

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Especialização Toxinas de Interesse em Saúde

Marina Marinho Silva

**Análise quantitativa e caracterização preliminar do veneno de *Bothrops*
*moojeni***

São Paulo

2023

Marina Marinho Silva

**Análise quantitativa e caracterização preliminar do veneno de *Bothrops
moojeni***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização Toxinas de Interesse em Saúde do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Toxinologia.

Orientadora: Dra. Marisa Maria Teixeira da Rocha

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Silva , Marina Marinho

Análise quantitativa e caracterização preliminar do veneno de *Bothrops moojeni* /
Marina Marinho Silva ; orientador(a) Marisa Maria Teixeira Rocha - São Paulo, 2023.
67 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan,
Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde.

1. *Bothrops* 2. venenos . 3. variação entre presas I. Rocha, Marisa Maria Teixeira .
II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde -
Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

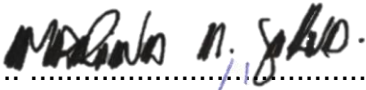
AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO


Eu, Marina Marinho Silva, aluna do Curso de Especialização toxinas de interesse em saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 13 de fevereiro de 2023


.....
aluna

De acordo:.....
Orientadora: 

Dedico este trabalho

À minha mãe, Zuleika, e minha irmã Valquíria pelo carinho, amor e compreensão e insistência para concretização deste sonho.

Não tenho palavras para agradecer por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Obrigada por existirem na minha vida!

AGRADECIMENTOS

À minha família, pois sem seu apoio eu não estaria aqui, em especial meu filho Rafael, razão do meu viver.

À minha orientadora Dra. Marisa Rocha, pelos ensinamentos, amizade, apoio e paciência. Por não desistir de mim e do meu projeto.

Ao Dr. Savio S. Sant'anna, pela colaboração neste trabalho, e por idealizar este projeto tão importante.

À Dra. Caroline S. Silva por toda ajuda, e por sempre me auxiliar.

À Josiane, que me hospedou, e desde a época da graduação me ajuda sempre que necessário.

As meninas do curso de toxinas, pelos momentos de alegria. Que tornaram nossos dias no Instituto melhores, as colegas de laboratório Thaís e Maria Vitória por toda ajuda.

Aos colegas de laboratório que me ajudaram de alguma forma. Muito obrigada

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Deixo aqui meu muito obrigada.

“Dum Spiro Spero”
 (“Enquanto eu respiro há esperança”)
 Teócrito e Cícero, tradução própria



RESUMO

Silva, Marina Marinho. **Análise quantitativa e caracterização preliminar do veneno de *Bothrops moojeni***. 2023. 67 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização Toxinas de Interesse em Saúde) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Os venenos animais são usados para fins predatórios e defensivos e evoluíram independentemente em uma gama filogenética de organismos, com importante papel para as serpentes avançadas. *Bothrops moojeni* é responsável por um grande número de acidentes notificados na área central do Brasil, e assim como todas as serpentes do gênero *Bothrops* seu veneno possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. O presente trabalho avaliou o perfil proteico dos venenos, o conteúdo eletroforético (SDS-PAGE), a atividade gelatinolítica, a dose mínima coagulante de 11 fêmeas e 7 machos de *Bothrops moojeni*. Com os resultados obtidos, observamos que o teor proteico tanto de machos quanto de fêmeas nas presas esquerda apresentaram variação significativa. Os perfis densitométricos foram semelhantes entre si e com bandas variando entre 26 a 30 kDa. Por meio da técnica de zimografia pode-se observar que a ação dos venenos em torno dos 30 kDa apresentou-se mais ativos. Tanto machos quanto fêmeas foram capazes de coagular os plasmas humanos e equinos em 60 segundos. Machos possuem maior atividade coagulante e fêmeas tem sua capacidade de coagulação perdida à medida que os animais envelhecem. Por meio da análise do peso dos venenos líquidos e liofilizados, apresentou diferença entre presa direita e esquerda, 72% dos indivíduos apresentam maior quantidade de veneno secretada pela presa direita. Demonstrando assim haver diferença na quantidade de veneno secretada entre as presas direita e esquerda. A variação intraespecífica encontrada neste estudo, corrobora e ainda expõe novos achados, destacando a importância para novos estudos com fins ecológicos, evolutivos e médicos.

Palavras-chave: *Bothrops*. Venenos. Variação entre presas.

ABSTRACT

Silva, Marina Marinho. **Quantitative analysis and preliminary characterization of Bothrops moojeni venom**. 2023. 67 p. Monograph (Specialist in toxins of interest in health) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Animal venoms are used for predatory and defensive purposes and have evolved independently in a phylogenetic range of organisms, with an important role for advanced snakes. *Bothrops moojeni* is responsible for a large number of reported accidents in central Brazil, and like all snakes of the *Bothrops* genus, its venom has proteolytic, coagulant and hemorrhagic action. The present work evaluated the protein profile of the venoms, the electrophoretic content (SDS-PAGE), the gelatinolytic activity, the minimum coagulant dose of 11 females and 7 males of *Bothrops moojeni*. With the results obtained, we observed that the protein content of both males and females in left and right fangs did not show significant variation. Density profiles were similar to each other and with bands ranging from 26 to 30 kDa. Through the zymography technique, it can be observed that the action of poisons around 30 kDa was more active. Both males and females were able to clot human and equine plasma within 60 seconds. Males have greater coagulant activity and females have their coagulation capacity lost as animals age. By analyzing the weight of liquid and lyophilized venoms, there was a difference between right and left prey, 72% of individuals had a greater amount of venom secreted by the right fangs. Thus demonstrating that there is a difference in the amount of venom secreted between the right and left fang. The intraspecific variation found in this study corroborates and even exposes new findings, highlighting the importance for new studies with ecological, evolutionary and medical purposes.

Keywords: *Bothrops*. Venoms. Variation between fangs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica do gênero <i>Bothrops</i> no Brasil.....	17
Figura 2 - Espécie <i>Bothrops moojeni</i>	18
Figura 3 – Distribuição geográfica das serpentes selecionadas para o estudo	24
Figura 4 – Imagem de microplaca 96 poços.....	26
Figura 5 – Experimento de eletroforese em SDS-PAGE	28
Figura 6 – Fibrômetro utilizado para teste de coagulação.....	29
Figura 7 – Gráfico com valores de dosagem de proteína separados por presa esquerda e direita.....	32
Figura 8 – Gráfico com valores de dosagem de proteína referente a machos e fêmeas	33
Figura 9 – Gráfico demonstrando os valores de dosagem de proteína de machos e fêmeas por presa	34
Figura 10 - Imagem de gel de eletroforese de BM1603-01 de presa esquerda e direita e BM1702 machos e BM 1704 presa esquerda e direita e BM 1919 de fêmeas	35
Figura 11 - Imagem de gel de eletroforese de BM1305 de presa esquerda e direita e 1911 machos e BM 1401-10 presa esquerda e direita e BM 1707 de fêmeas.....	35
Figura 12 - Imagens das densitometrias de presa esquerda e direita de BM 1919, BM 1920 e BM 1927	36
Figura 13 – Imagens das densitometrias de presa esquerda e direita de BM 1305, BM 1401-10, BM 1603-01 BM 1610 e BM 1611	37
Figura 14 – Imagens das densitometrias de presa esquerda e direita de BM 1612, BM 1701, BM 1702 BM 1704 e BM 1706	38
Figura 15 – Imagens das densitometrias de presa esquerda e direita de BM 1707, BM 1709, BM 1801, BM 1802 e BM 1911	39
Figura 16 – Imagens comparativas entre perfil densitométrico de machos e suas respectivas presas esquerda e direita, BM 1701 e BM 1612	40
Figura 17 – Imagens comparativas entre perfil densitométrico de machos e suas respectivas presas esquerda e direita, BM 1603-01 e BM 1911	41

Figura 18 – Imagens comparativas entre perfil densitométrico de machos e suas respectivas presas esquerda e direita, BM 1305 e BM 1702	42
Figura 19 – Imagens comparativas entre perfil densitométrico de fêmeas e suas respectivas presas esquerda e direita, BM 1706 e BM 1927	43
Figura 20 – Imagens comparativas entre perfil densitométrico de fêmeas e suas respectivas presas esquerda e direita, BM 1401-10 e BM 1919	44
Figura 21 – Imagens comparativas entre perfil densitométrico de fêmeas e suas respectivas presas esquerda e direita, BM 1709 e BM 1704	45
Figura 22 – Imagens comparativas entre perfil densitométrico do macho BM 1920 e suas respectivas presas esquerda e direita, e fêmea BM 1801 e suas respectivas presas	46
Figura 23 – Gráfico com valores de doses mínimas coagulantes de machos e fêmeas em plasma humano e equino	48
Figura 24 – Comparação de DMC entre machos e fêmeas e presa esquerda e direita	49
Figura 25- Os gráficos demonstram peso do veneno liofilizado de presa esquerda e direita de fêmeas e machos; abaixo o peso líquido de venenos de presa esquerda e direita de fêmeas e machos	52
Figura 26- Gráfico que demonstra o peso total extraído das serpentes para o estudo	53
Figura 27- Gráfico que demonstra diferença entre peso liofilizado entre machos e fêmeas	53
Figura 28- Imagem de zimografia de <i>B. moojeni</i>	55
Figura 29- Imagem de zimografia de <i>B. moojeni</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Informações primárias das serpentes selecionadas para o estudo	23
Tabela 2- Serpentes e seus respectivos valores de dosagem por presa esquerda e direita	32
Tabela 3- Serpentes e seus respectivos valores de dosagem por pool de macho e fêmea	34
Tabela 4- Demonstração de valores das doses mínimas coagulantes entre plasma equino e humano.....	48
Tabela 5- Informações sobre peso líquido e seco de presa esquerda e direita das serpentes.....	51
Tabela 6 – Demonstra uma comparação do veneno secretado e o peso dos indivíduos	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Bothrops moojeni	17
1.2 Os venenos do gênero Bothrops	19
1.3 Os venenos de B. moojeni	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Serpentes	23
3.2 Venenos	24
3.3 Dosagem de proteínas	25
3.4 Eletroforese	26
3.5 Atividade coagulante	28
3.6 Zimografia	29
3.7 Estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Dosagem de proteínas	30
4.2 Eletroforese	34
4.3 Dose mínima coagulante	47
4.4 Diferença entre veneno secretado	49
4.5 Zimografia	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O fascínio pelas serpentes vem desde as antigas civilizações, ao que pode ser observado na arte, ciência e em diversas culturas ao redor do mundo.

No século XVI, VAN HELMONT propôs uma teoria em "Orthus Medicine", onde considerava os venenos de serpente "espíritos irritados" que a besta expelia ao morder, e que eram "tão frios" que congelavam o sangue nas veias e detinham a circulação (BOQUET,1979).

A lista de métodos empíricos que utilizavam víboras ou parte delas é imensa, sendo aplicados como pomadas, cataplasmas, preparações e remédios. O culto à adoração as serpentes persistem até hoje em algumas regiões do mundo (CHEVALIER,1973).

A serpente está, então, no próprio fundamento da medicina. Os químicos estavam entre os primeiros a demonstrar certo interesse nos venenos procurando definir sua composição. Eles submeteram os venenos a ação de reagentes comuns e tentaram extrair seus constituintes tóxicos, observaram que alguns dos reagentes destruíram os venenos enquanto outros causaram precipitação dos componentes tóxicos (BOQUET,1979).

O exame de vítimas de picadas de cobra encorajou os fisiologistas a reproduzirem experimentalmente, para então saber se esses fenômenos eram o resultado de uma alteração de uma ou várias funções, tentavam então dissociar cada sintoma de envenenamento e relacioná-los com a função que foi perturbada.

As várias observações, que foram acumuladas ao longo dos anos, levaram a conclusão geral de que os venenos tinham um efeito sobre o sangue circulante (BOQUET,1979).

No Brasil a referência para o ofidismo é Vital Brazil, médico, pesquisador, educador e herpetólogo. Deixou sua marca não só em número de artigos, mas com o começo das coleções herpetológicas, as descobertas sobre a especificidade única de cada veneno para seu antiveneno e ainda o critério de soros mono e polivalentes, sendo o pioneiro na fabricação dos soros antiofídicos. Que a partir de 1901 já estavam sendo distribuídos pelo Instituto Butantan, onde eram distribuídos em contrapartida as serpentes que eram levadas ao Instituto, dando início a uma nova era de informação e ciência (PUORTO, 2014).

O envenenamento por serpentes foi classificado como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde. Sendo um problema de saúde pública de grande importância pelo alto número de acidentes e pelas sequelas deixadas e o forte impacto socioeconômico (PUORTO,2014; HATAKEYAMA, 2021).

O gênero *Bothrops* é o maior responsável por casos notificados no Brasil com 90% dos acidentes. Este gênero pertence à família Viperidae que são caracterizadas por apresentar, além da fosseta loreal, pupilas verticais (evidenciando uma melhor adaptação a vida noturna); cabeça triangular coberta por pequenas escamas semelhantes à do restante do corpo e dentição solenóglifa (presas tubulares retráteis ligadas à glândula da peçonha) que são projetadas para realizar o ataque a presa.

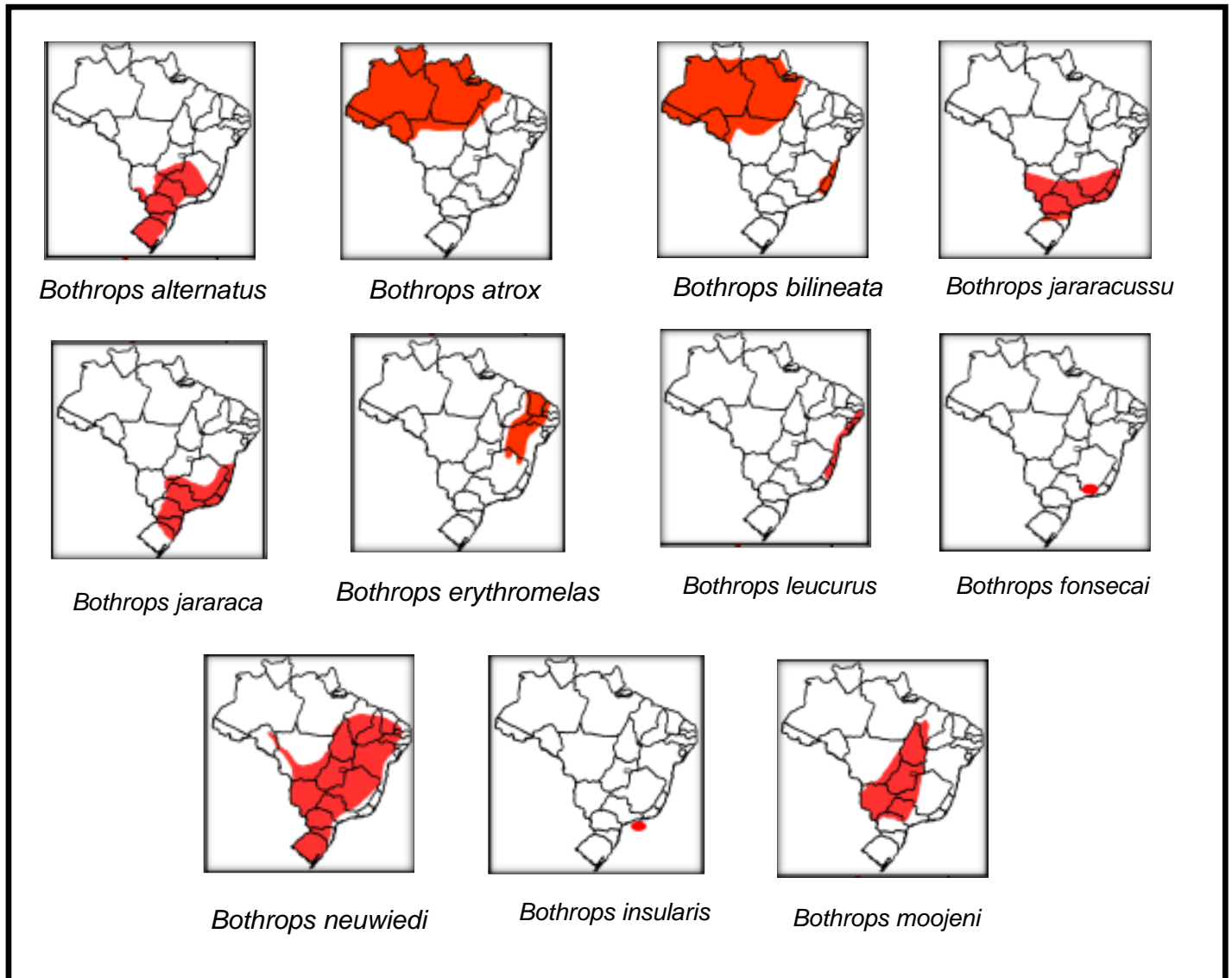
A palavra *Bothrops* possui origem grega (bothros = fosseta; ops = olho ou face), e diz respeito à fosseta loreal localizada entre as narinas e os olhos das serpentes peçonhentas (MACHADO, 2010). Estes pequenos orifícios consistem em um órgão sensorial termorreceptor possibilitando a detecção da presa através da sua temperatura e auxiliando na caça em ambientes escuros (BERNARDE, 2014).

São comumente chamadas de “jararacas” no Brasil e “lanceheads” nos EUA pela forma em lança da cabeça das serpentes que é uma característica bem distinta deste gênero.

No Brasil, as serpentes estão representadas por mais de 400 espécies distribuídas em 10 famílias, sendo que apenas as famílias Elapidae e Viperidae são consideradas de importância médica. A família Viperidae conta, no Brasil, com 31 espécies, sendo 27 do gênero *Bothrops*, duas *Botrocophias*, uma do gênero *Crotalus*, e uma *Lachesis*. (BÉRNILS, 2012).

As serpentes do gênero *Bothrops* são popularmente conhecidas como jararaca, porém pela grande distribuição outros nomes podem surgir como, *B. atrox* Jararaca do norte, Combóia, Cambéua, Cuambóia; *B. moojeni* caiçaca ou jararacão; *B. erythromelas* jararaca-da-seca; *B. jararacussu* jararacuçu; *B. fonsecai* cotiara; *B. neuwiedi* jararaca-pintada; *B. alternatus* urutu-cruzeiro; *B. insularis*: Jararaca ilha; *B. bilineatus* Jararaca verde ou Jararaca-pinta-de-ouro. A figura 1 apresenta a distribuição geográfica no Brasil (MELGAREJO, 2009).

