,933
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like batroxstatin-1 (PIIIa)</i>		SVMP	sp C5H5D2	91	61	5495,87	46314,16	1146939	1304596	958338	1173738	204426	599821	239175	1272624
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like batroxstatin-3 (Fragment) (PIIIa)</i>	<i>Bothrops atrox</i>	SVMP	sp C5H5D4	103	83	6840,02	46284,74	1143718	1476885	1031336	889158	737736	640506	617253	714302
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin VMP-II (PII)</i>	<i>Crotalus atrox</i>	SVMP	sp C9E1R7	15	3	877,03	54736,64	38527,4	38419,5	51351,8	44286,8	61824,3	60370,6	46036,7	36044,8
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin VMP-II (PII)</i>	<i>Crotalus viridis viridis</i>	SVMP	sp C9E1R9	21	3	1330,27	53813,58	14089,9	7986,84	1555,19	52760,1	39407,1	34814,2	85011,8	46585,4
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VMP-III (PIIIa)</i>	<i>Agkistrodon piscivorus leucostoma</i>	SVMP	sp C9E1S0	31	4	1717,17	68212,09	104910	136684	16007,9	43815,4	4862,88	13159,9	35723,2	4354,26
<i>Acidic phospholipase A2 BpPLA2-TXI (D49)</i>	<i>Bothrops pauloensis</i>	PLA2	sp D0UGJ0	59	15	3862,55	15394,59	500989	557246	574337	465178	357017	422951	313740	671542

<i>Snaclec jerdonibitin subunit beta</i>	<i>Protobothrops jerdonii</i>	CTL	sp D1MGU1	5	1	386,32	16834,02	3457,59	4541,64	2014,85	2189,14	1722,62	1806,63	762,595	1210,83
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin PMMP-1 (PII)</i>	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	SVMP	sp E9NW26	34	12	2646,42	53446,41	1273518	1180265	1032681	947438	217062	250528	52193,7	111399
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin PMMP-2 (PII)</i>	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	SVMP	sp E9NW27	10	1	555,14	54412,71	411,465	581,072	1291,91	1777,49	1876,97	1967,8	1224,41	874,937
<i>Snake venom 5'-nucleotidase</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	NT	sp F8S0Z7	31	4	2451,97	64682,15	17698,6	21523,1	30162,8	32369,1	66006,2	49439,3	66716,6	177193
<i>Phospholipase B</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	PLB	sp F8S101	24	24	1396,4	64049,2	250161	265544	256513	220058	297277	208710	285618	258997
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like 4a (PIII)</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVMP	sp F8S108	28	11	1591,86	67910,11	326839	309987	280644	289400	390771	289658	371314	421595
<i>Acidic phospholipase A2 BmooPLA2 (D49)</i>	<i>Bothrops moojeni</i>	PLA2	sp G3DT18	10	3	520,39	15679,71	14944,7	339,095	377,513	279,743	166,999	239,045	184,554	674,859
<i>Basic phospholipase A2 homolog 2 (K49)</i>	<i>Bothrops brazili</i>	PLA2	sp I6L8L6	30	1	2184,28	13690,99	66,2843	0	0	0	261,73	241,312	286,4	149,199
<i>Snake venom serine proteinase</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	sp J3RYA3	11	1	474,24	29529,97	654,788	546,31	5076,24	11722	603,338	1585,3	121,71	225,711
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like (PIII)</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVMP	sp J3S830	41	3	1999,98	68840,44	15934,8	20324,1	84328,6	33770,3	22035,8	21423,9	23766,9	26909,2
<i>C-type lectin 9a</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	CTL	sp J3SBP0	2	1	65,38	17904,09	0	0	0	0	3674,13	2968,38	0	941,428
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like 2d (PIII)</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVMP	sp J3SDW6	35	5	1854,61	67849,88	64721,8	90342,6	43986,4	45875,3	8374,17	42682,1	9004,98	117869

