

UNIVERSIDADE METROPOLITANA DE SANTOS

GABRIELE DRIGO GALAN LADEIRA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

SANTOS

2023

GABRIELE DRIGO GALAN LADEIRA

Relatório de estágio curricular

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos como parte do Trabalho de Conclusão de Curso para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof. Dra. Thaís Martins Chucri

Supervisora de Estágio: Dra. Luciana Aparecida Freitas de Sousa

SANTOS

2023

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LADEIRA, Gabriele Drigo Galan

Título: Relatório de Estágio Curricular

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos como parte do Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Membro: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Membro: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meu querido filho Matias, que me tornou a mulher que sou hoje, sua alegria e seu amor me sustentaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me amparar todos esses anos e pela incumbência de confiança em cursar medicina veterinária, cumprindo o seu grande propósito.

Agradeço ao meu pai Antônio Galan, por seu esforço e dedicação para que eu pudesse realizar meu sonho, todo seu empenho durante a minha graduação significou muito para mim.

Agradeço a minha mãe Márcia Galan, que sempre foi e sempre será meu pilar, sua generosidade e acolhimento me trouxeram até aqui.

Agradeço ao meu marido Leandro Ladeira, por ser peça fundamental durante a minha graduação e por ser o meu maior incentivador, me trazendo nova perspectiva em cada área da minha vida, incluindo minha carreira acadêmica.

Agradeço a minha irmã Nathália Meli e cunhado Nicolas Meli, pela força, companheirismo e apoio incondicional, que mesmo distante se fizeram presentes.

Agradeço ao meu sogro, Leandro Ladeira e cunhada, Larissa Ladeira, por estarem sempre ao meu lado me incentivando.

Agradeço a minha sogra, Silmara Ladeira por ser uma amiga, me trazendo acalento e tranquilidade em momentos que foram difíceis e por ter cuidado tão bem durante todos esses meses do meu filho.

Agradeço a Universidade Metropolitana de Santos pela chance de estudar e conseguir fazer um curso que tanto almejei, especialmente a Valéria Martins que esteve ao meu lado dando todo o suporte durante esses anos.

Agradeço aos meus queridos amigos e colegas de turma pelo companheirismo e carinho durante o curso, em especial Jéssica Gomes.

Agradeço a Escola Superior do Instituto Butantan pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e pelos novos aprendizados.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, e a minha supervisora Luciana Freitas, pela amizade, e contribuição para o meu crescimento dentro da área científica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Fachada do Edifício Vital Brazil. (Foto de: Alf Ribeiro, 2010).	2
Figura 2 Organograma Institucional do Butantan (Fonte: Instituto Butantan, 2015).....	2
Figura 3 Edifício Pavilhão Lemos Monteiro, atual Laboratório de Imunopatologia (Foto de: Instituto Butantan, 2016).	3
Figura 4 Sala de Lavagem (Foto de: Gabriele D. G. Ladeira, 2023).....	4
Figura 5 Laboratório de Pesquisa (Foto de: Gabriele D. G. Ladeira, 2023).	4
Figura 6 Sala de Cromatografia (Foto de: Gabriele D. G. Ladeira, 2023).	5
Figura 7 Demonstração do gel SDS-PAGE (Foto de: Jode Plank, 2010).	11
Figura 8 Materiais necessários para realizar a filtração a vácuo. (Foto de: mundoeducação.uol.com.br, 2023.	13
Figura 9 Equipamento de HPLC da marca Shimadzu (Foto: Gabriele D. G. Ladeira, 2023). ..	14
Figura 10 . Membrana de nitrocelulose sendo preparada e equipamento de <i>Western Blotting</i> da marca Amersham (Foto: Gabriele D. G. Ladeira,2023).	15
Figura 11 <i>Bothrops bilineatus</i> (Floriano et al., 2014).	22
Figura 12 <i>Bothrops taeniatus</i> Floriano et al., 2014).	23
Figura 13 Perfil cromatográfico e eletroforético do veneno de <i>Bothrops bilineatus</i> (A e B) e <i>Bothrops taeniatus</i> (C) de espécimes coletados na Região Oeste do Pará. Amostras de peçonha foram aplicadas em uma coluna Coluna C-18 (Vydac, 10 µm, 4,6 mm x 250 mm), acoplada em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE (Shimadzu)...	30
Figura 14 Comparação do perfil eletroforético das espécies do gênero <i>Bothrops</i> . (Fonte: Arquivo pessoal).	31
Figura 15 Reatividade do SAB com os venenos por <i>Western Blotting</i> . (Fonte: Arquivo pessoal)	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cálculo diluição 1:10 – 2023.	6
Tabela 2 - Cálculo diluição 1:100 – 2023.	6
Tabela 3 - Cálculo diluição 1:200 – 2023.	6
Tabela 4 – Cálculo diluição 1:20 – 2023.	8
Tabela 5 - Quantidades de soluções necessárias para a preparação do gel de SDS-PAGE – 2023.	9
Tabela 6 – Regra de três para resultado do volume final de BB2 – 2023.....	10
Tabela 7 - Regra de três para resultado do volume final de BB3 – 2023.....	10
Tabela 8 - Regra de três para resultado do volume final de BT2 – 2023.....	10
Tabela 9 - Características dos espécimes utilizados no estudo.	29