Figura 1 - Distribuição geográfica do gênero *Bothrops* no Brasil.



Fonte: Repositório do Instituto Butantan modificado, 2023.

1.1 *Bothrops moojeni*

Durante a construção de Brasília inúmeros exemplares foram capturados e remetidos ao Instituto Butantan, logo constataram ser uma nova espécie que antes era identificada com *B. atrox*, que hoje ficou restrita a bacia amazônica. Trata-se da principal espécie de *Bothrops* dos cerrados do Brasil, sendo a responsável pelos principais acidentes que ocorrem na região central, tem crescido em importância médica graças a sua capacidade de adaptação aos ambientes antropizados. É uma espécie que ocupa as matas ciliares em todo o domínio morfoclimático do cerrado.

Comumente o bote das serpentes é dado no sentido horizontal com uma distância correspondente a $1/3$ de seu comprimento, *B. moojeni* é capaz de desferir seu bote no sentido vertical, somado ao fato de ser um animal que pode chegar a 1,5 m de comprimento, com isso, seu ataque pode atingir zonas do corpo humano um pouco mais altas que outras serpentes, possui ainda um comportamento agressivo (NOGUEIRA, 2003).

Normalmente fica inativa durante o dia iniciando sua atividade no crepúsculo, em geral durante os primeiros estágios de vida apresenta a ponta da cauda esbranquiçada ou amarela, e também um comportamento de atração caudal, alimentando-se principalmente de pequenos animais ectotérmicos, porém ao longo do desenvolvimento apresentam uma mudança ontogênica em sua dieta, passando a consumir pequenos mamíferos, com isso a ponta de sua cauda muda tornando-se mais escura com a idade (NOGUEIRA, 2003; MELGAREJO, 2009; HATAKEYAMA, 2021).

Figura 2 - Espécie *Bothrops moojeni*.



Fonte: The Reptile Database modificado, 2023.

1.2 Os venenos do gênero *Bothrops*

De modo geral, os venenos ofídicos são uma complexa mistura de substâncias que atuam tanto como um mecanismo de ataque como de defesa, que, resultam em alterações fisiológicas quando inoculados, promovendo o processo de digestão e defesa contra agentes agressores e predadores (RIVERO, 2010; HABERMEHL, 1986; ROCCO *et al.*, 2013).

Serpentes do gênero *Bothrops* possuem um veneno constituído por uma grande variedade de proteínas e peptídeos, dentre eles: fosfolipases, nucleotidases, serinoproteases, metaloproteases e desintegrinas.

As metaloproteases são enzimas proteolíticas de grande abundância e estão envolvidas em diversos processos do envenenamento, como: dermonecrose, hemorragia, edema e degradação de fatores da cascata de coagulação sanguínea (FOX, 2008; OLIVEIRA *et al.* 2010).

As serinoproteases são enzimas que apresentam massa molecular variando entre 26 e 67 kDa e a maioria delas atuam na disfunção do processo hemostático agindo diretamente sobre os fatores da cascata de coagulação e sistema fibrinolítico são encontradas também em microrganismos, plantas e diversos outros animais. (SERRANO, 2005).

As fosfolipases são enzimas que atuam sobre membranas celulares realizando a clivagem de fosfolipídios. O tipo de fosfolipase mais encontrada nos venenos é a do tipo A₂, compreendem enzimas que catalisam a hidrólise de CA⁺ dependente dos fosfolipídios de membranas biológicas e artificiais. Presentes nos venenos, de serpentes e de abelhas podem induzir vários efeitos farmacológicos, como miotoxicidade, cardiotoxicidade, edema, hipotensão, entre outros, mediando respostas patológicas de interesse médico (KUDO, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2008). (VALENTE, 2009). Possuem grande importância na letalidade dos venenos com uma ação intensa na função neuromuscular.

Em geral, o veneno botrópico possui três ações principais: proteolítica, coagulante e hemorrágica. A ação proteolítica é responsável pelo dano tecidual local que decorre das proteases, fosfolipases, hialuronidases e mediadores da resposta inflamatória (BRAGA, 2006; MARTINS *et al.*, 2012). Desencadeiam a ação coagulante, as substâncias que levam ao consumo do fibrinogênio, atuam sobre a trombina-símile, ativação da protrombina (fator II) e fator X, o consumo do

fibrinogênio torna o sangue da vítima incoagulável sem que, necessariamente, haja hemorragia.

A ação hemorrágica ocorre devido à atuação das hemorraginas que provocam lesões nos tecidos e membrana basal dos capilares sanguíneos (LUCIANO, 2009). O veneno também age sobre a aglutinação e agregação plaquetária (MARTINS et al., 2012).

No que se refere aos acidentes ofídicos, um mesmo veneno pode variar de intensidade e agir em diferentes locais do mecanismo hemostático, dependendo da concentração e do tipo de peçonha. A proporção dos componentes da peçonha varia de acordo com o gênero, família e até entre espécies, enquanto a composição pode variar com sexo do animal, idade, distribuição geográfica e hábitos alimentares. No caso das serpentes do gênero *Bothrops*, os venenos de filhotes são principalmente mais coagulantes, enquanto os venenos de adultos possuem maior ação proteolítica e menor ação coagulante (FURTADO, 2006).

1.3 Os venenos de *B. moojeni*

Devido sua relevância médica está inserido no pool antiofídico polivalente produzido pelo instituto Butantan, que é constituído por 50% *B. jararaca*, 12,5% *B. alternatus*, 12,5% *B. jararacussu* 12,5% *B. moojeni* 12,5% e *B. neuwidi*. Seu proteoma foi recentemente sequenciado, e sua composição é principalmente de metaloproteases (SVMP 36,5 a 39,8% serionoproteases (SVSP 14,7 a 19,8%), fosfolipases A2 PLA2 (11,5 a 17,1%) L- aminoácidos oxidases (LAAO) (4,5 a 5,2%) e lectinas do tipo C (CTL) (2,4 a 3,1%) e também outros compostos menos abundantes, como fatores do endotelial vascular, peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP), proteína secretadora rica em cisteína (CRISP) e hialuronidases, que somados representam menos que 15% do total de proteínas do veneno (AGUIAR, 2019).

A Mojenina é uma metaloproteases fibrinolítica encontrada no veneno de *B. moojeni*, uma análise de SDS-Page indicou que esta molécula consiste em uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de cerca de 45 kDa. Apresenta atividade coagulante, e os resultados sugerem que pertencem a classe de metaloproteases onde as pontes de sulfeto são importantes para esta atividade. (DE MORAIS, 2012).

Em vivo tornou o sangue incoagulável, possivelmente pela depleção do fibrinogênio circulante, esses dados corroboram com uma enzima anticoagulante que pode ser utilizada para prevenção de distúrbios hemostáticos no futuro.

O veneno de *B. moojeni* possui uma característica de ativação do plasminogênio, que o converte em plasmina, que é uma enzima fibrinolítica (WHITE, 2005). A Batroxobina é uma serino protease isolada do veneno, tem a capacidade de coagular o fibrinogênio (VU, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Diferenciação da quantidade de veneno, perfil proteolítico e atividade coagulante dos venenos de *Bothrops moojeni* e caracterização sexual, da espécie e perfil por presa esquerda e direita

2.2 Específicos

Avaliar por meio dos experimentos de a) quantificação de proteínas; b) eletroforese; c) zimografia; d) peso líquido e após o processo de liofilização dos venenos, para uma diferenciação por presa esquerda e direita entre machos e fêmeas; e) dose mínima coagulante em plasmas humano e equinos, para diferenciação de machos e fêmeas no tempo de coagulação.

3 METODOLOGIA

3.1 Serpentes

Foram utilizados no presente estudo dezoito indivíduos adultos, onze fêmeas e sete machos, as informações sobre as serpentes selecionadas, estão disponíveis na tabela 1 e figura 3.

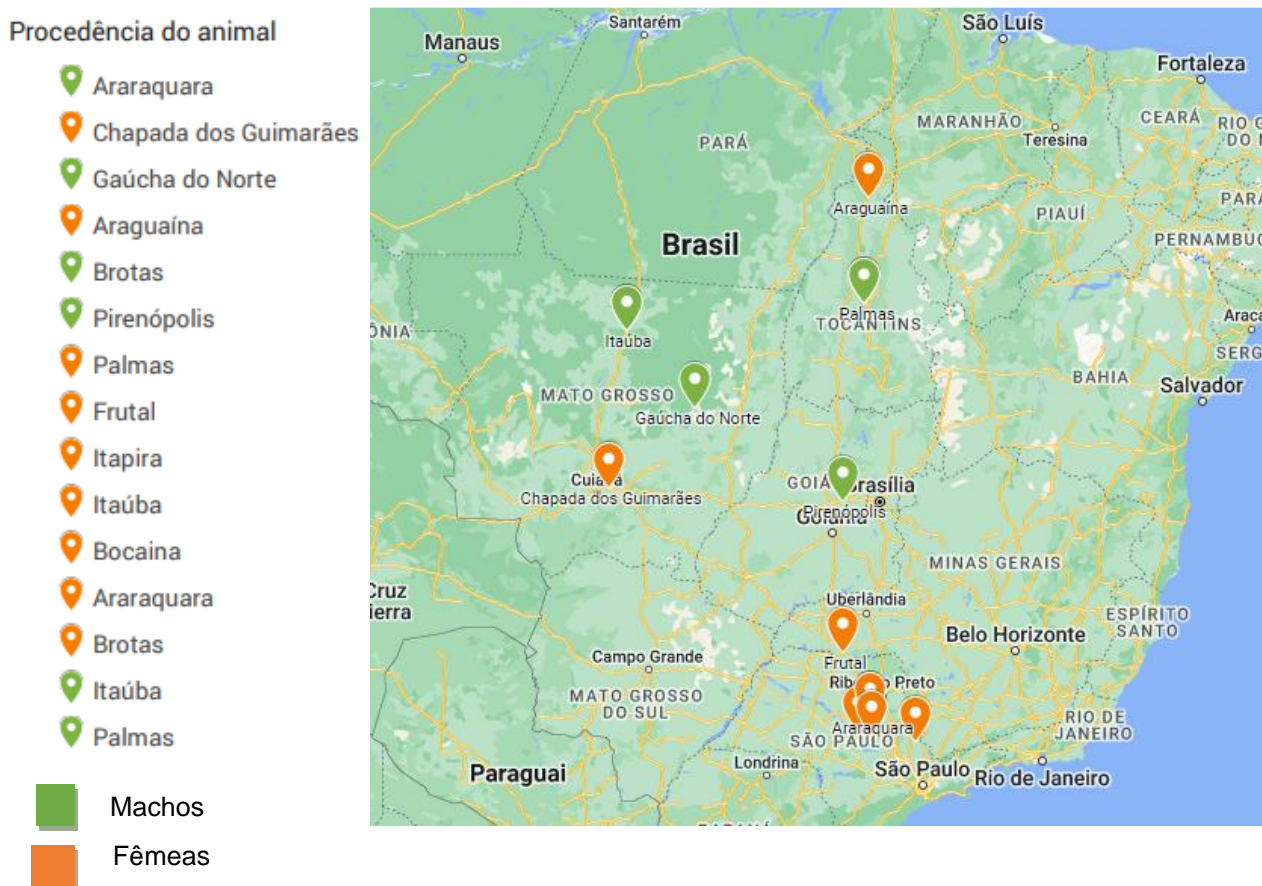
Tabela 1 - Informações primárias referente as serpentes selecionadas para o estudo

Serpente	Número do frasco	Presa	Peso do animal	Sexo	Procedência do animal
BM 1305	7101	esquerda	535g	macho	Araraquara – SP
	7102	direita			
BM 1401-10	7103	esquerda	1330,0g	fêmea	Chapada dos Guimarães - MT
	7104	direita			
BM 1603-01	7105	esquerda	240,0g	macho	Gaúcha do Norte - MT
	7106	direita			
BM 1610	7107	esquerda	475,0g	fêmea	Araguaína - TO
	7108	direita			
BM 1611	7109	esquerda	510,0g	fêmea	Araguaína - TO
	7110	direita			
BM 1612	7111	esquerda	265,0g	macho	Brotas – SP
	7112	direita			
BM 1701	7113	esquerda	290,0g	Macho	Pirenópolis - GO
	7114	direita			
BM 1702	7115	esquerda	250,0g	macho	Palmas – TO
	7116	direita			
BM 1704	7117	esquerda	855,0g	Fêmea	Palmas - TO
	7118	direita			
BM 1706	7119	esquerda	950,0g	fêmea	Frutal – MG
	7120	direita			
BM 1707	7121	esquerda	555,0g	fêmea	Palmas – TO
	7122	direita			
BM 1709	7123	esquerda	985,0g	fêmea	Araraquara – SP
	7124	direita			
BM 1801	7125	esquerda	595,0g	fêmea	Itapira – SP
	7126	direita			
BM 1802	7127	esquerda	455,0g	fêmea	Brotas – SP
	7128	direita			
BM 1911	7129	esquerda	420,0g	macho	Itaúba - MT
	7130	direita			
BM 1919	7131	esquerda	830,0g	fêmea	Itaúba - MT
	7132	Direita			

BM 1920	7133	esquerda	240,0g	macho	Itaúba - MT
	7134	direita			
BM 1927	7135	esquerda	325,0g	fêmea	Bocaína - SP
	7136	Direita			

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 3 - Distribuição geográfica das serpentes selecionados no estudo



Fonte: próprio autor, 2023.

3.2 Venenos

A extração do veneno ocorreu no laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, seguindo todos os protocolos de boas práticas de laboratório. Os venenos são mantidos sempre em banho de gelo reservados em um Becker, que posteriormente será centrifugado para remoção de detritos e liofilizados em seguida para manter a durabilidade, sendo então armazenados em freezer -20°C até o momento da preparação das amostras.

3.3 Dosagem de proteínas

A concentração do teor proteico dos venenos foi realizada, utilizando-se o método descrito por Lowry *et al.* 1951, e modificado por Markwell *et al.* 1978. A albumina bovina foi utilizada para elaboração da curva padrão, utilizando-se diluições seriadas em solução salina 0,85%. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, onde foram pipetados em cada poço, 50 µl das amostras preparados com venenos diluídos em 1:4, 150 µl de solução “C.” após um tempo de incubação de 30 min em local escuro, pipetado 15 µl de solução “B” e por 45 min e local escuro novamente foi deixado em incubação. As absorbâncias foram lidas em leitor de placa (SpectraMax) no comprimento de onda de 660 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteína por mg de veneno seco. Todos os resultados foram considerados em triplicata, e seu valor médio considerado como teor proteico.

Solução A:

20 g	Na ₂ CO ₃ 2%	} Diluir em 1000 ml de H ₂ O destilada
4 g	Na OH 0,4%	
1,6 g	tartarato de sódio 0,1%	
10 g	SDS 1%	

Solução B:

4 g	Cu SO ₄ 5H ₂ O	→ Diluir em 100 ml de H ₂ O Destilada
-----	--------------------------------------	--------------------------------------------------

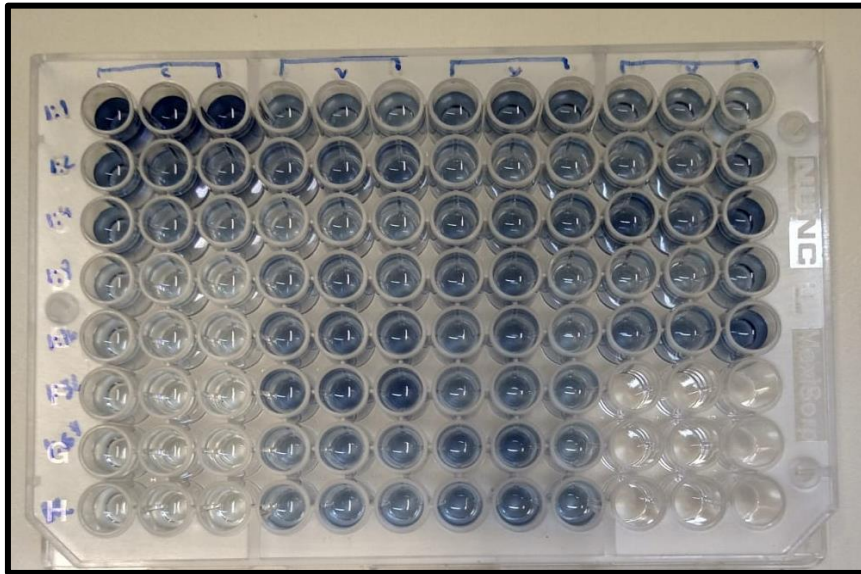
Solução C:

- 1 parte de solução B
- 100 partes de solução A

Solução de Fenol:

- 1 parte de Fenol Folin
- 1 parte de água destilada

Figura 4 - Microplaca 96 poços para quantificação de proteínas



Fonte: próprio autor, 2023.

3.4 Eletroforese

A técnica para separação de proteínas presentes nos venenos foi determinada utilizando a técnica de eletroforese em SDS-PAGE, conforme o método de Laemmli 1970. Um gel foi preparado com o gradiente de 15% para separação e um gel de concentração de 5%. Foi utilizado equipamento da marca Major Science; cuba e placas, e a fonte da marca Pharmacia Biotech; sendo padronizada com voltagem de 200 V e miliampere fixada em 150 mA.

Foram aplicados 20 μg de amostra do veneno, separado pelas presas esquerda e direita e um pool de cada indivíduo (machos e fêmeas, constituído da mistura das duas presas). Com adição de 5 μl de tampão de amostra e 2 μl de β -mercaptoetanol para cada amostra. Além das amostras de veneno, foi aplicado no gel, 7 μl de padrão de massa molecular das marcas Biorad e Jena Bioscience. As amostras passaram por processo de homogeneização e centrifugação, e por fim ficaram 5 min no banho seco.

Após o término da corrida, o gel foi corado com Comassie Brilhante Blue por pelo menos 3 horas ou overnight, logo após submersos em solução descorante.

Análise densitométrica das imagens do gel foram analisadas e semi-quantificadas por densitometria. As análises de mobilidade eletroforética e a quantificação de massa molecular relativa das bandas do gel foram realizadas através do software GEL ANALYZER 2010a®.