<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like 8 (PIII)</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVMP	sp J3SDW8	37	1	1940,14	67800,48	2056,07	2356,68	2513	8601,69	331,155	1698,76	193,242	359,971
<i>Snake venom serine proteinase 14</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	sp J3SDW9	23	5	1103,05	27414,5	216442	223984	171769	167928	244873	272486	131318	264024
<i>Snake venom serine proteinase 4a</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	SVSP	sp J3SDX0	28	1	1520,44	28923,21	5678,2	7310,73	6621,46	4857,01	7362,73	7060,33	5374,3	11339,4
<i>Venom phosphodiesterase 1</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	PDE	sp J3SEZ3	20	20	1307,26	96372,95	43815	19614,3	153326	102731	152216	74677,1	140252	136630
<i>L-amino acid oxidase Lm29</i>	<i>Lachesis muta</i>	LAAO	sp J7H670	146	5	8777,11	58532,26	640,266	572,262	640,3	501,01	440,65	389,848	301,465	15349,2
<i>Thrombin-like enzyme barnettobin (Fragment)</i>	<i>Bothrops barnetti</i>	SVSP	sp K4LLQ2	14	2	540,06	27584,65	1373,02	512,255	2762	2998,85	3746,5	4088,02	4736,5	2687,23
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like ACLD (PIIIa)</i>	<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	SVMP	sp O42138	25	9	1360,16	69512,38	365546	216022	274055	255649	179905	188035	166409	136365
<i>L-amino-acid oxidase</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>	LAAO	sp O93364	107	5	5872,73	58662,54	312,461	200,705	300,255	219,861	336,254	181,913	319,162	17381,5
<i>Thrombin-like enzyme batroxobin</i>	<i>Bothrops atrox</i>	SVSP	sp P04971	22	5	1161,75	28188,58	1190,95	962,93	1277,25	1004,99	718,82	55442	1545,11	66203
<i>Protein C activator</i>	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	SVSP	sp P09872	20	2	851,36	25105,87	4200,96	4248,48	5129,62	3946,75	3276,37	2884,26	2900,04	4982,11
<i>L-amino-acid oxidase (Fragment)</i>	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	LAAO	sp P0C2D6	3	1	215,24	2931,178	779,841	887,065	2027,63	600,124	1763,03	2526,38	5161,1	1866,75
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin bilitoxin-1 (PII)</i>	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	SVMP	sp P0C6E3	9	2	374,51	32313,55	23468,3	15603,1	47057,8	34974	680,503	1299,17	1496,69	1169,46

<i>Snake venom metalloproteinase BnP2 (Fragments) (PI)</i>	<i>Bothrops pauloensis</i>	SVMP	sp P0C6S1	42	3	3425,58	8008,047	7924,49	7712,5	43981,7	20132,1	45729,6	34705,7	46550,4	47567,1
<i>Snaclec bothroalternin subunit alpha/beta (Fragment)</i>	<i>Bothrops alternatus</i>	CTL	sp P0C8I9	1	1	27,39	3099,287	1819,21	1457,03	467,984	1614,69	2831	2225,42	431,96	78,2895
<i>Snaclec bothroinsularin subunit alpha</i>	<i>Bothrops insularis</i>	CTL	sp P0C929	13	3	841,14	15209,03	98907,3	124838	35107,7	42011,8	875,093	1004,29	2108,26	257,025
<i>Snaclec bothroinsularin subunit beta</i>	<i>Bothrops insularis</i>	CTL	sp P0C930	11	6	545,7	14874,48	319283	347676	156612	189349	22632,2	17989,2	23044,2	13379,6
<i>Serotriflin</i>	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	CRISP	sp P0CB15	5	1	391,86	24899,01	32496,1	36615,7	38994,2	31609,4	36760,3	27210,7	35141,3	37914,8
<i>Thrombin-like enzyme bhalternin</i>	<i>Bothrops alternatus</i>	SVSP	sp P0CG03	30	2	1780,53	28045,18	41762,7	56443,7	41004,5	39316,3	88075,1	95557,2	77011,4	105713
<i>L-amino-acid oxidase</i>	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	LAAO	sp P0DI84	80	3	4528,72	54747,8	2996,48	6366,62	3340,01	5940,24	1844,49	1636,43	819,396	1554,92
<i>C-type lectin BPL</i>	<i>Bothrops pirajai</i>	CTL	sp P0DL30	15	7	891,81	16117,15	684,163	311,388	2166,22	910,057	93126,3	43018,1	3722,52	121247
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin stejnitin (PII)</i>	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	SVMP	sp P0DM87	14	1	720,4	54436,14	22021,5	6169,78	27014,6	31520,1	18753,8	19188	11483	3449,24
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin BA-5A (PII)</i>	<i>Bitis arietans</i>	SVMP	sp P0DM97	6	2	263,02	58718,35	4978,71	4462,17	3865,15	4903,27	1018,98	1878,66	895,304	1211,23
<i>Cysteine-rich venom protein</i>	<i>Echis coloratus</i>	CRISP	sp P0DMT4	25	8	1675,15	24698,86	56277,1	18804,7	8447,14	5109,91	3465,01	3970,69	110797	38317,8
<i>L-amino acid oxidase (Fragments)</i>	<i>Cerastes cerastes</i>	LAAO	sp P0DQH9	55	8	2748,64	19921,31	5235,89	7205,6	2167,63	2110,1	8753,26	6036,96	7610,01	23847,3

<i>Snake venom metalloproteinase atrolysin-D (PI)</i>	<i>Crotalus atrox</i>	SVMP	sp P15167	11	1	492,04	46844,91	1605,24	2116,91	1059,65	910,228	218,621	306,345	187,388	396,084
<i>Factor V activator RVV-V alpha</i>	<i>Daboia siamensis</i>	SVSP	sp P18964	15	5	651,36	26182,1	51146,2	94648,9	7547,66	5636,32	16768,3	15256	9320,43	24936,5
<i>Snaclec botroctin subunit alpha</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	CTL	sp P22029	27	17	1962,51	15215,21	463723	337552	204102	116803	1684852	1012518	1398956	1166042
<i>Snaclec botroctin subunit beta</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	CTL	sp P22030	82	69	6087,17	15036,71	491092	295361	286347	134381	2487737	1256633	2282186	1509889
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin (PII)</i>	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	SVMP	sp P30403	12	2	793,14	54006,04	136,165	257,719	1352,58	381,087	645,374	46619,4	165,783	310999
<i>Platelet-aggregating proteinase PA-BJ (Fragment)</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	sp P81824	64	27	3598,29	25741,83	152002	199450	125814	107980	223382	176059	132488	451643
<i>Basic phospholipase A2 homolog 1 (K49)</i>	<i>Bothrops moojeni</i>	PLA2	sp P82114	18	2	1130,84	13737,96	576,668	1163,18	3685,49	632,211	8494,66	5581,01	4040,47	10277,3
<i>Basic phospholipase A2 homolog (K49)</i>	<i>Atropoides nummifer</i>	PLA2	sp P82950	8	1	378,74	13711,78	50763,4	79800,1	148729	53446,6	259719	188738	149024	296988
<i>Snake venom metalloproteinase BaP1 (PI)</i>	<i>Bothrops asper</i>	SVMP	sp P83512	37	12	2300,52	45935,67	143525	185133	142974	82187,6	209894	77399,3	215969	78139,6
<i>Vascular endothelial growth factor A</i>	<i>Bitis gabonica</i>	VEGF	sp P83906	2	2	88,4	22357,92	5060,68	4724,93	4222,34	3542,46	7215,28	8941,59	6637,82	36646,9
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin jerdoniti (PII)</i>	<i>Protobothrops jerdonii</i>	SVMP	sp P83912	11	2	813,43	54613,51	447874	575365	413998	321759	316762	231456	225103	205051
<i>Snake venom metalloproteinase basparin-A (Fragments) (PIIIa)</i>	<i>Bothrops asper</i>	SVMP	sp P84035	9	3	474,22	6838,935	7473,23	7882,3	7542,89	7584,21	3827,63	3911,24	4016,93	2790,76

<i>Snake venom metalloproteinase leucurolysin-A (PI)</i>	<i>Bothrops leucurus</i>	SVMP	sp P84907	54	24	3077	23019,28	485909	526546	414892	445477	255563	306754	225441	218866
<i>Zinc metalloproteinase leucurolysin-B (Fragment) (PIIIa)</i>	<i>Bothrops leucurus</i>	SVMP	sp P86092	37	4	2697,35	36261,89	29516,7	35815,7	50289,9	36301,9	50579,7	40284,9	45574,1	20541,1
<i>Snake venom serine protease rhinocerase (Fragments)</i>	<i>Bitis rhinoceros</i>	SVSP	sp P86497	8	1	297,69	9977,652	337,95	768,264	1049,61	3333,27	1701,45	4082,15	856,835	1702,98