Solução corante:

450 ml	Água Destilada
450 ml	Etanol
100 ml	Ácido Acético
5 g/L	Corante Comassie Blue R-250

Solução descorante

70 ml	Ácido Acético	}	Diluir em 1 L de água destilada
100 ml	Etanol		

Tampão de corrida

45,45 g	Tris Base	}	Diluir em 1 L de água destilada
216,15 g	Glicina		
15 g	SDS 10%		

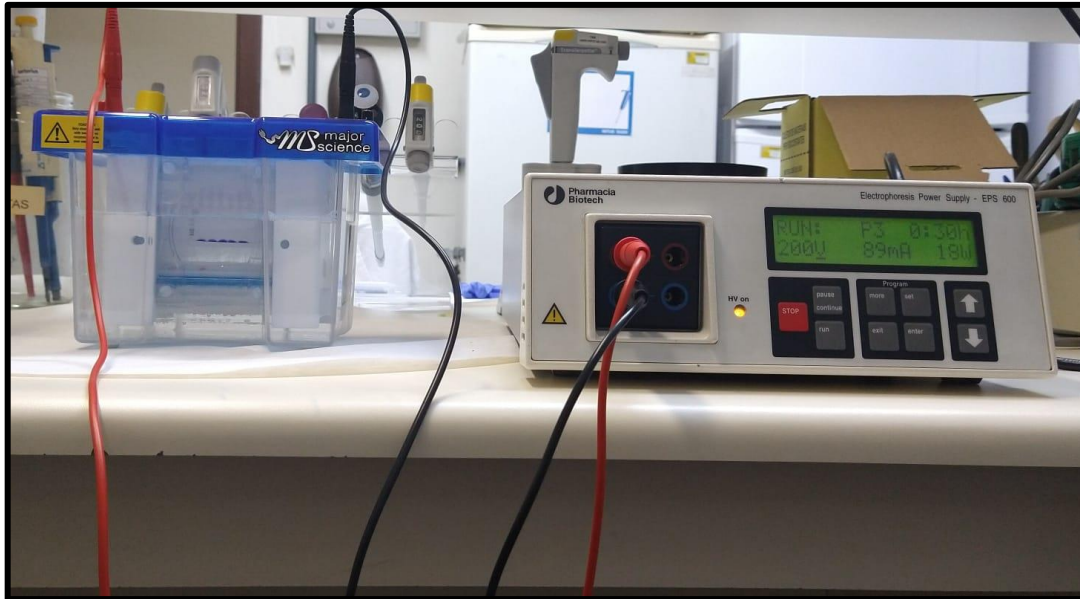
Tampão gel de separação 15%:

12 ml	Acrilamida
9 ml	Tris pH 8.8
2,76 ml	H ₂ O destilada
240 µl	SDS 10%
16 µl	TEMED
64 µl	Persulfato de Amônio

Tampão gel de concentração 5%

835 µl	Acrilamida 30%
625 µl	Tris pH 6.8
3,42 ml	água destilada
50 µl	SDS 10%
4 µl	TEMED
25 µl	Persulfato de Amônio

Figura 5 - Experimento de eletroforese em SDS-PAGE

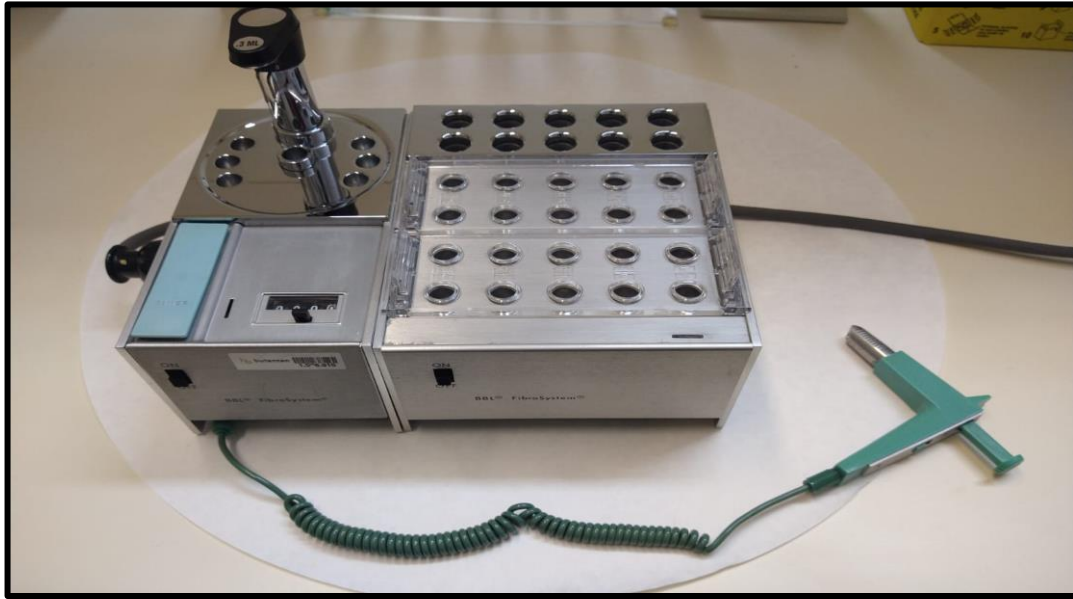


Fonte: próprio autor, 2023.

3.5 Atividade coagulante

O experimento de atividade coagulante é determinado através da dose mínima coagulante sobre o plasma (DMC-P), que corresponde a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução de plasma equino citratado em 60 segundos a 37°C. As amostras dos venenos foram diluídas em salina 0,85%, em concentrações decrescentes (1000 µl, 500 µl, 250 µl, 125 µl, 62,5 µl, 31,2 µl, 15,6 µl, 7,8 µl, 3,9µl). O ensaio consiste em adicionar 100 µl de solução de veneno e 200 µl de plasma citratado, sendo testadas de acordo com o que foi descrito por Theakston & Reid (1983). O tempo de coagulação foi verificado através do fibrômetro BBL® FibroSystem® e os valores da DMC-P obtidos através de análise de regressão linear do “tempo de coagulação” sobre a “quantidade de veneno”.

Figura 6 - Fibrômetro utilizado para realizar teste de coagulação



Fonte: próprio autor, 2023.

3.6 Zimografia

A zimografia dos venenos consiste na detecção das enzimas proteolíticas presentes nos venenos sendo uma técnica realizada conforme Heussen & Dowdle 1980. O gel foi preparado na concentração de 12%, e copolimerizado com 20 μ g de substrato gelatina, e na proporção de 5% para o gel de concentração. A corrida foi realizada de maneira parecida com os procedimentos de eletroforese, porém em amperagem reduzida, no mesmo equipamento da marca Major Science; cuba e placas, e a fonte da marca Pharmacia Biotech; sendo padronizada com voltagem de 100 V, 80 mA e 100 W. Após o término da corrida, o gel foi lavado com tampões específicos (tampão de lavagem I (Tris hidroximetil amino metano, Triton X-100 2,5% e água destilada) por 30 minutos 2x, posteriormente lavado por 10 minutos no tampão de lavagem II (Tris (hidroximetil) amino metano e água destilada)) e por fim incubado por 24 horas a 37°C no tampão de ativação (Tris hidroximetil amino metano 50 mM, Cloreto de Cálcio, Cloreto de Sódio e água destilada). O gel foi corado com Comassie B. Blue e em seguida descorado, até que as áreas de digestão estivessem nítidas.

Tampão I pH 7,5

3,025 g	Tris
500 ml	Água destilada

Tampão II pH 7,5

3,025 g	Tris
12,5 ml	Triton x-100 2,5%
500 ml	Água destilada

Tampão de Ativação pH 7,5

3,025 g	Tris
1,1 g	Na Cl
5,85 g	CaCl ₂
500 ml	Água destilada

3.7 Estatística

Os resultados apresentados nesse estudo representam a média e \pm DP (Desvio Padrão) com intervalo de confiança de 95%. Para a análise de dados desse estudo foi adotado, o teste T de Student método two- tailed, para que pudesse obter a variância dos resultados intraespecífica e intergrupos, utilizando-se o software Prisma 8.0 (Graph Pad) onde os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Dosagem de proteínas

Os resultados obtidos com os teores proteicos das amostras separadas por presa esquerda e direita do veneno tanto de machos quanto de fêmeas, analisadas a partir de método de Markwell et. al. 1978, apresentaram diferença significativamente demonstradas em estatística pelo teste T two- tailed.

Machos presa esquerda $t = 34.55$, $df = 6$; presa direita $t = 23.99$, $df = 6$. Fêmeas presa esquerda $t = 27.19$, $df = 10$; presa direita $t = 36.54$, $df = 10$; valores de diferença significativamente $p \leq 0,05$.

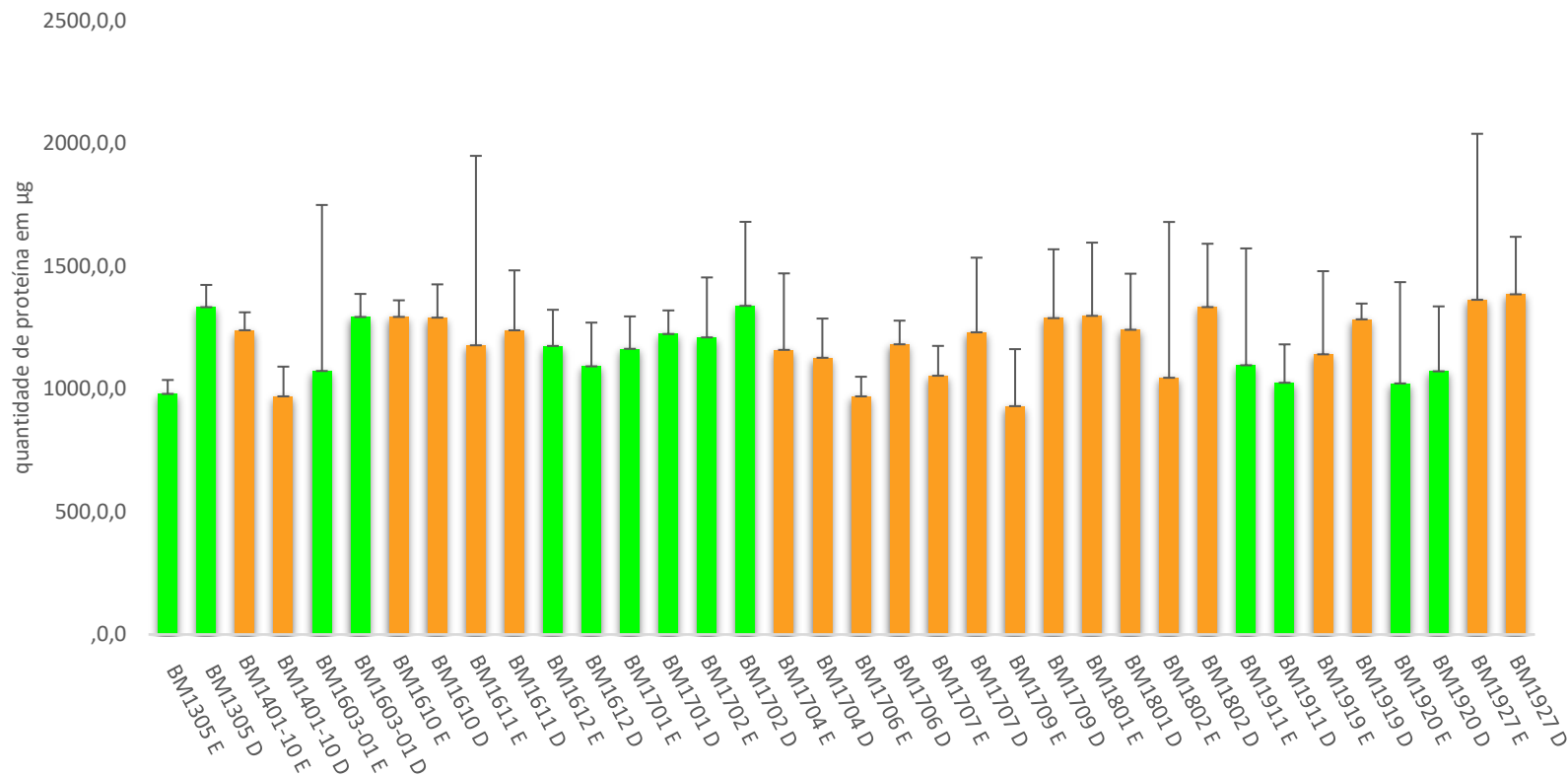
Mantendo-se em um padrão com variação de 931,1 μg a 1.386,7 μg . Ao que pode ser observado na tabela 2, figura 7, para demonstração dos valores das presas esquerda e direita. Foram efetuados testes com os pools, no caso a mistura da presa esquerda e direita, dos venenos de machos e fêmeas onde a variação encontrada foi entre 891,0 μg a 1.305,0 μg , ao pode ser observado com mais detalhes na tabela 3 figura 8.

A figura 9 demonstra os valores totais de ambos os sexos por presa assim constatando um panorama da variação existente.

Para os testes subsequentes adotou-se, para as amostras de venenos, o valor de 1,0 mg proteína/peso seco de veneno. Sabendo que alguns métodos de dosagem de proteínas podem superestimar os valores, foi considerado o conteúdo

SERPENTE	Dosagem
BM1305 E	981,0
BM1305 D	1,334,3
BM1401-10 E	1,240,3
BM1401-10 D	970,9
BM1603-01 E	1,074,3
BM1603-01 D	1,294,3
BM1610 E	1,294,7
BM1610 D	1,291,7
BM1611 E	1,178,9
BM1611 D	1,240,0
BM1612 E	1,176,3
BM1612 D	1,093,3
BM1701 E	1,164,6
BM1701 D	1,225,0
BM1702 E	1,211,1
BM1702 D	1,339,7
BM1704 E	1,160,3
BM1704 D	1,128,0
BM1706 E	970,9
BM1706 D	1,183,0
BM1707 E	1,055,0
BM1707 D	1,231,7
BM1709 E	931,1
BM1709 D	1,289,7
BM1801 E	1,298,9
BM1801 D	1,242,2
BM1802 E	1,046,7
BM1802 D	1,334,7
BM1911 E	1,097,7
BM1911 D	1,026,3
BM1919 E	1,142,2
BM1919 D	1,284,7
BM1920 E	1,023,6
BM1920 D	1,073,1
BM1927 E	1,364,3
BM1927 D	1,386,7

Figura 7 - Gráfico com valores da dosagem de proteínas separadas por presa esquerda e direita



Fonte: próprio autor, 2023.

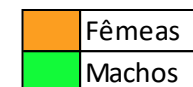
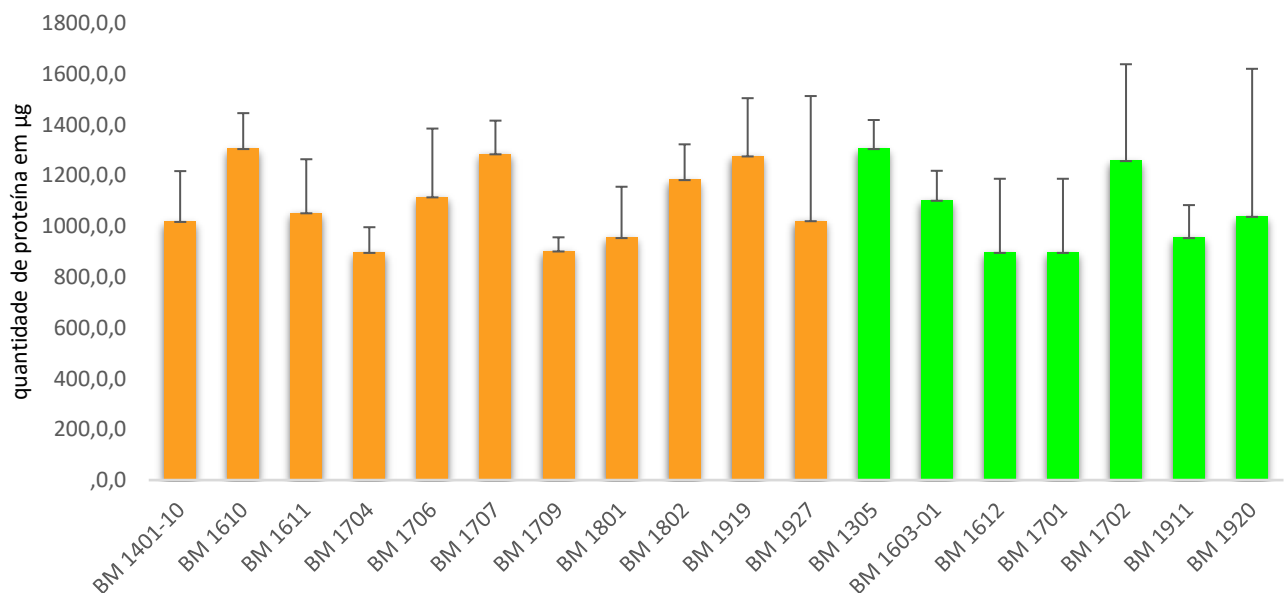


Tabela 3 - Serpentes e seus respectivos valores de dosagem em μg , referente ao pool de machos e fêmeas

SERPENTE	DOSAGEM
BM 1401-10	1,018,0
BM 1610	1,305,0
BM 1611	1,052,0
BM 1704	896,0
BM 1706	1,114,7
BM 1707	1,284,3
BM 1709	901,6
BM 1801	954,3
BM 1802	1,182,7
BM 1919	1,276,0
BM 1927	1,020,9
BM 1305	1,305,0
BM 1603-01	1,101,3
BM 1612	896,0
BM 1701	896,0
BM 1702	1,257,6
BM 1911	954,3
BM 1920	1,038,0

Fonte: próprio autor, 2023.

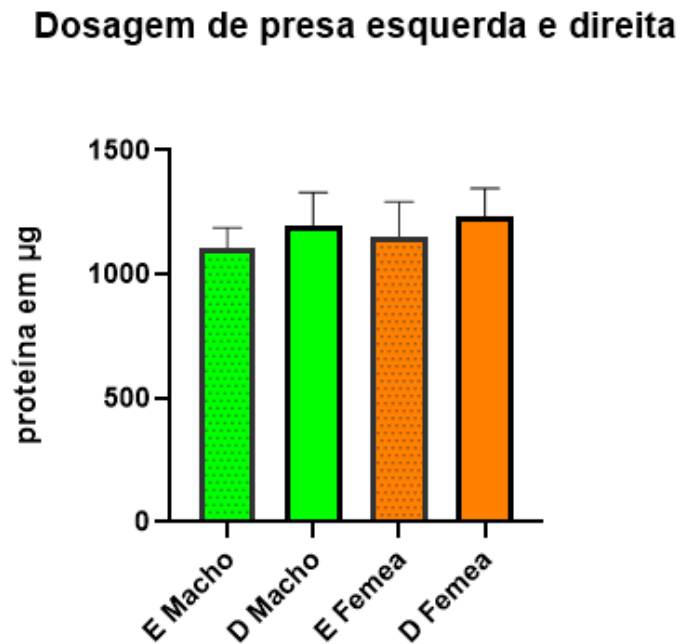
Figura 8 - Gráfico com valores da dosagem de proteínas referente ao pool de machos e fêmeas



Fonte: próprio autor, 2023.

	Fêmeas
	Machos

Figura 9 - Gráfico demonstrando valores de dosagem de machos e fêmeas por presa



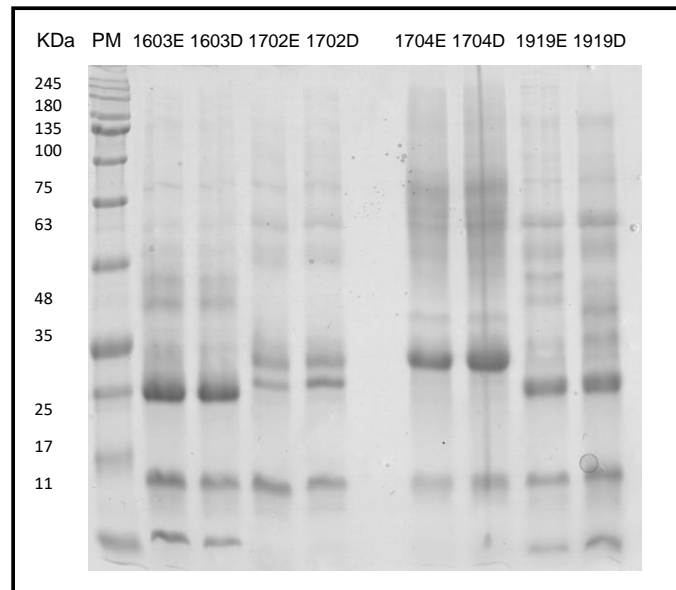
Fonte: próprio autor, 2023.

4.2 Eletroforese

Apesar de semelhantes entre si, os venenos analisados apresentaram diferenças no padrão de bandas obtidas no gel. Os venenos apresentaram bandas majoritárias, bandas minoritárias e bandas exclusivas para cada veneno. Os perfis de migração das proteínas dos venenos foram melhor estudados através de densitometria óptica utilizando o software Gel Analyzer 2010a®, que nos permite uma análise mais detalhada do padrão de migração, além de realizar uma quantificação relativa das bandas de cada amostra. As bandas foram então selecionadas manualmente e quantificadas em relação às demais bandas do gel.

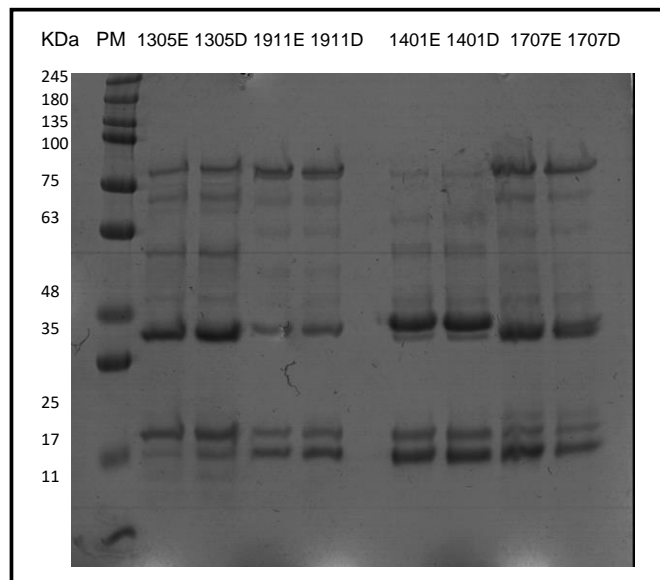
Os perfis de presa esquerda e direita apresentaram diferenças mínimas, as bandas variam entre 5 a 12 entre os géis, com predominância entre as bandas majoritárias entre 30 a 20 kDa. O padrão de bandas em fêmeas é mais nítido que os de machos, nessa faixa. Observa-se que há diferenças entre os padrões de fêmeas e machos e quase não se nota diferenças entre presas esquerda e direita. Contudo todos os indivíduos apresentam uma banda majoritária entre 26 kDa.

Figura 10 - Imagem de gel de eletroforese de BM1603-01 de presa esquerda e direita e BM1702 machos e BM1704 presa esquerda e direita e BM1919 de fêmeas



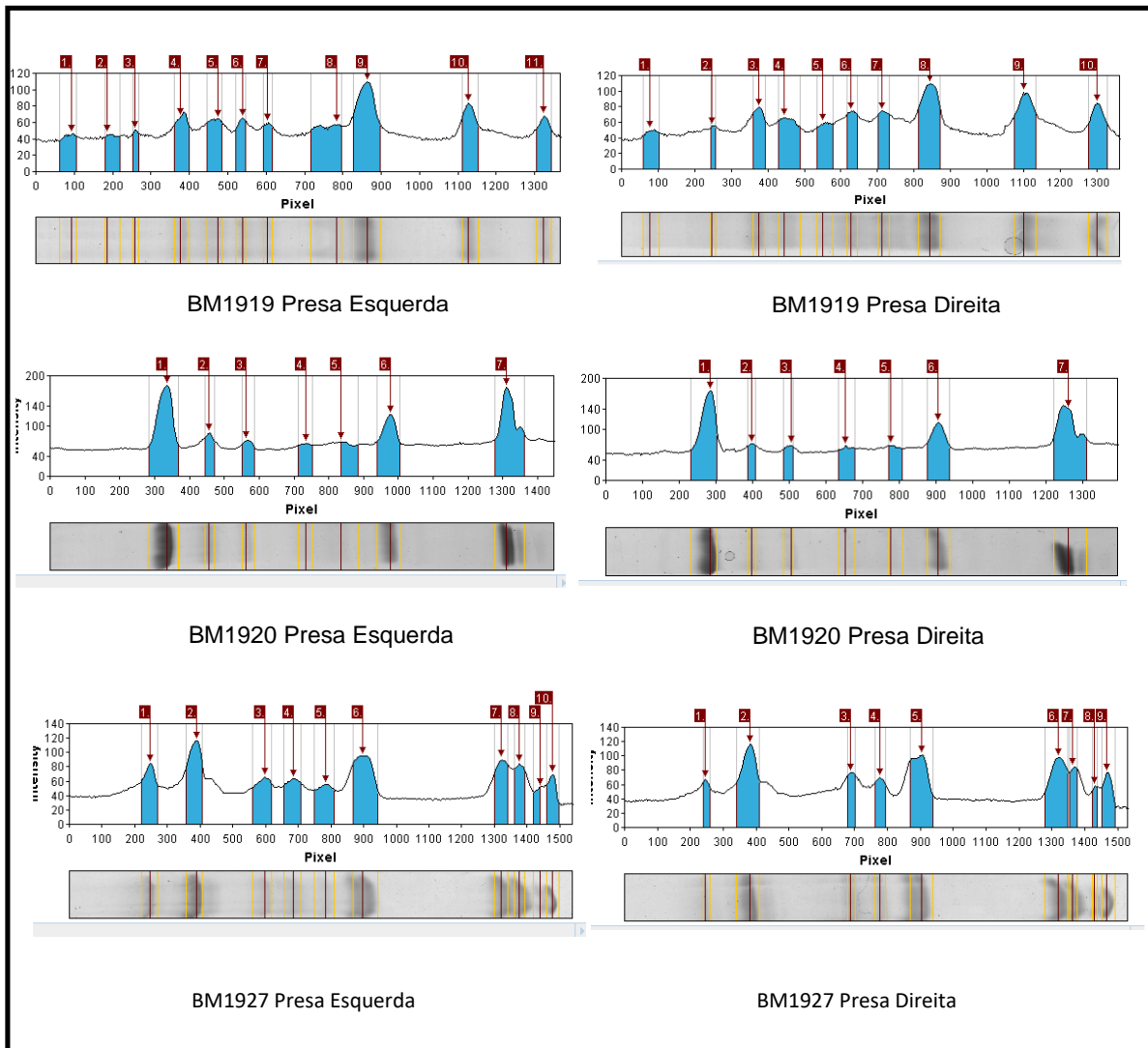
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 11 - Imagem de gel eletroforese de BM1305 de presa esquerda e direita e BM1911 machos e BM1401-10 presa esquerda e direita e BM1707 de fêmeas



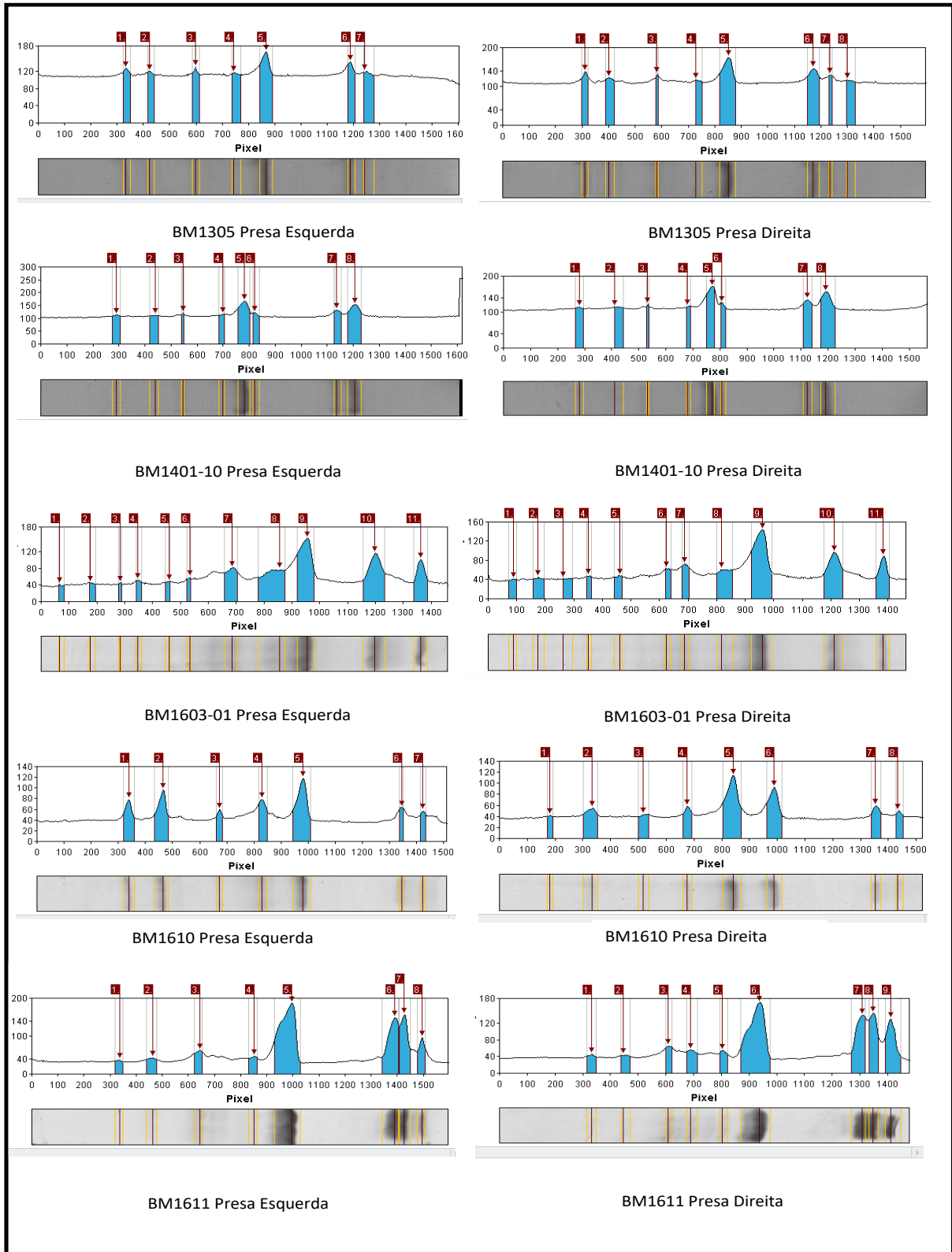
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 12 - Imagens das densitometrias por presa de BM1919, BM 1920 e BM 1927



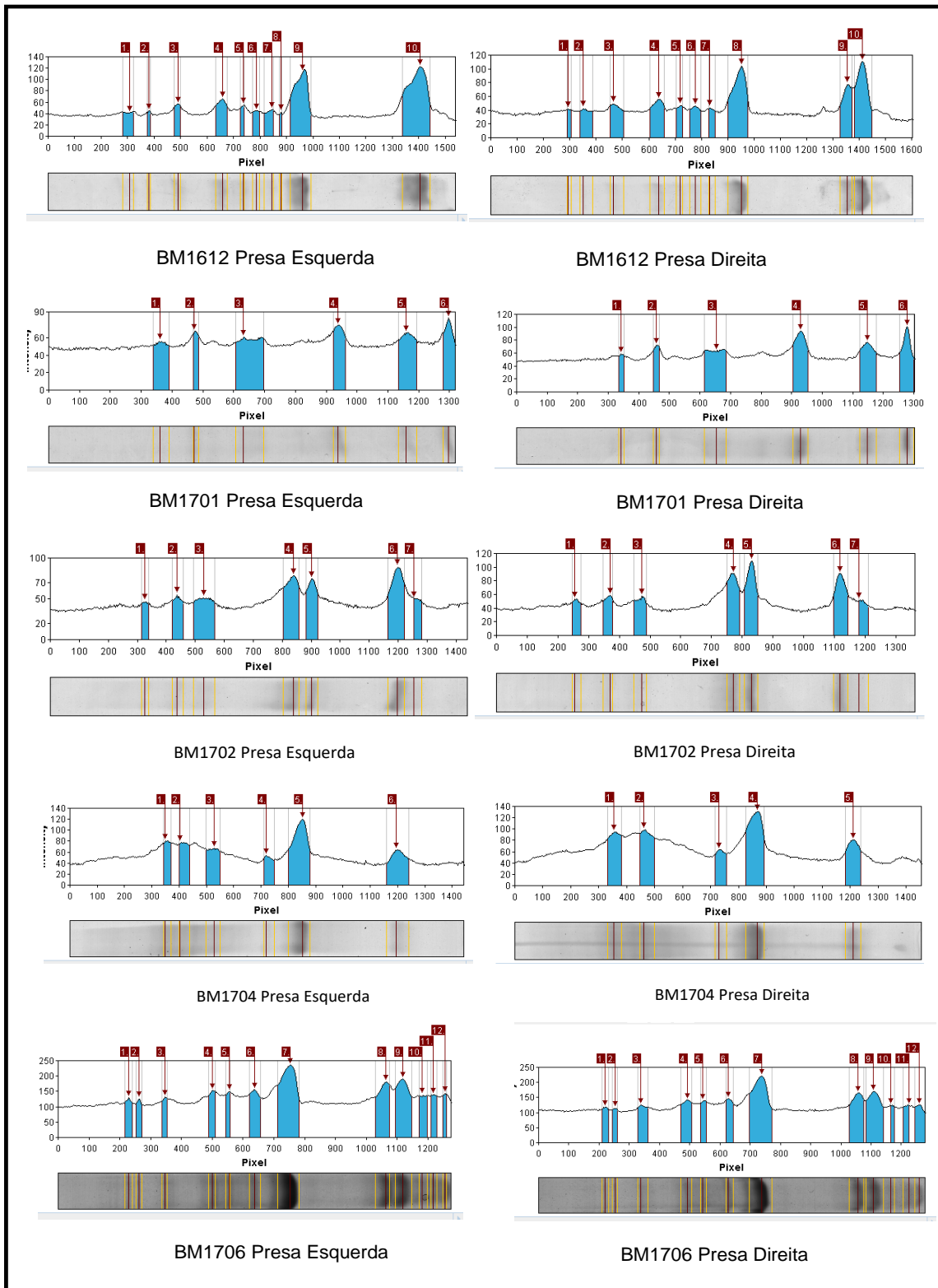
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura13 - Imagens das densitometrias por presa de BM1305, BM1401-10, BM 1603-01, BM 1610 e BM 1611



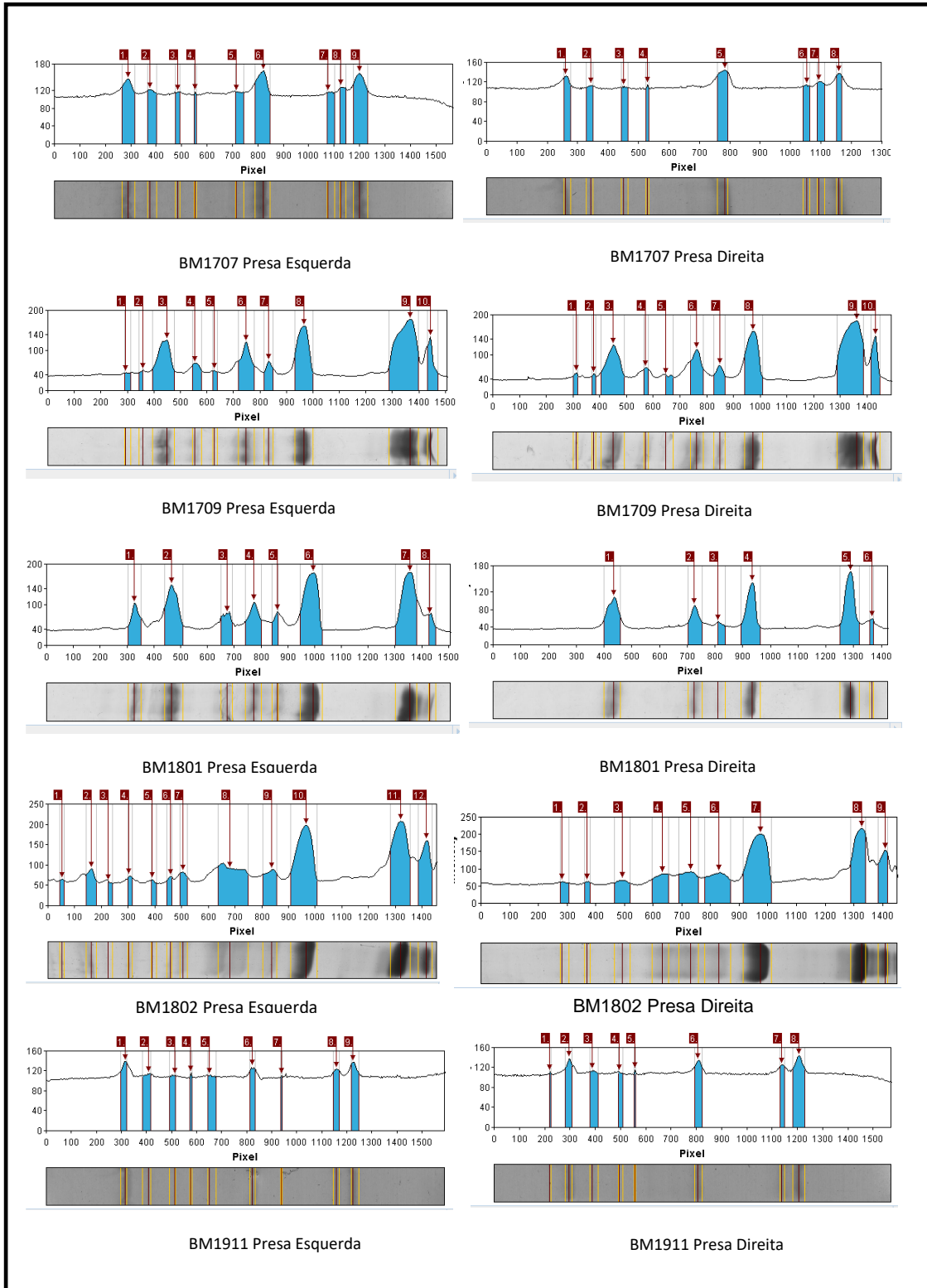
Fonte: próprio autor, 2023

Figura 14 - Imagens das densitometrias por presa de BM1612, BM 1701, BM 1702, BM 1704 e BM 1706