<i>Basic phospholipase A2 BmjeTX-I (D49)</i>	<i>Bothrops marajoensis</i>	PLA2	sp P86803	4	1	220,54	13809,85	664,643	1058,16	1144,53	556,389	1557,19	806,141	313,3	890,921
<i>Acidic phospholipase A2 (D49)</i>	<i>Bothrops ammodytoides</i>	PLA2	sp P86907	12	1	608,93	13867,64	953,324	725,102	634,036	491,251	406,405	623,919	406,403	1198,67
<i>C-type lectin BpLec</i>	<i>Bothrops pauloensis</i>	CTL	sp P86970	31	23	1765,65	16223,23	15991,5	15163	52729,1	16251,6	249378	72037,2	648092	260802
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin (PII)</i>	<i>Bothrops asper</i>	SVMP	sp Q072L5	24	2	1471,84	53564,25	4,24643	0	750,835	392,635	670,657	740,144	1528,46	494,82
<i>Thrombin-like enzyme asperase</i>	<i>Bothrops asper</i>	SVSP	sp Q072L6	49	7	2960,06	28018,87	88029,8	98926,8	72601,6	67510,1	102227	97872	69272,5	106779
<i>Snake venom serine protease</i>	<i>Lachesis stenophrys</i>	SVSP	sp Q072L7	21	3	1182,35	27814,09	62452,1	50704,3	77847,6	50480,3	119091	91773,2	155836	232034
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-4 (Fragment) (PIIIa)</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	SVMP	sp Q0NZX7	4	3	425,22	10530,86	15881,3	7747,32	66342,1	18231,8	2673,03	8318,13	2491,63	1285,34
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-3 (Fragment) (PIIIa)</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	SVMP	sp Q0NZX8	33	21	1824,77	21523,09	293999	347527	264143	298478	65095,1	82985,7	9445,63	33441,1
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like bothrojarin-2 (Fragment) (PIIIa)</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	SVMP	sp Q0NZX9	53	38	3621,3	24286,1	636428	534160	611607	594670	645117	486387	740653	421221

<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin (PII)</i>	<i>Echis ocellatus</i>	SVMP	sp Q14FJ4	4	1	194,83	55165,13	26061,9	19196,9	22900,9	22256,8	5077,2	6760,73	2155,87	4809,77
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BjuMP-1 (Fragment) (PIIIa)</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	SVMP	sp Q1PHZ4	27	1	1611,58	61984,86	17,6515	473,126	17,9469	11,4901	4,34069	6,88353	25,24	1,84946
<i>Acidic phospholipase A2 BE-1-PLA2 (D49)</i>	<i>Bothrops erythromelas</i>	PLA2	sp Q2HZ28	62	13	4499,54	15435,42	863746	960042	963586	867211	734788	869510	631715	1542265
<i>Acidic phospholipase A2 Tpu-E6b (D49)</i>	<i>Trimeresurus puniceus</i>	PLA2	sp Q2YHJ5	8	1	406,49	13942,52	126,347	81,9016	108,075	88,5467	31,6502	90,5829	19,8409	141,336
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like stejnihagin-B (PIIIa)</i>	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	SVMP	sp Q3HTN2	15	1	872,63	67698,5	1668,32	1755,5	3544,5	2478,27	13,5285	272,194	37,2812	0
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like VLAIp-A (PIIIc)</i>	<i>Macrovipera lebetina</i>	SVMP	sp Q4VM08	5	1	221,85	68710,06	4014,82	2967,15	370,978	1689,96	4645,86	17064,3	6526,92	132559
<i>Snaclec trimecetin subunit beta</i>	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	CTL	sp Q5FZI5	2	1	63,99	16634,87	0	0	191,982	882,317	132,269	381,617	78,3288	0
<i>Snake venom serine protease HS114</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	sp Q5W959	51	34	3040,67	27842,78	487751	448353	467166	517416	888451	898305	798629	1212262
<i>Snake venom serine protease HS112</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	SVSP	sp Q5W960	20	4	1100,03	27988,39	13110,3	17919,1	7721,65	12406,9	25829,7	35061	30610,9	20874,1