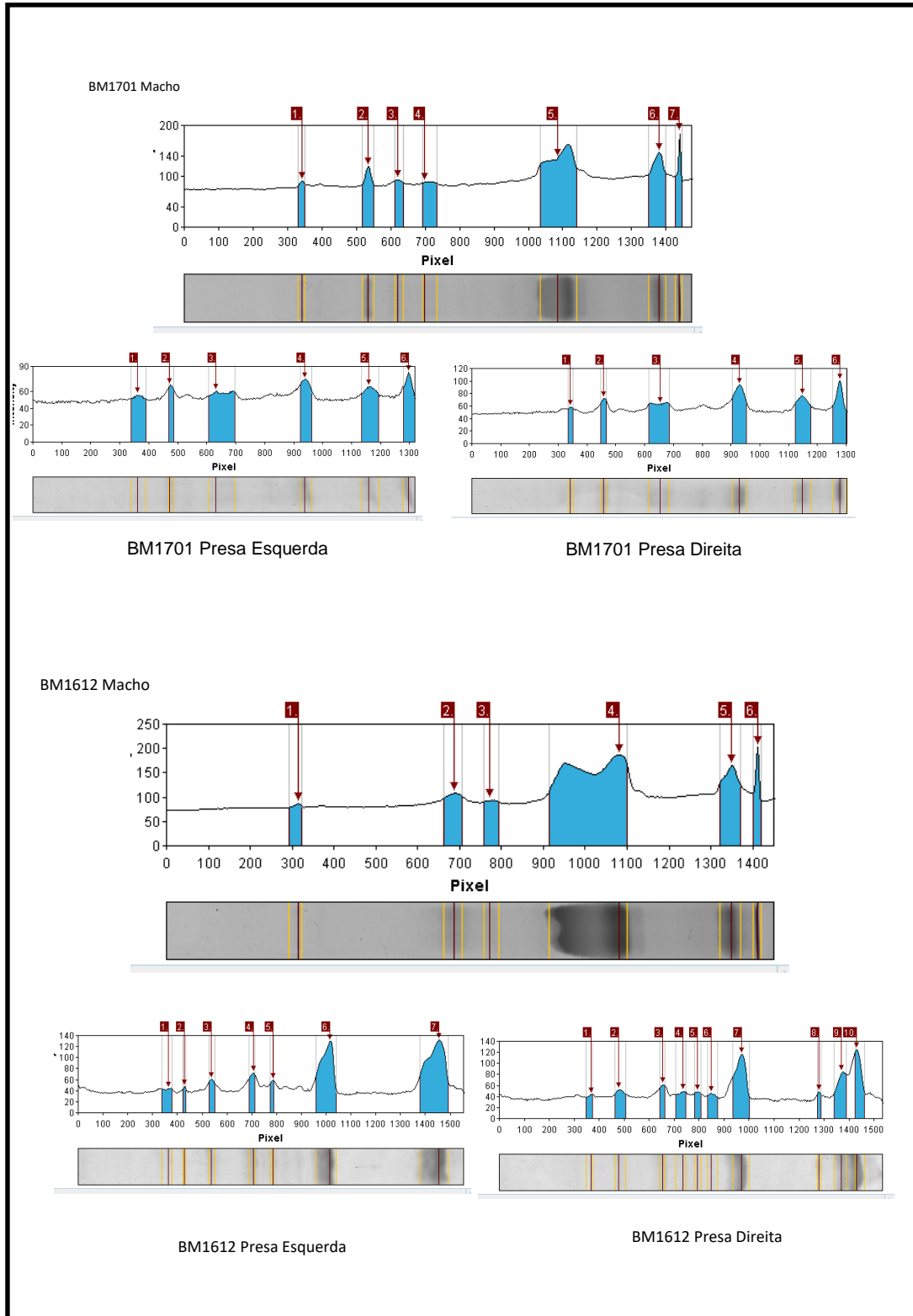
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 15 - Imagens das densitometrias por presa de BM 1707, BM 1709, BM 1801, BM 1802 e BM 1911



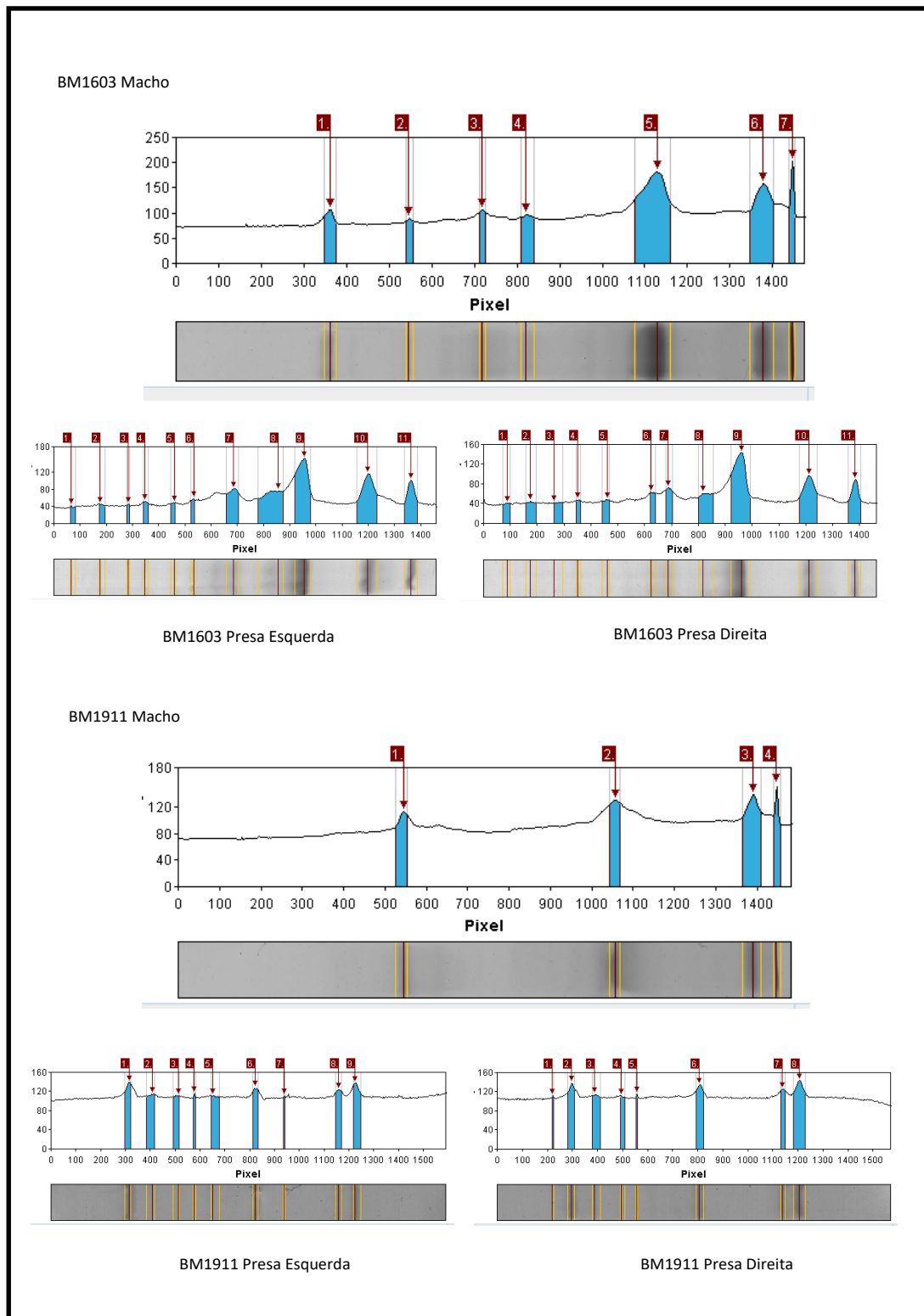
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 16 - Imagens comparativas entre o perfil densitométrico do pool de machos com suas respectivas presas BM 1701 e BM 1612



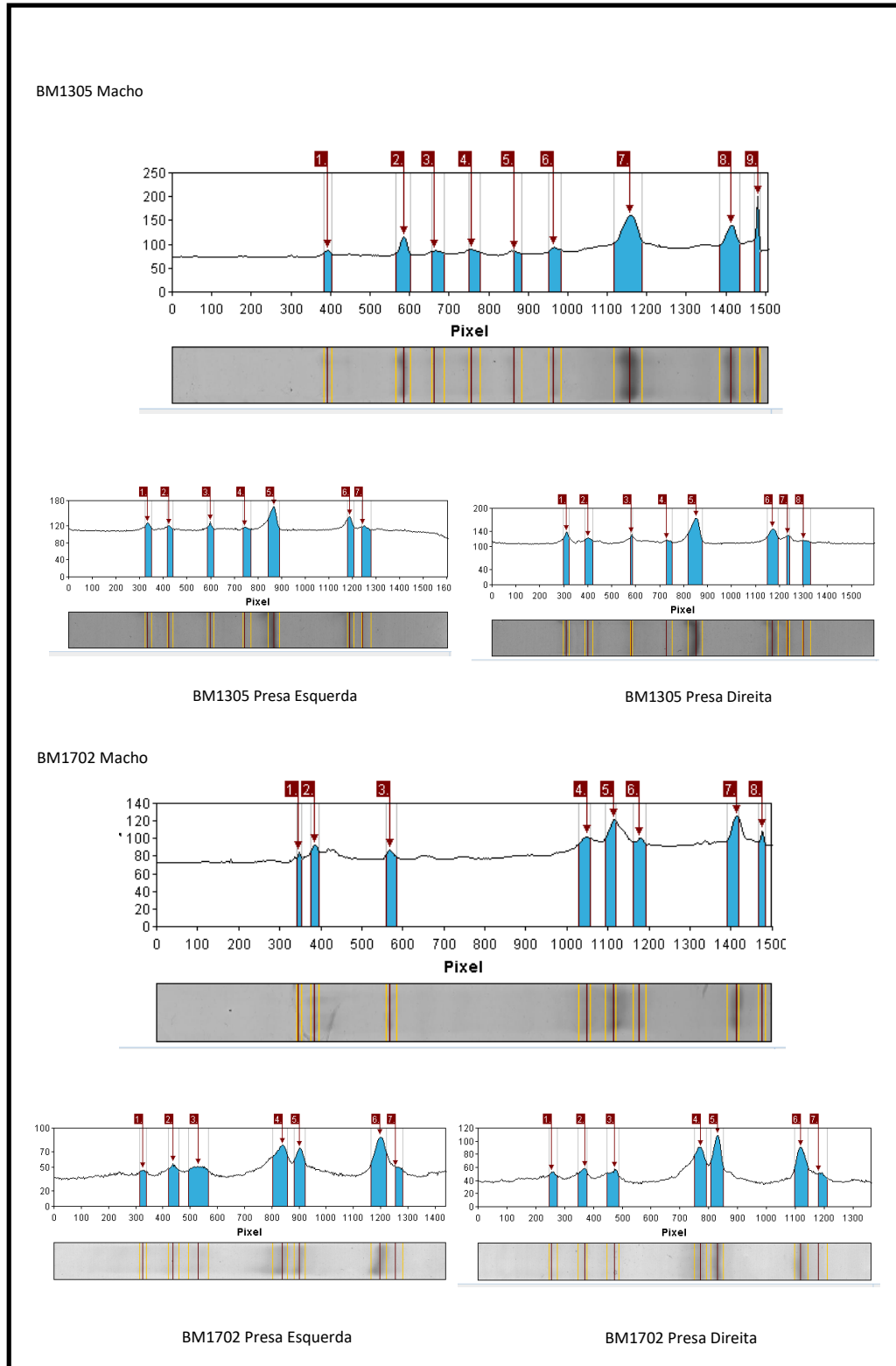
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 17 - Imagens comparativas entre o perfil densitométrico do pool de machos com suas respectivas presas BM 1603-01 e BM 1911



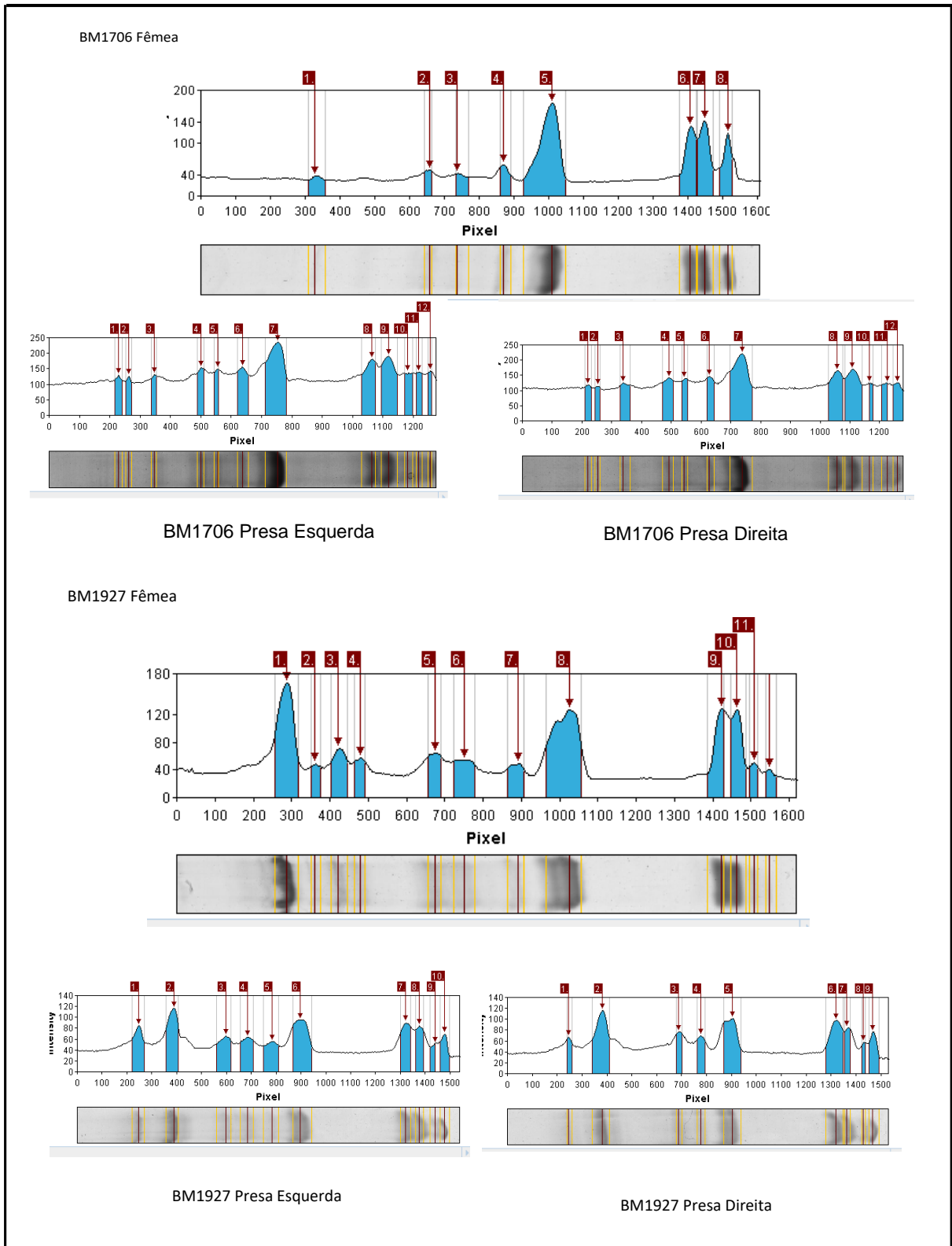
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 18 - Imagens comparativas entre o perfil densitométrico do pool de machos com suas respectivas presas BM 1305 e BM 1702