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin (PII)</i>	<i>Bothrops insularis</i>	SVMP	sp Q5XUW8	121	6	9591,8	53313,04	433620	414299	458290	393702	337401	261428	282341	256506
<i>Snake venom serine protease BthaTL</i>	<i>Bothrops alternatus</i>	SVSP	sp Q6IWF1	15	8	938,17	25629,52	110952	171012	111051	89671,3	298405	298248	259241	247069
<i>Snake venom vascular endothelial growth factor toxin</i>	<i>Bothrops erythromelas</i>	VEGF	sp Q6J936	26	17	2612,98	16363,83	928559	1032992	577206	552132	545715	516362	95125,4	579516

<i>L-amino-acid oxidase (Fragment)</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	LAAO	sp Q6TGQ9	181	3	12208,46	56288,72	1722,29	2613,39	1240,44	769,123	841,963	891,452	930,149	2694,08
<i>Snake venom serine protease KN13</i>	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	SVSP	sp Q71QH6	14	2	527,75	28452,51	5873,26	1678,17	29752,7	22162,9	33624,8	23614,6	22648,1	15987
<i>Snake venom serine protease CL5</i>	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	SVSP	sp Q71QI3	16	2	700,75	28974,52	27924,6	32282,7	19315,4	18809,5	5021,33	7544,2	3990,66	13623,9
<i>Snake venom serine protease KN9</i>	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	SVSP	sp Q71QJ1	17	1	678,66	28167,84	633,185	519,766	1662,27	926,524	1834,77	1968,62	1542,18	4064,59
<i>Snaclec tokaracetin subunit beta (Fragment)</i>	<i>Protobothrops tokarensis</i>	CTL	sp Q7LZI6	1	1	82,93	4915,863	20304,4	20949,5	17642,5	20400,4	34028,7	30994	29249,2	27050,2
<i>Thrombin-like enzyme cerastocytin</i>	<i>Cerastes cerastes</i>	SVSP	sp Q7SYF1	11	3	420,57	27974,17	2082,94	6198,95	3735,97	1180,83	20752,7	6819,59	4434,3	6826,3
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin ussurin (PII)</i>	<i>Gloydus ussuriensis</i>	SVMP	sp Q7SZD9	34	3	2212,54	53443,82	13743,4	16834,8	18619,5	11067,6	36659,2	19358,5	23468	13992,6
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin (PII)</i>	<i>Gloydus saxatilis</i>	SVMP	sp Q7SZE0	17	1	707,43	54011,46	1153,6	1461,22	2739,85	1118,55	488,702	245,697	277,265	362,652
<i>Snake venom metalloproteinase BjuSSuMP-2 (Fragment) (PI)</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	SVMP	sp Q7T1T4	13	1	692,07	41957,02	363,804	367,694	1056,27	633,76	1767,14	1542,26	1781,64	938,29
<i>Snake venom serine protease homolog</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	SVSP	sp Q7T229	50	7	3114,55	28654,07	26752,9	16206,6	72765,3	47129,8	120135	94536,6	147850	154240
<i>Cysteine-rich venom protein catrin</i>	<i>Crotalus atrox</i>	CRISP	sp Q7ZT99	23	2	1455	26646,5	233666	249327	222305	186809	210469	177336	207942	222736
<i>Cysteine-rich venom protein piscivorin</i>	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	CRISP	sp Q7ZTA0	32	2	1667,55	26681,5	7270,68	11511,4	8791,77	5523,47	11476,3	10429	9674,05	14205,6

<i>Acidic phospholipase A2 Cvv-E6h (D49)</i>	<i>Crotalus viridis viridis</i>	PLA2	sp Q800C1	24	1	1543,43	15544,7	51,8774	67,1832	79,3417	41,6624	74,664	40,6498	17,1306	393,053
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin agkistin (PII)</i>	<i>Gloydius halys</i>	SVMP	sp Q8AWX7	15	1	849,21	54841,52	662,31	739,973	401,99	458,994	284,835	118,509	70,7996	0
<i>Beta-fibrinogenase stejnefibrase-2</i>	<i>Trimeresurus stejneri</i>	SVSP	sp Q8AY79	16	4	634,11	28028	69724	86215,4	87680,8	59318	105527	83652,9	73839,3	85049
<i>Thrombin-like enzyme stejnobin</i>	<i>Trimeresurus stejneri</i>	SVSP	sp Q8AY81	15	2	563,64	29328,06	6646,58	11373,5	5473,74	7172,44	17210,4	25152,7	22173,3	41955,7