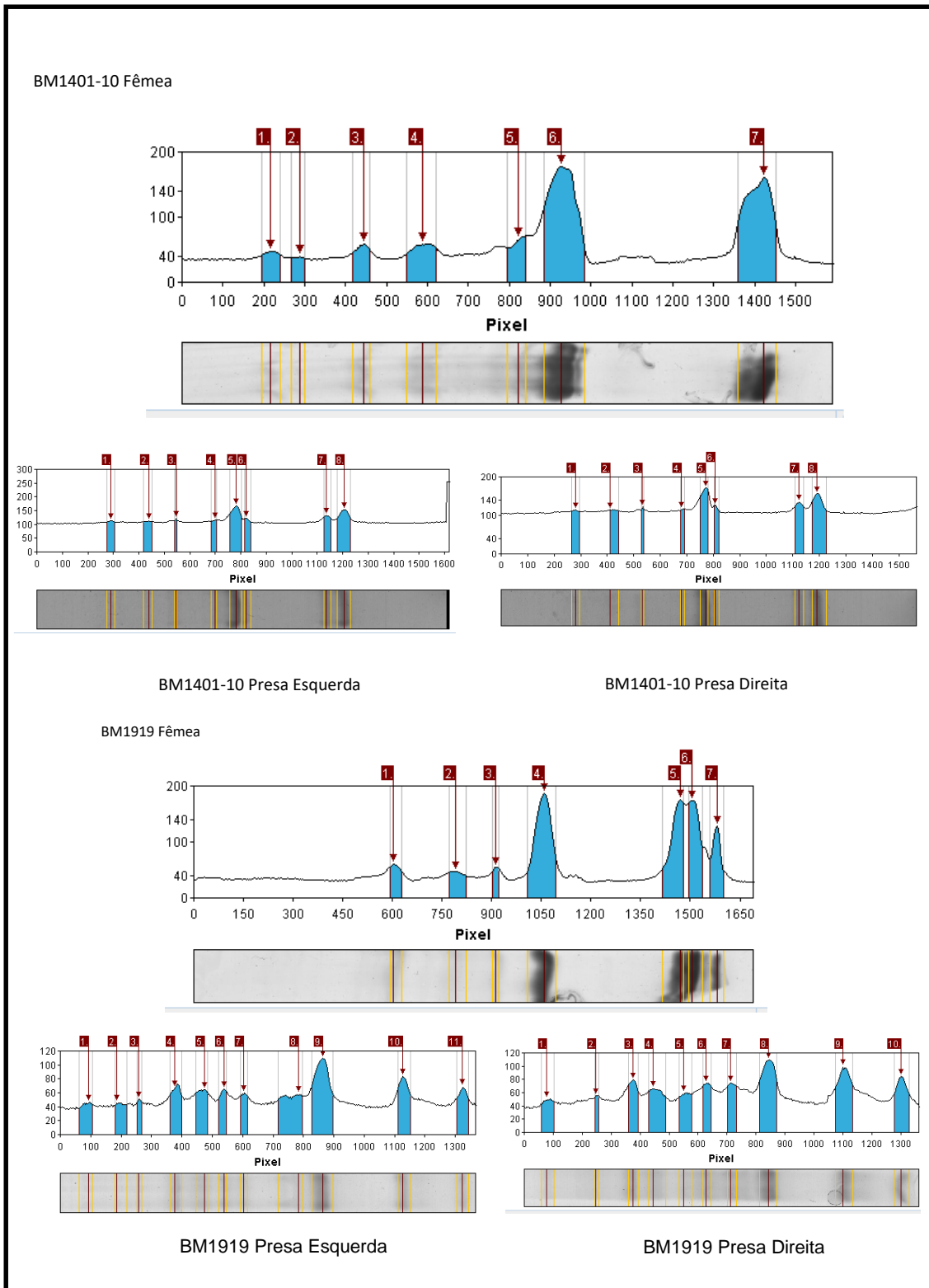
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 19 - Imagens comparativas entre o perfil densitométrico do pool de fêmeas com suas respectivas presas BM 1706 e BM 1927



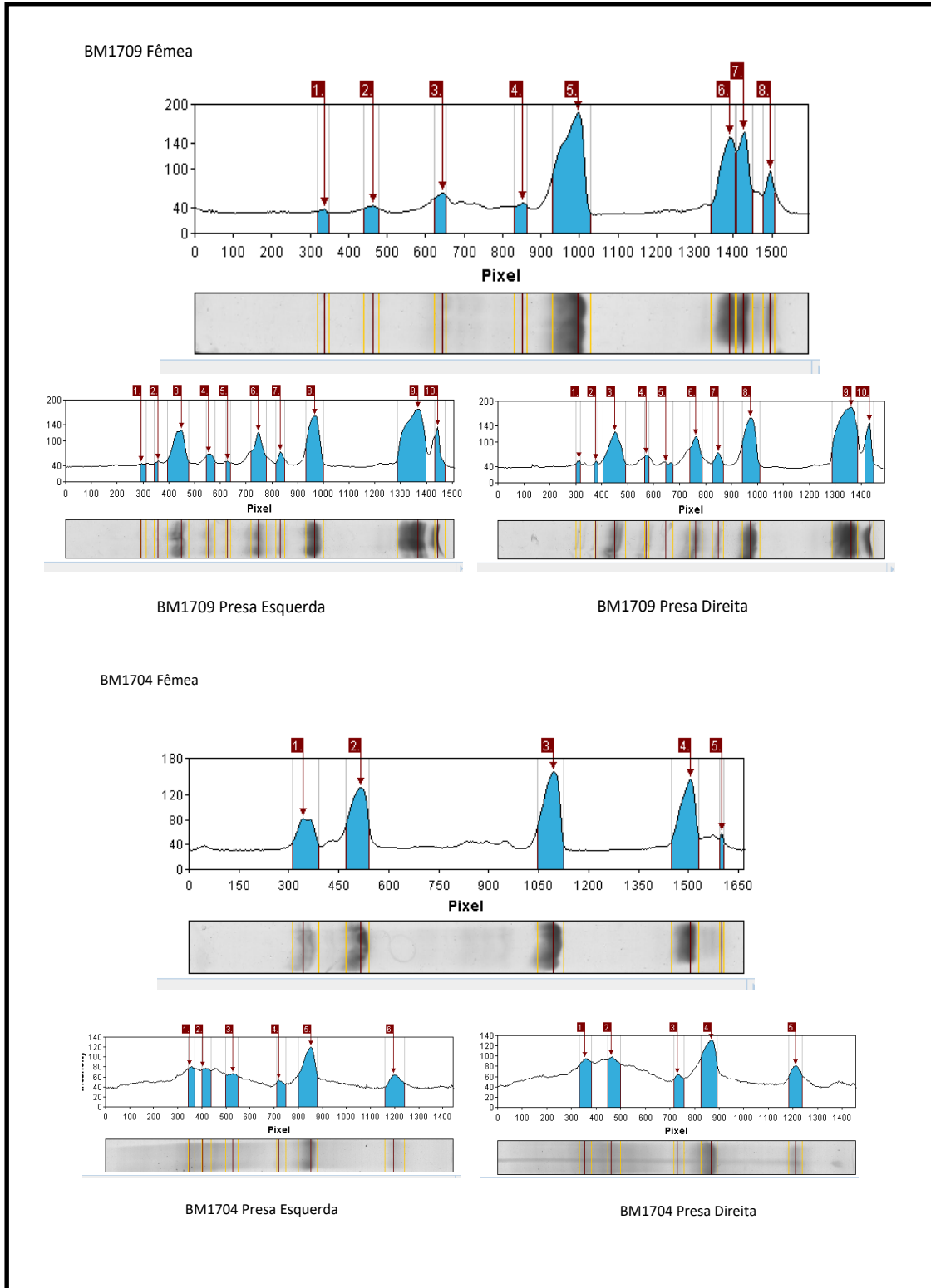
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 20 - Imagens comparativas entre o perfil densitométrico do pool de fêmeas com suas respectivas presas BM 1401-10 e BM 1919



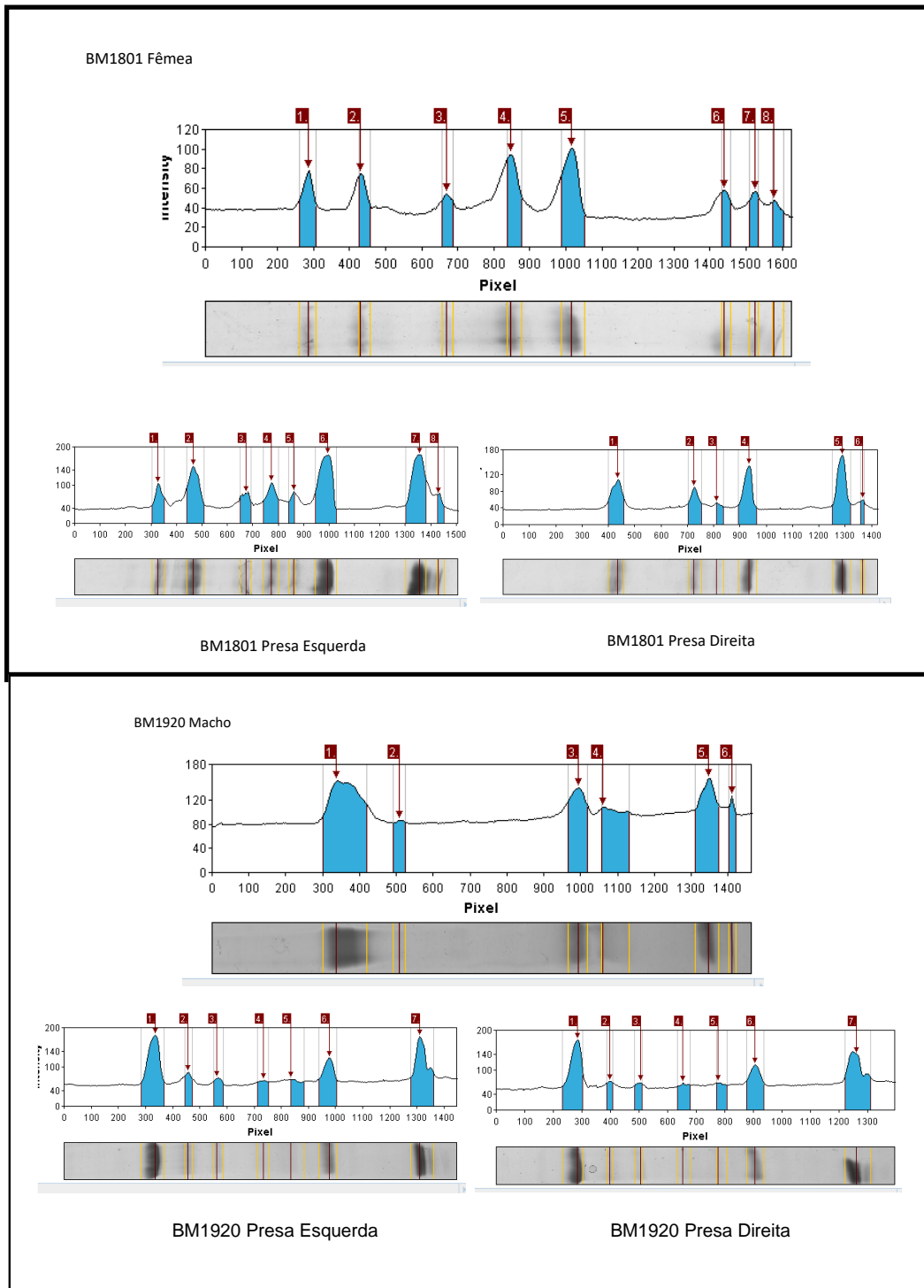
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 21 - Imagens comparativas entre o perfil densitométrico do pool de fêmeas com suas respectivas presas BM 1709 e BM 1704



Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 22 - Imagens comparativas entre o perfil densitométrico do pool de fêmea com suas respectivas presas BM 1801 macho BM 1920



Fonte: próprio autor, 2023.

4.3 Dose mínima coagulante

Os venenos tanto de fêmeas quanto de machos foram capazes de coagular o plasma equino citratado e plasma humano em 60 segundos.

Os resultados obtidos com as amostras de venenos de fêmeas, determinam que para o plasma humano BM 1927 obteve um valor DMC 13,6 µg/ml. BM 1801 teve a menor atividade coagulante de todas as fêmeas testadas em plasma humano, com um valor de DMC de 149,5 µg/ml (tabela 4; figura 21)

BM 1927 foi a fêmea com valor mais significativos de DMC-P 1,7 µg/ml, BM 1401-10 demonstrou ser a fêmea com menor atividade coagulante em plasma equino com um valor de DMC-P 109,7 µg/ml (tabela 4; figura 21).

Todas as amostras de veneno de machos foram mais ativas que as fêmeas, em experimentos com plasma equino BM 1701 é o mais ativo entre os machos com um valor de DMC-P de 1,8 µg/ml; BM1612 possui a menor atividade coagulante com um valor de DMC-P de 12,3 µg/ml.

BM 1305 possui a amostra mais ativa dos machos em plasma humano com um valor de DMC 1,1 µg/ml. BM 1911 possui a menos ativa em plasma humano com um valor de DMC de 10,4 µg/ml. (tabela 4; figura 19).

Analisando estatisticamente os pools de fêmeas e de machos observa-se que as amostras apresentaram valores significativamente diferentes entre si, obtidos através do Teste T two - tailed, plasma humano apresenta diferença entre machos e fêmeas de $48.38 \pm 26.61 < 0.0001$; e plasma equino diferença de $38.73 \pm 14.97 < 0.001$. Nota-se que os venenos de machos são mais ativos tanto em plasma equino quanto em humano. Fêmeas tendem a perder sua atividade coagulante ao passar dos anos . Todos os indivíduos testados apresentam 60% das amostras mais ativas em plasma equino.

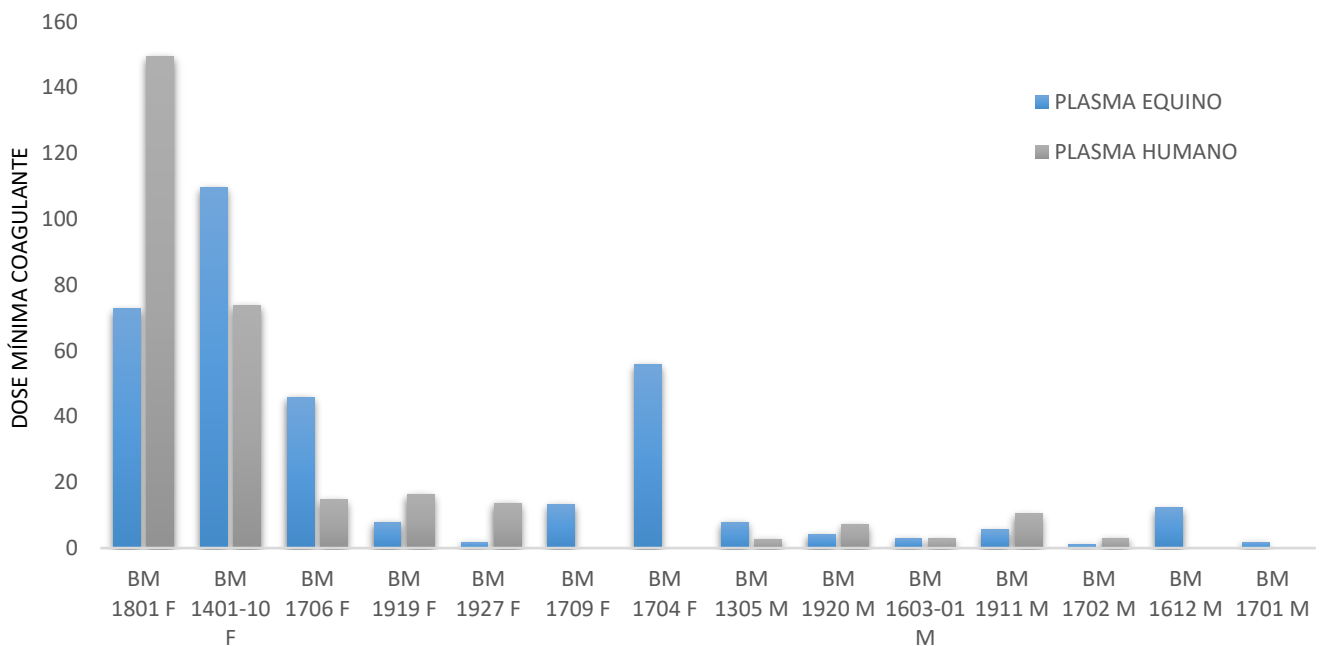
Os indivíduos BM 1709, BM 1704 fêmeas e BM 1612, BM 1701 machos, foram testados somente em plasma equino.

Tabela 4 - Tabela demonstrando os valores das doses mínimas coagulantes das serpentes em plasma humano e equino

SERPENTE	PLASMA EQUINO VALORES DE DMC-P µg/ml	PLASMA HUMANO VALORES DE DMC µg/ml
BM 1801	72,7	149,5
BM 1401-10	109,7	73,8
BM 1706	45,8	14,7
BM 1919	7,9	16,3
BM 1927	1,7	13,6
BM 1709	13,3	0
BM 1704	55,8	0
BM 1305	7,9	2,7
BM 1920	4,2	7,1
BM 1603-01	3	2,8
BM 1911	5,5	10,4
BM 1702	1,1	3
BM 1612	12,3	0
BM 1701	1,8	0

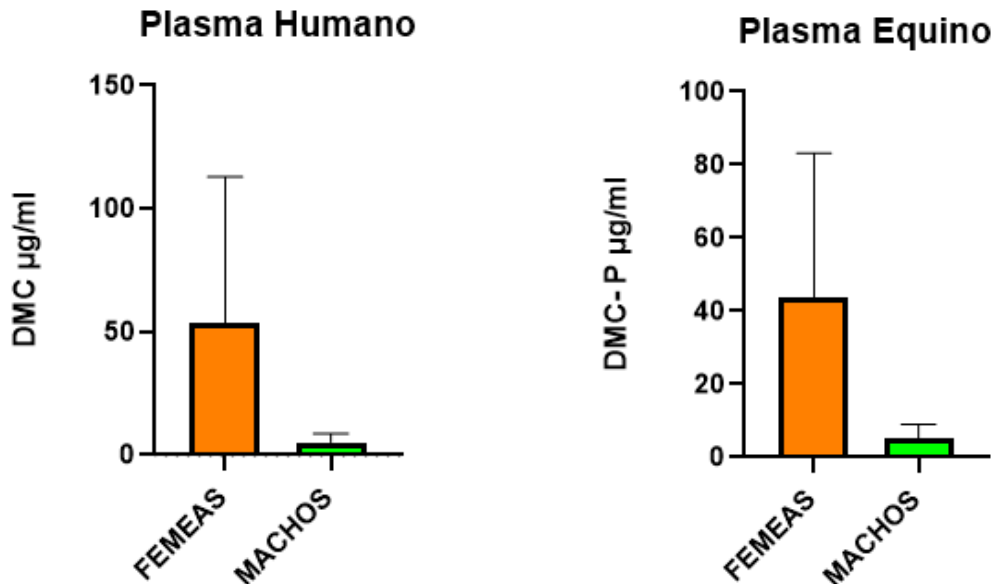
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 23 - Gráfico expressando valores das doses mínimas coagulante de machos e fêmeas e plasma equino e humano.



Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 24 - Comparação de DMC entre machos e fêmeas em plasma humano e equino



Fonte: próprio autor, 2023.

4.4 Diferença entre veneno secretado

Um outro questionamento do estudo era sobre a perda de água do veneno após o processo de liofilização. O processo consiste em desidratar por sublimação, retirando toda a água do veneno, ou seja, ele passa do estado sólido para gasoso, sem passar pelo estado líquido. Com isso as amostras foram pesadas em seu estado líquido e após o processo de liofilização, onde constatou que houve perda de 70% do líquido, após o processo de liofilização, corroborando com achados em artigos anteriores.

Com os mesmos dados obtidos conseguimos ainda perceber que a glândula direita de 13 dos indivíduos do estudo secretava entre 0,5% a 57,3% a mais que a esquerda, contudo não demonstrando esse parâmetro de diferença em testes bioquímicos, ao que pode ser melhor observado na tabela 3.

Houve diferença significativa em comparação as presas, somente os indivíduos BM 1702(macho), BM 1706 (fêmea), BM 1911 (macho) e BM 1919 (fêmea) apresentaram a uma maior quantidade de veneno em presa esquerda. E BM 1702 (macho) não apresentou diferença entre as presas.

De acordo com os resultados dos testes estatísticos, venenos líquidos de machos possuem valores de $t = 7.104$ $df = 6$ para presa esquerda e $t = 5.456$, $df = 6$ em presa direita. Venenos liofilizados presa esquerda $t = 6.402$ $df = 6$, presa direita $t = 6.542$ $df = 6$. Fêmeas possuem para veneno líquido um valor de $t = 7.501$ $df = 10$ em presa esquerda e $t = 7.101$ $df = 10$ em presa direita; veneno liofilizado em presa esquerda $t = 6.054$ $df = 10$, presa direita $t = 6.219$ $df = 10$. Valores significativamente $p \leq 0,05$.

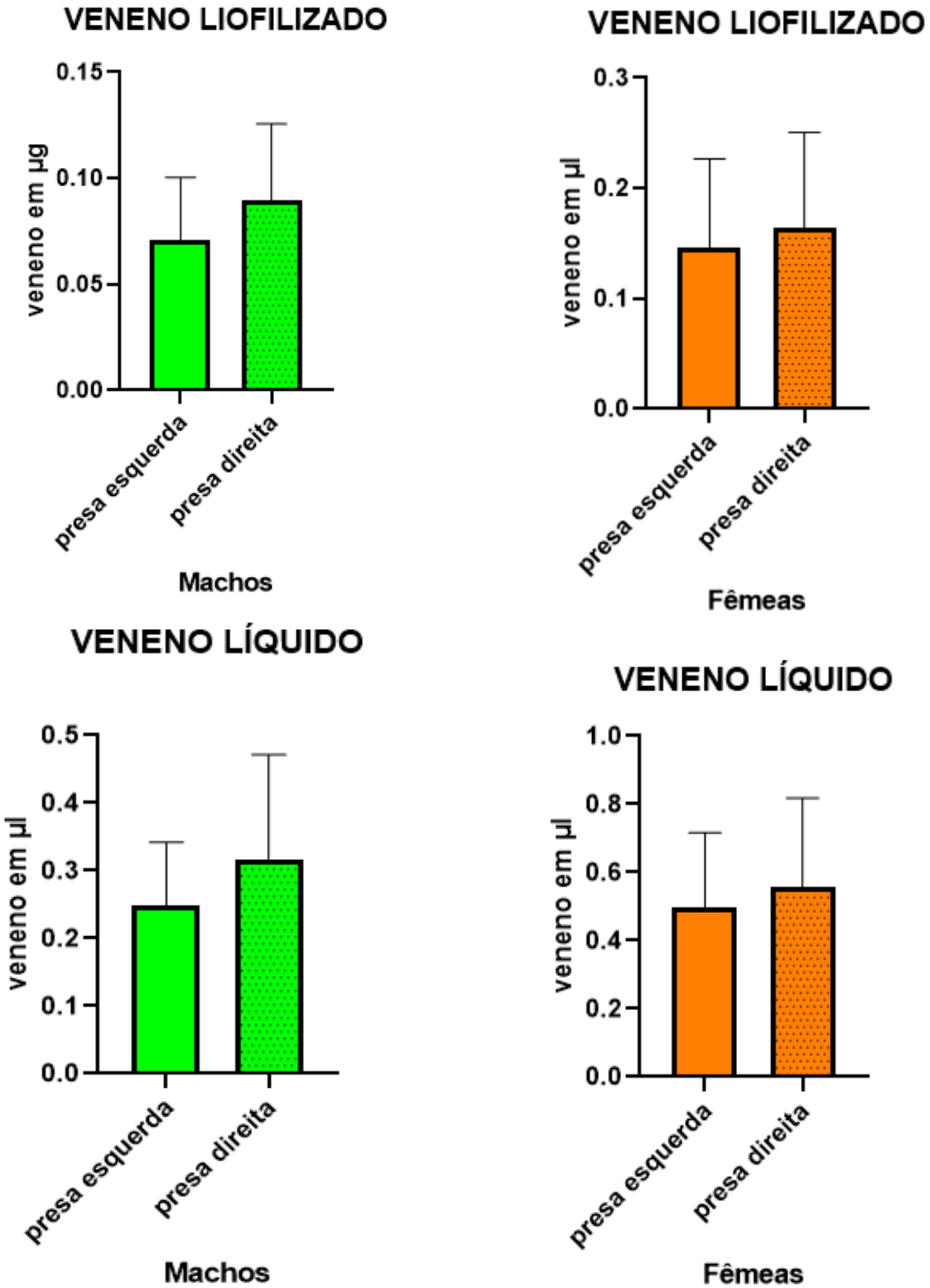
Fêmeas detém a maior quantidade de veneno, podemos levar em consideração que elas possuem maior tamanho de suas glândulas, visto que são maiores que os machos, e no presente estudos estão em desequilíbrio em questão de indivíduos. Na tabela 6 podemos fazer a comparação entre o peso dos animais e seus venenos secretados.

Tabela 5 - Informações sobre peso seco após o processo de liofilização e líquido dos venenos obtidos das presas direita e esquerda das serpentes.

SERPENTE	VENENO LÍQUIDO EM μL	VENENO LIOFILIZADO EM μg	QUANTIDADE DE ÁGUA RETIRADA	PESO SECO EM %	% DE ÁGUA PRESENTE NO VENENO
Bm1305	0,2748	0,0623	0,2125	22,7	77,3
	0,6430	0,1626	0,4804	25,3	74,7
Bm1401-01	0,5124	0,1409	0,3715	27,5	72,5
	1,021,7	0,3415	0,6802	33,4	66,6
Bm1603-01	0,1236	0,0340	0,0896	27,5	72,5
	0,1676	0,0466	0,1210	27,8	72,2
Bm1610	0,8783	0,2798	0,5985	31,9	68,1
	0,9016	0,2367	0,6649	26,3	73,7
Bm1611	0,4258	0,1212	0,3046	28,5	71,5
	0,5219	0,1446	0,3773	27,7	72,3
Bm1612	0,2995	0,0874	0,2121	29,2	70,8
	0,3080	0,0902	0,2178	29,3	70,7
Bm1701	0,2461	0,0871	0,159	35,4	64,6
	0,2299	0,0825	0,1474	35,9	64,1
Bm1702	0,2970	0,0760	0,2210	25,6	74,4
	0,2966	0,0765	0,2201	25,8	74,2
Bm1704	0,8325	0,2831	0,5494	34	66
	0,8370	0,2750	0,562	32,9	67,1
Bm1706	0,5791	0,1682	0,4109	29	71
	0,5643	0,1618	0,4025	28,7	71,3
Bm1707	0,2853	0,0824	0,2029	28,9	71,1
	0,4388	0,1315	0,3073	30	70
Bm1709	0,5651	0,1631	0,4020	28,9	71,1
	0,5725	0,1638	0,4087	28,6	71,4
Bm1801	0,3772	0,0533	0,3239	14,1	85,9
	0,4173	0,0842	0,3331	20,2	79,8
Bm1802	0,3484	0,1099	0,2385	31,5	68,5
	0,3530	0,1101	0,2429	31,2	68,8
Bm1911	0,3752	0,1148	0,2604	30,6	69,4
	0,3323	0,0983	0,234	29,6	70,4
Bm1919	0,5168	0,1697	0,3471	32,8	67,2
	0,2692	0,0864	0,1828	32,1	67,9
Bm1920	0,1285	0,0356	0,0929	27,7	72,3
	0,2445	0,0699	0,1746	28,6	71,4
Bm1927	0,1421	0,0381	0,1040	26,8	73,2
	0,2329	0,0630	0,1699	27,1	72,9

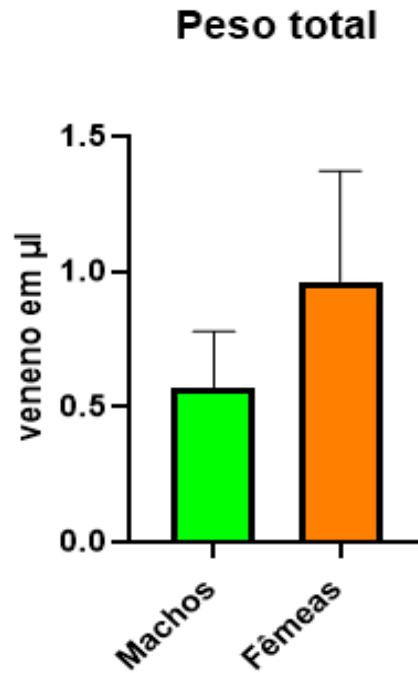
Fonte: próprio autor, 2023

Figura 25 - Os gráficos demonstram peso do veneno liofilizado de presa esquerda e direita de fêmeas e machos; abaixo o peso líquido de venenos de presa esquerda e direita de fêmeas e machos



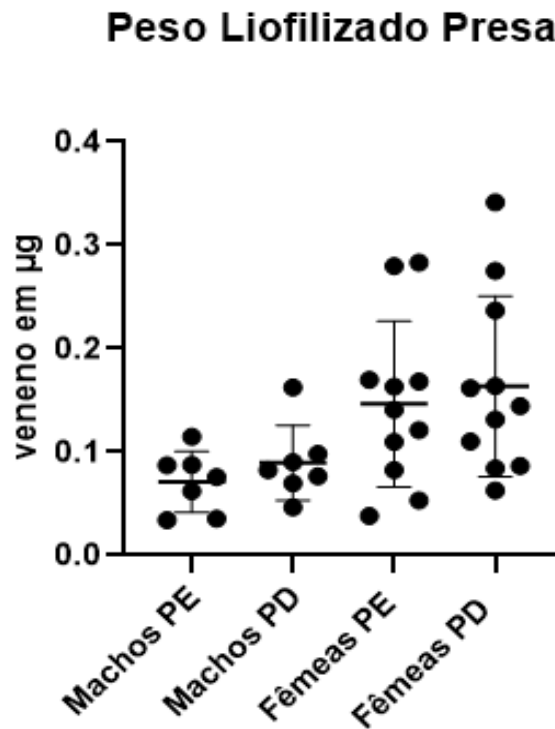
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 26 - Gráfico que demonstra o peso total veneno extraído das serpentes do estudo



Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 27- Gráfico que demonstra a diferença em peso liofilizado entre machos e fêmeas



Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 6 - Demonstra uma comparação do veneno secretado e o peso dos indivíduos

SERPENTE	VENENO LÍQUIDO EM μL	VENENO LIOFILIZADO EM μg	PESO DO ANIMAL
Bm1305	0,9178	0,2249	535,0g
Bm1401-01	1,5341	0,4824	1330,0g
Bm1603-01	0,2912	0,0806	240,0g
Bm1610	1,7799	0,5165	475,0g
Bm1611	0,9477	0,2658	510,0g
Bm1612	0,6075	0,1776	265,0g
Bm1701	0,476	0,1696	290,0g
Bm1702	0,5936	0,1525	250,0g
Bm1704	1,6695	0,5581	855,0g
Bm1706	1,1434	0,33	950,0g
Bm1707	0,7241	0,2139	555,0g
Bm1709	1,1376	0,3269	985,0g
Bm1801	0,7945	0,1375	595,0g
Bm1802	0,7014	0,22	455,0g
Bm1911	0,7075	0,2131	420,0g
Bm1919	0,786	0,2561	830,0g
Bm1920	0,373	0,1055	240,0g
Bm1927	0,375	0,1011	325,0g

Fonte: próprio autor, 2023.

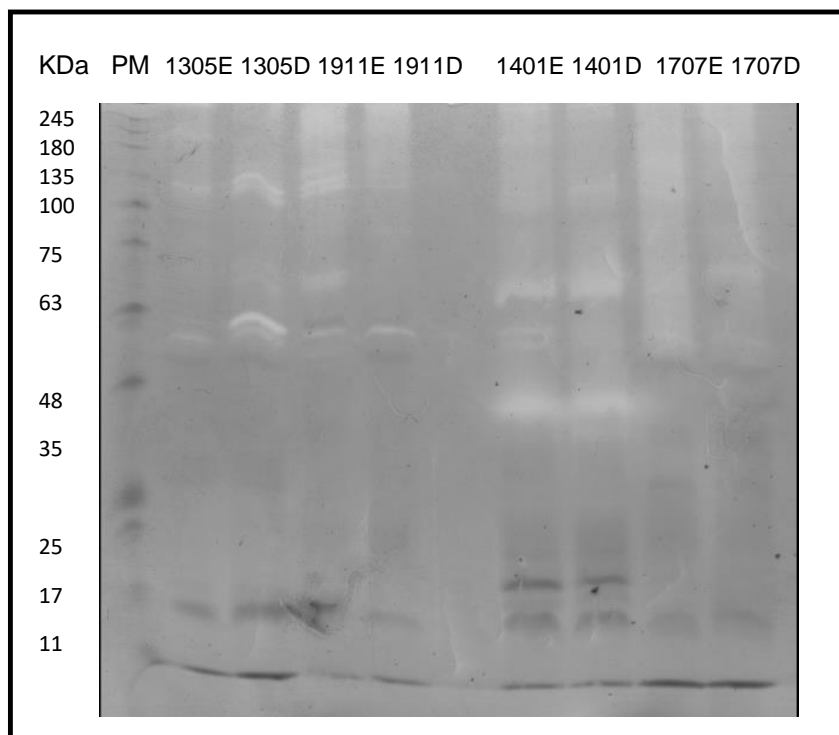
4.5 Zimografia

A técnica de zimografia nos possibilita observar a presença de enzimas proteolíticas sobre um substrato de gelatinas, neste caso os venenos de *B. moojeni*. Machos apresentam ação proteolítica parecida entre si, e entre presa esquerda e direita nas regiões de 90 a 30 em veneno BM 1305, e em BM 1911.

Fêmeas apresentam padrão distinto dos machos, com maior área de digestão das bandas e mais nitidez entre as regiões 36 a 26 de BM 1401-10 em presas esquerda e direita, porém a fêmea BM 1707 possui um padrão diferente e apresenta grande degradação em toda a área de alto peso molecular em suas duas presas. Destaca-se ainda o fato de todas os indivíduos possuírem uma banda de 24 kDa.

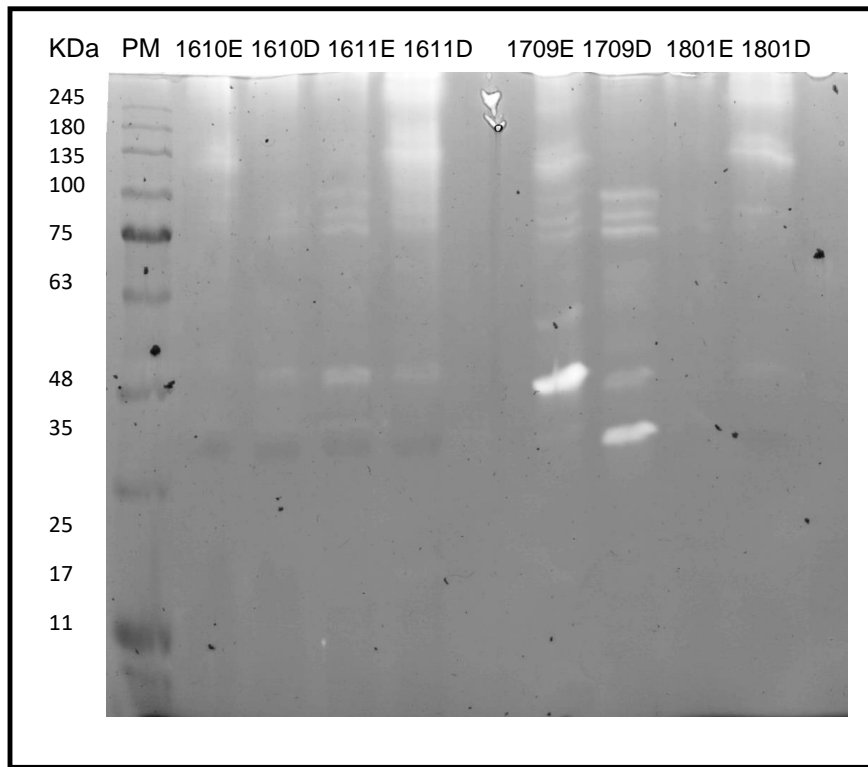
Os indivíduos BM 1610 e BM 1611 apresentam padrões parecidos, porém fêmeas demonstram que sua degradação ficou mais evidente que machos. BM 1709 e BM 1801, entretanto não um padrão de igualdade entre as presas destas. Onde a maior parte de digestão ocorre entre 74 a 23 kDa.

Figura 28- Imagem de zimografia das amostras de *B. moojeni* machos BM 1305 presa esquerda e direita, BM 1911 e fêmeas BM 1401-10 presa esquerda e direita e BM 1707 presa esquerda e direita.



Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 29 - Imagem de zimografia das amostras de *B. moojeni* machos BM 1610 presa esquerda e direita, BM 1611 e fêmeas BM 1709 presa esquerda e direita e BM 1801 presa esquerda e direita.



Fonte: próprio autor, 2023.

5 DISCUSSÃO

A habilidade do veneno de serpentes de incapacitar e interromper os sistemas fisiológicos dos animais é uma de suas características mais marcantes, com algumas espécies possuindo veneno suficiente para incapacitar dezenas de milhares de animais de laboratório. Do ponto de vista humano, essa propriedade do veneno o torna uma fonte de novos compostos biomédicos (CASEWELL, 2020).