<i>Cysteine-rich venom protein ablomin</i>	<i>Gloydius blomhoffii</i>	CRISP	sp Q8JI40	36	6	2075,53	26914,3	89570,3	87567,8	89525,7	89823,1	103995	92384,2	89104,7	125367
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin-like HR1a (PIIIb)</i>	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	SVMP	sp Q8JIR2	24	2	1322,65	68765,52	25357,7	21433,3	55581,7	37578,1	77740,6	50829,8	77347,7	42276,2
<i>Snaclec clone 2100755</i>	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	CTL	sp Q8JIV8	3	2	84,78	17944,27	14,3587	151,935	128,943	1445,03	3404,82	3146,97	516,848	1093,72
<i>Snake venom serine protease BITS01A</i>	<i>Bothrops insularis</i>	SVSP	sp Q8QG86	27	10	1341,53	28356,9	54876,3	13522,5	172684	108663	39533,9	55285,5	111559	214566
<i>Acidic phospholipase A2 BITP01A (D49)</i>	<i>Bothrops insularis</i>	PLA2	sp Q8QG87	9	2	428,28	15758,95	1303,74	946,868	785,303	623,707	2402,68	901,089	790,576	1043,12
<i>Snake venom metalloproteinase BITM02A (PI)</i>	<i>Bothrops insularis</i>	SVMP	sp Q8QG89	22	5	1142,16	46100,15	62155,2	61431,3	62956,9	55439,1	52264,3	54763,8	36204,2	37922,6
<i>Snake venom serine protease catroxase-1</i>	<i>Crotalus atrox</i>	SVSP	sp Q8QHK3	27	1	1386,33	28624,92	20803,4	20537,8	22960,2	16860,7	3668,5	10678,1	2526,25	1302,62
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like berythraactivase (PIIIa)</i>	<i>Bothrops erythromelas</i>	SVMP	sp Q8UVG0	35	19	2327,68	68531,79	745184	685356	777066	578245	277395	335769	223102	304419

<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin (PII)</i>	<i>Gloydius halys</i>	SVMP	sp Q90220	19	3	1527,44	53619,71	239335	297997	169313	230731	25800,8	46587,9	19656,9	17607,8
<i>Venom nerve growth factor</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	VNGF	sp Q90W38	12	1	956,96	27161,63	20163,4	27437	34502,9	29199,6	32861,5	36558,8	25198,9	70044,4
<i>Snake venom vascular endothelial growth factor toxin</i>	<i>Bothrops insularis</i>	VEGF	sp Q90X24	12	3	1468,66	16355,81	47370,6	22284,3	40163,7	12902,3	190363	114206	2074,06	135488
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like HV1 (PIIIc)</i>	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	SVMP	sp Q90ZI3	20	7	1160,44	68191,56	19274,2	24577	20852,4	15366,3	34174,1	22916,1	24384,2	58544,2
<i>Thrombin-like enzyme calobin-1</i>	<i>Gloydius ussuriensis</i>	SVSP	sp Q91053	40	2	2164,26	28908,12	37721,4	37045,4	48267,5	36634	30276	26858,8	18398,7	36675,9
<i>Beta-fibrinogenase mucrofibrase-1</i>	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	SVSP	sp Q91507	19	1	858,6	28099,29	6806,68	9197,18	1526,8	2283,4	7442,89	6750,07	7600,81	4107,07
<i>Venom plasminogen activator TSV-PA</i>	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	SVSP	sp Q91516	28	1	1582,61	28334,32	7302,52	6944,76	3065,87	4340,22	2922,13	2372,94	3911,16	4825,91
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrolysin-A (Fragment) (PIIIa)</i>	<i>Crotalus atrox</i>	SVMP	sp Q92043	37	9	2202,4	46879,34	317513	346606	300557	300684	54329,6	67040,2	17094,7	17574,4
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin (PII)</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	SVMP	sp Q98SP2	34	6	2347,51	53440,53	50637,5	53461,5	44707,7	30801,6	98609,5	35385,3	77359,3	32284,8
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin-like HF3 (PIIIa)</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	SVMP	sp Q98UF9	61	18	3674,06	67695,42	69704,8	53284,2	79072,1	82809,1	94534,3	69812,1	152953	42306,4