Toxinas de serpentes são provavelmente um dos mais complexos de todos os venenos conhecidos e estudados desde o século passado até os dias atuais, é uma característica evolucionária bem-sucedida das espécies com a denticção avançada, essa inovação mudou a forma de captura, desempenhando um papel importante na história desses animais (AGUIAR, 2019).

Os venenos são compostos por aproximadamente 25% de sólidos, dos quais aproximadamente 90% são proteínas. Os teores proteicos apresentados para as amostras de venenos de fêmeas e machos, bem como presa direita e esquerda apresentaram variação significativa, dos valores de proteínas, confirmando os achados da literatura para venenos botrópicos de 1,0 mg proteína/peso de veneno seco, corroborando com os achados de Braga e colaboradores (2022) em seu trabalho com *B. leucurus*.

A eletroforese é uma técnica que possibilita uma grande resolução dos padrões de proteína de venenos, conseqüentemente, permitindo a identificação e separação dos componentes, por meio da aplicação de uma carga elétrica onde há particularidade do gel e as proteínas migram de acordo com sua massa (ORNSTEIN, 1964).

Os perfis eletroforéticos mostraram que os venenos de machos e de fêmeas possuem padrões de bandas que divergem em alguns pontos, contudo em comparação as presas esquerda e direita não possuem diferença entre si. Sendo que as fêmeas apresentam número maior de bandas quando comparados com os venenos de machos.

Estudos revelam que o veneno de *B. moojeni* apresenta alta atividade proteolítica e baixa ação hemorrágica, com níveis altos de PLA₂ e propriedades coagulantes (CAMPOS *et al*, 2013).

Campos e colaboradores (2013), avaliaram a atividade de PLA₂, atividades proteolíticas e LAAO dos venenos das espécies: *B. jararaca*,

B. jararacuçu, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. alternatus*. O veneno de *B. moojeni* apresentou a maior atividade dentre todas as enzimas testadas.

A alta atividade de PLA₂ pode ser explicada pela presença de duas fosfolipases ácidas, a BM-PLA de 19 kDa e 15 kDa.

Tem sido relatado que o veneno de *B. moojeni* contém múltiplas proteínas, incluindo serino proteases e metaloproteases, com massas moleculares variando de 22 a 34 kDa (BERNARDE, 2014; SERRANO, 1993).

Assim como a maioria dos venenos de serpentes de o gênero *Bothrops* podem apresentar diferentes classes de proteínas na região de peso molecular de aproximadamente 24 a 13 kDa, compreendendo as serinoproteases e metaloproteases (SERRANO, 2005)

Estudos indicam ainda que proteínas com massas moleculares entre 46 e 36 kDa possuem seus compostos relacionados a atividade proteolítica e sobre a cascata de coagulação.

Valente e colaboradores (2009) encontraram entre 30 a 20 kDa bandas majoritárias em todas as amostras de *B. insularis*. Neste intervalo de massas, com base na literatura estão contidas além das metaloproteases e serinoproteases, as fosfolipases A₂. Que corroboram aos nossos achados em análises de *B. moojeni*.

Os géis apresentaram um padrão de migração característico para o gênero *Bothrops*, sendo possível identificar quais proteínas estão presentes nos venenos, de acordo com a massa relativa de cada uma das bandas, com base no descrito pela literatura.

Todos os venenos estudados apresentaram uma banda majoritária em aproximadamente 26 kDa, possivelmente se tratando de metaloproteases, que de fato se apresentam em abundância nos venenos botrópicos (FURTADO, 1991).

Os géis de fêmeas possuem uma maior intensidade em algumas de suas bandas, pelo fato de ser um veneno mais proteolítico que o dos machos (FURTADO, 2006).

Esses resultados corroboram com trabalhos que demonstram que mesmo comparando indivíduos da mesma espécie podem existir ausências ou adição de certas proteínas ou componentes do veneno.

Comumente as toxinas dos venenos de viperídeos, sobretudo dos botrópicos, têm como alvo os processos hemostáticos (KAMIGUTI, 1989). Esses venenos apresentam componentes capazes de atuar sobre os diversos fatores de coagulação

sanguínea (MARUYAMA *et al.* 1990). Nos acidentes botrópicos, a alteração no tempo de coagulação sanguínea e o quadro de incoagulabilidade são os sinais clínicos clássicos, devido à ação desses componentes, que em sua maioria são as proteases (GUTIÉRREZ, 2017).

Embora a coagulopatia possa ser importante em humanos, nem sempre é o principal responsável pela morbidade, mas pode atuar sinergicamente com outros efeitos importantes do veneno (WHITE, 2005).

Resultados obtidos para a atividade coagulante das amostras de venenos de *B. moojeni*, evidenciam que fêmeas e machos foram capazes de coagular o plasma equino citratado e plasma humano em 60 segundos. Identificando maior atividade coagulante nos venenos de exemplares juvenis de fêmeas. Braga e colaboradores (2022), relataram que a dose mínima coagulante foi diretamente proporcional a idade de serpentes da espécie *B. leucurus* independente do sexo.

No presente trabalho, somente os venenos de fêmeas apresentaram diminuição da atividade coagulante de acordo com a idade. Fêmeas possuem veneno mais coagulante que os machos, mas esta propriedade tende a ser perdida com o envelhecimento (SILVA, 2017).

Os venenos de machos foram significativamente mais ativos tanto em plasma equino, quanto humano.

O veneno de fêmeas é mais potente para atividades hialuronidásicas, hemorrágicas e letais, enquanto o veneno de machos é mais potente para atividades coagulantes, fosfolipásicas e miotóxicas (FURTADO, 2006).

A maioria dos testes laboratoriais relacionados a atividade pró-coagulante dos venenos são expressos em plasma humano, e interpretados quanto ao envenenamento em humanos. Porém para obtenção e fabricação de soros antiofídicos são aplicados em equinos, que por ser uma animal de grande porte gerar uma grande quantidade de plasma.

Contudo como a peçonha possui uma característica fundamental para fins de captura, havendo assim a diferença nos plasma ao reagir as toxinas do veneno. Realmente as peçonhas das serpentes sofrem inúmeras adaptações em sua composição, com o intuito de tornar a mistura proteica mais bem adaptada para o tipo de presa e ambiente em que estão inseridas (SOUZA *et al.*, 2018).

Souza *et al.* (2018) demonstraram que houve diferença na coagulação de diferentes plasmas, dentre eles humano, de aves e de anfíbios. Mamíferos possuem

uma coagulação sanguínea mais complexa do que outros vertebrados, essa seria uma hipótese para que o plasma dos equinos coagulasse mais depressa. Ou ainda outros fatores externos. E mais estudos devem ser realizados para que se possa comprová-la

Dos testes dos venenos de machos e fêmeas, 60% foram mais ativos em plasma equino.

O presente estudo demonstra que há diferença no veneno produzido por presa esquerda e direita. Podendo esta variar entre 0,5% a 57,3% com uma porcentagem maior pela glândula direita. Contudo é uma área ainda pouco estudada, como muitas das pesquisas são focadas somente na bioquímica ou análise do veneno total.

Braga e colaboradores (2022), investigaram a produção do veneno de *B. leucurus*, porém não encontraram variação significativa entre as presas desta espécie. Constataram que há variação entre 70 a 75% do peso líquido e 25 a 30% do peso sólido, corroborando aos achados em *B. moojeni*.

Fêmeas tendem a se tornar maiores e mais robustas que machos, diferindo em tamanho e formato de cabeça.

Considerando animais saudáveis, e que ambas as presas são funcionais, é possível que na natureza, onde são mais sensíveis a mudanças ambientais e doenças, as serpentes geralmente apresentem diferenças quanto ao veneno expelido por cada presa (DE ROODT, 2016). Como o cativeiro mantém as condições ambientais estáveis e previne o aparecimento de doenças, a variabilidade entre as presas tende a diminuir consideravelmente (DE ROODT, 1998).

Considerando variações relacionadas ao método de extração, a experiência do técnico, a estrutura e tamanho da própria glândula, tais variáveis podem influenciar a produção do veneno, visto que serpentes mantidas em cativeiro por longos períodos também podem ter quantidade e propriedades biológicas da peçonha alteradas (BRAGA, 2021).

A quantidade de veneno obtida fisicamente através de extração manual pode sugerir o máximo a ser injetado em uma picada, mas é improvável que na prática toda esta quantidade seja injetada. A dosagem de veneno é assunto de debate e diversos estudos, entre estimativas de quantidade de veneno injetado e ainda relatos de picadas secas (HAYES, 2008; DE REZENDE, 1998).

A atividade gelatinolítica foi avaliada através da técnica de zimografia em gel de SDS-PAGE, onde podem ser identificadas enzimas que tem a capacidade de digestão do substrato. Os resultados obtidos demonstraram que os venenos de fêmeas e de machos possuem ação proteolítica sobre a gelatina, porém com variação. O pool de venenos de fêmeas apresentou atividade gelatinolítica nas regiões de peso molecular entre 37 e 50 kDa, confirmando o estabelecido por Serrano (1993) para proteínas com ação proteolítica.

Também foi relatado que o veneno de *B. moojeni* contém uma metaloprotease composta por duas cadeias polipeptídicas de 65 kDa e 55 kDa. Esses relatos corroboram com os achados em zimografia em proteinases em torno de 30 kDa (CAMPOS, 2013).

6 CONCLUSÕES

Está bem estabelecido hoje em dia que a composição do veneno de serpentes é influenciada por múltiplos fatores, incluindo filogenia, distribuição geográfica de diferentes populações, idade, sexo e presas ingeridas. No entanto, informações sobre a relação entre sexo e a variação na composição do veneno e ainda o teor de proteínas do veneno por presa esquerda e direita, são escassas ou completamente desconhecidas.

O foco principal de muitos dos estudos desenvolvidos até o momento sempre foi o envenenamento e a bioquímica da mistura dos venenos das duas presas das serpentes, pouco se sabe e se discute sobre a constituição e secreção dos venenos separados das duas glândulas.

O presente estudo demonstra que há diferenças na quantidade secretada do veneno, quando comparadas as presas esquerda e direita. Quanto ao seu peso líquido e liofilizado há diferenças significativas em 72% dos indivíduos. E diferença no teor proteico.

Os achados nos tempos de coagulação, mostraram que em 60% dos indivíduos, os venenos de *B. moojeni* foram capazes de coagular o plasma equino de forma mais rápida que de plasma humano.

Machos apresentam venenos mais ativos sobre a coagulação quando comparados com os venenos de fêmeas.

Nas fêmeas os venenos apresentam uma diminuição da atividade coagulante de acordo com a idade, ao contrário dos machos desse estudo.

REFERÊNCIAS¹

- AGUIAR, Wesley da Silva *et al.* Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 9, 12 set. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0222206>.
- BERNARDE, Paulo Sérgio. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. São Paulo: Anolis Books Editora, 2014. 224 p.
- BÉRNILS, R. S., COSTA, H. C. 2012 Répteis brasileiros: Lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*. **SBH**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 110–279, 2012.
- BOQUET, P. 1979. History of Snake venom Research. **Snake Venom**, ed: Chen-Yuan Lee, New York, 4-13, 1979.
- BRAGA, Jacqueline Ramos Machado *et al.* Epidemiology of accidents involving venomous animals in the State of Ceará, Brazil (2007-2019). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.I.], v. 54, p. 327-345, 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0511-2020>.
- BRAGA, Jacqueline Ramos Machado *et al.* Influence of size, sex and age on venom yield of *Bothrops leucurus* (Serpentes, Viperidae) in captivity conditions. **Basic And Applied Herpetology**, [S.I.], v. 36, p. 31-45, 15 fev. 2022. Asociacion Herpetologica Espanola. <http://dx.doi.org/10.11160/bah.233>.
- BRAGA, M. D. M. 2006. **Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno da *Bothrops insularis* e de frações isoladas**. tese (doutorado em farmacologia) - Universidade Federal do Ceará UFC, Fortaleza, 240 f, 2006.
- CAMPOS, Lucas B. *et al.* In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. **Toxicon**, [S.I.], v. 76, p. 1-10, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.063>.
- CASEWELL, Nicholas R. *et al.* Causes and Consequences of Snake Venom Variation. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.I.], v. 41, n. 8, p. 570-581, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>.
- CHEVALIER, J., CHEERBRANT, A., BERLENI, M. 1973. Dictionnaire des Symboles. **Archives de sciences sociales des religions**, n°37, p. 199, 1973.
- DE MORAIS, N. C. *et al.* 2012. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

FOX, J. W., SERRANO, S. M. T. 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to snake venom complexity. **FEBS J.** 275: 3016-3030, 2008. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x. Epub 2008 May 8. PMID: 18479462.

FURTADO, M.F.D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; ROCHA, M.M.T.. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: viperidae). **Toxicon**, [S.l.], v. 48, n. 4, p. 401-410, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.06.005>.

FURTADO, Ma F.D. *et al.* Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, [S.l.], v. 29, n. 2, p. 219-226, jan. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90106-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(91)90106-2).

GUTIÉRREZ, José María *et al.* Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 327-345, 14 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>.

HABERMEHL, Gerhard G.; KREBS, Hans Chr.. Gifttiere und ihre Waffen. **Naturwissenschaften**, [S.l.], v. 73, n. 8, p. 459-470, ago. 1986. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00367191>.

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. 327-345, 10 jun. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0253050>.

HAYES, K. W. *et al.* 2008. Spitting versus Biting: Differential Venom Gland Contraction Regulates Venom Expenditure in the Black-Necked Spitting Cobra, *Naja nigricollis nigricollis*. **Journal of Herpetology**, 42(3), 453-460, 2008.

HEUSSEN, C. & DOWDLE, E.B. 1980. Eletrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gel containing sodium dodecylsulfate and copolymerized substrate. **Analy. Biochem** 102: 196-202, 1980.

KAMIGUTI, A. S. & CARDOSO, J. L. C. 1989. Hemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon** 27(9): 955-963, 1989.

KUDO, Ichiro; MURAKAMI, Makoto. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [S.l.], v. 68-69, p. 3-58, ago. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0090-6980\(02\)00020-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00020-5).

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685, 1970.

LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275, 1951.

LUCIANO, Paula M.; SILVA, Gyl Eanes Barros; AZEVEDO-MARQUES, Marisa M.. Acidente botrópico fatal. **Medicina (Ribeirão Preto)**, [S.l.], v. 42, n. 1, p. 61-65, 30 mar. 2009. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v42i1p61-65>.

MACHADO, T. 2010. **Filogenia molecular as espécies de *Bohtrops* do grupo *neuwiedi*** (Serpentes, Viperidae) dissertação (mestrado em BioCiência). São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 104 f, 2010.

MARKWELL, M.A.; HASS, S.M.; BIEBER, L.L. and TOLBERT, N.E. 1978. A modification of the Lowry procedures to simplify protein determination im membrane and lipoprotein saples. **Anal. Biochem.** 87:206-210, 1978.

MARTINS, M. 2002. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. **Biology of the Vipers.** p. 307- 328, 2002.

MARUYAMA M. et al. 1990. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). **Thromb Haemost.** 1990;63(3):449-453, 1990. PMID: 2402749.

MELGAREJO A.R., 2009. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD, JR. **ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL.** 2Ed. Sarvier, São Paulo, Brasil, p. 54-59, 2009.

MORAIS, Nadia C.G. de *et al.* Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, [S.L.], v. 60, n. 7, p. 1251-1258, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.017>.

NOGUEIRA, C; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. 2003. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 4, p. 653-659. 2003.

OLIVEIRA, F. N. et al. 2010. Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 43, n. 6, p. 662- 667. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000600012>

ORNSTEIN L. 1964. DISC ELECTROPHORESIS. I. BACKGROUND AND THEORY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 121, 321–349, 1964.

PUORTO, G. 2014. Contribuição de Vital Brazil para a Herpetologia. **Cadernos De História Da Ciência**, 10(1), 169–174, 2014.

QUEIROZ, G. P. et al. 2008. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon.** v. 52, n. 8, p. 842-851, 2008.

RIVERO, J. V. R. 2010. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu* em células mononucleares do sangue periférico** dissertação (mestrado em ciências ambientais e saúde) Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2010.

REZENDE, Nilton Alves de *et al.* South American rattlesnake bite (*Crotalus durissus* sp) without envenoming: insights on diagnosis and treatment. **Toxicon**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 2029-2032, dez. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(98\)00112-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(98)00112-3).

ROCCO, D. M., *et al.* 2013. Caracterización tóxica del veneno de *Bothrops (Rhinocerophis) alternatus* de diferentes regiones de La provincia de Córdoba (Argentina). **Revista Facultad de Ciencias Medicas de Cordoba** 70(1): 7-13, 2013.

ROODT, Adolfo R de *et al.* A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. **Toxicon**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 1949-1957, dez. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(98\)00119-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(98)00119-6).

ROODT, Adolfo Rafael de *et al.* Venom yield and its relationship with body size and fang separation of pit vipers from Argentina. **Toxicon**, [S.L.], v. 121, p. 22-29, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.013>.

SERRANO, Solange M.T.; MAROUN, Rachid C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, [S.L.], v. 45, n. 8, p. 1115-1132, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>.

SERRANO, Solange M.T. *et al.* Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom—I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 471-481, abr. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90182-i](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(93)90182-i).

SILVA, DPD, 2017. **Análise comparativa da composição proteica e dos efeitos hemolítico, oxidante, antioxidante e coagulante das peçonhas brutas de machos e fêmeas da serpente *Bothrops leucurus***. Dissertação (mestrado em biologia celular e molecular) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017. <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/9389>.

SOUSA, L. F., *et al.* 2018. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. **Toxins**, 10(10), 411, 2018.

THEAKSTON, R. D., Reid, H. A., Iddon, D., & Larrick, J. W. 1983. Protective effect of snake venom antibodies in sera of previous snake bite victims. **Annals of tropical medicine and parasitology**, 77(3), 311–314, 1983.

VALENTE, Richard H. *et al.* *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal Of Proteomics**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 241-255, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.001>.

VU, Trang T. *et al.* Batroxobin Binds Fibrin with Higher Affinity and Promotes Clot Expansion to a Greater Extent than Thrombin. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 288, n. 23, p. 16862-16871, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m113.464750>.

WHITE, Julian. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, [S.L.], v. 45, n. 8, p. 951-967, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.030>.