<i>Snaclec anticoagulant protein subunit B</i>	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	CTL	sp Q9DEF8	6	1	344,06	16997,17	840,813	1137,16	254,235	460,486	0	0	22,8019	0
<i>Snaclec anticoagulant protein subunit A</i>	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	CTL	sp Q9DEF9	3	1	150,82	17124,3	840,299	900,823	96,9754	588,53	0	479,626	0	1783,04

<i>Venom nerve growth factor</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	VNGF	sp Q9DEZ9	14	3	1038,83	27118,65	18579,5	19818,9	17897,1	13216,4	18249,3	25374,7	21107,7	84357,7
<i>Snake venom serine protease 3</i>	<i>Protobothrops jerdonii</i>	SVSP	sp Q9DF66	23	1	1321,88	28025,08	167,809	180,693	20,5611	116,156	314,744	279,256	133,774	221,506
<i>Basic phospholipase A2 homolog 2 (K49)</i>	<i>Bothrops moojeni</i>	PLA2	sp Q9I834	21	3	1369,94	13887,1	2601,17	1747,34	3490,1	3944,74	2293,42	1610,4	31125,6	20721
<i>Thrombin-like enzyme acutobin</i>	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	SVSP	sp Q9I8X2	11	4	585,58	28815,05	38523,1	51950,5	44432,5	42761,3	97371,2	65287,6	62706	162487
<i>Basic phospholipase A2 homolog BnSP-7 (K49)</i>	<i>Bothrops pauloensis</i>	PLA2	sp Q9IAT9	41	1	2826,81	13726,98	28400,7	62942,9	795,265	526,982	2321,22	1398,55	1434,79	3246,77
<i>Snaclec coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit B (Fragment)</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	CTL	sp Q9PS06	9	6	614,74	3581,862	168598	130635	176218	155399	106298	49759,4	101508	68760,7
<i>Snaclec GPIB-binding protein subunit beta</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	CTL	sp Q9PSM5	6	2	372,9	14297,88	57112,5	10732,8	442,799	239,246	312,777	7752,65	14447	123,346
<i>Snaclec GPIB-binding protein subunit alpha</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	CTL	sp Q9PSM6	9	6	545,34	16719,74	124124	97883	18831,9	13082,6	14109,4	18433,2	20250	4495,42
<i>Snake venom metalloproteinase HT-1 (Fragment) (PIIIa)</i>	<i>Crotalus ruber ruber</i>	SVMP	sp Q9PSN7	14	4	537,58	23601,01	180522	199682	107801	127008	38088,9	42446,4	5616,63	9003,71
<i>Acidic phospholipase A2 H1E6 (D49)</i>	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	PLA2	sp Q9PVF2	8	1	422,6	15685,86	534,683	602,833	451,53	164,656	4875,71	3318,37	8700,03	4271,46
<i>Snake venom serine protease Haly-2</i>	<i>Gloydus brevicaudus</i>	SVSP	sp Q9YGJ9	25	3	1200,46	28180,18	9076,34	1526,55	15075,3	14393,6	36172	26457,9	40478,8	67009,3
<i>Zinc metalloproteinase/disintegrin (PII)</i>	<i>Gloydus brevicaudus</i>	SVMP	sp Q9YI19	31	6	1849,03	52801,92	21646	19492	18796,3	37196,4	8712,18	10547,7	8484,62	2668,16

<i>Glutaminyl-peptide cyclotransferase</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	QPCT	sp Q9YIB5	14	14	1009,1	42204,29	99408,1	83216,2	85113,8	91857,8	81995,7	76925,8	91063,3	77603,4
<i>Snake venom metalloproteinase TM-1 (PI)</i>	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	SVMP	sp U3KRG1	5	1	331,07	21790,65	51633,3	32544,1	60268,5	60156,5	10560	19396,3	7974,17	1292,54
<i>Zinc metalloproteinase-disintegrin BlatH1 (PII)</i>	<i>Bothriechis lateralis</i>	SVMP	sp U5PZ28	18	5	806,03	54298,38	85517,5	93565,1	172864	79973,6	112766	83900,7	81258,1	161882
<i>L-amino acid oxidase</i>	<i>Cerastes cerastes</i>	LAAO	sp X2JCV5	105	4	6709,76	58556,61	783,369	464,708	1970,77	915,081	2419,16	2898,78	19944,6	18686,6
<i>L-amino acid oxidase (Fragment)</i>	<i>Bothrops pictus</i>	LAAO	sp X2L4E2	173	3	11807,57	56348,68	3267,58	2717,1	2769,39	2905,76	9237,96	9570,96	13774,1	10809,1