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	1
1.3 INSTITUTO BUTANTAN.....	1
1.4 DESCRIÇÃO DO LOCAL.....	3
1.5 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	5
1.5.1 Dosagem de proteínas e preparação das soluções de veneno	5
1.5.2 Dosagem de proteínas e preparação das soluções de veneno de <i>Bothrops bilineatus</i> e <i>Bothrops taeniatus</i>	7
1.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE)	8
1.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / High Performance Liquid Chromatography (HPLC):	11
1.5.5 <i>Western Blotting</i>	14
1.5.6 ELISA para Titulação do Soro Anti-Bostrópico – Instituto Butantan (SAB- IBU): ..	16
1.5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
Composição do veneno de <i>Bothrops bilineatus</i> e <i>Bothrops taeniatus</i> do Oeste do Pará-Brasil	18
RESUMO	18
ABSTRACT	20
3 OBJETIVO	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 VENENOS	25
4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	25
4.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)	26
4.4 FRACIONAMENTO EM COLUNA DE FASE REVERSA.....	26
4.5 <i>IMUNOBLOTTING</i>	27
4.6 ELISA PARA TITULAÇÃO DO SORO ANTI-BOTRÓPICO – INSTITUTO BUTANTAN..	28
5 RESULTADO	28
5.1 SERPENTES	28
5.2 COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DE <i>B. BILINEATUS</i> E <i>B. TAENIATUS</i>	29
5.3 REATIVIDADE DOS VENENOS COM O SORO ANTI-BOTRÓPICO COMERCIAL DO INSTITUTO BUTANTAN (SBA)	32
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÃO	35
8 REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Esse relatório é descrito pela acadêmica Gabriele Drigo Galan Ladeira, da Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), como parte do Trabalho de Conclusão de Curso para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

O estágio obrigatório curricular supervisionado foi realizado no Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, situado na cidade de São Paulo-SP, supervisionado pela Bióloga Luciana Aparecida Freitas de Sousa, no período de agosto a novembro, totalizando 440 horas.

Nesse tempo foram desenvolvidas atividades na área laboratorial, incluindo dosagem de proteínas de venenos através de espectrofotometria, análise dos venenos através das técnicas de cromatografia de fase reversa em *High-performance liquid chromatography* (HPLC), eletroforese, *western blot* e ELISA. Também foram ofertadas oportunidades de acompanhamento de experimentos dos colegas de laboratório.

1.2 RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1.3 INSTITUTO BUTANTAN

O Instituto Butantan é uma instituição pública centenária centrada na divulgação do conhecimento científico e no desenvolvimento de iniciativas e produtos que impactem beneficentemente a saúde pública através da expertise em ciência de base. É um importante produtor de imunobiológicos que desempenha um papel significativo nas pesquisas em saúde. Para tal, uma ampla coleção zoológica é mantida pelo Instituto, e empregada também em atividades educacionais diversas. O

Butantan está instalado num grande parque que conta com três museus, um hospital, e diversos laboratórios, biotérios etc, alojados em prédios históricos e construções modernas. Além de sua notável infraestrutura interna, o Instituto conta com parcerias com órgãos públicos e grandes corporações privadas (Instituto Butantan, 2023). A figura 1 mostra a fachada do Edifício Vital Brazil, que hoje é a atual Biblioteca do Instituto Butantan.



Figura 1. Fachada do Edifício Vital Brazil. (Foto de: Alf Ribeiro, 2010).

Quatro ramos principais compõem o Instituto Butantan, que são divididos em: Produção de Vacinas e Soros, Pesquisa Científica e Desenvolvimento, Centro de Desenvolvimento Cultural e outras áreas. Como ilustrado na figura 2:

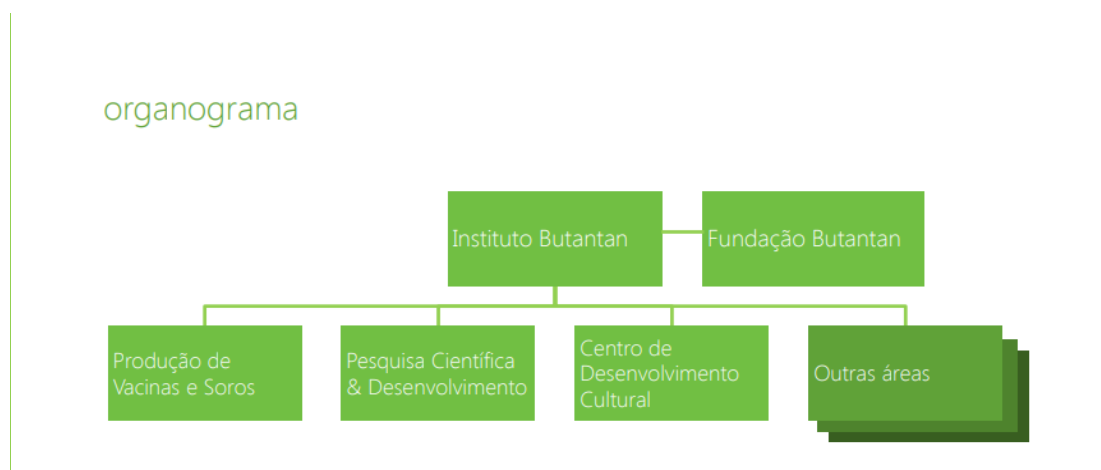


Figura 2. Organograma Institucional do Butantan (Fonte: Instituto Butantan, 2015).

Os laboratórios de Pesquisa Científica e Desenvolvimento são divididos em quatro áreas: a Biologia Animal, a Toxinologia, a Vacinologia e Desenvolvimento. O

Laboratório de Imunopatologia (Figura 3), no qual realizei o estágio, se enquadra na Toxinologia, que está localizado no Pavilhão Lemos Monteiro, um dos prédios históricos do Instituto Butantan. O Laboratório de Imunopatologia faz parte da Divisão de Desenvolvimento Científico e tem como objetivo a realização de pesquisa científica nas áreas de Imunologia e Toxinologia (Instituto Butantan, 2023).



Figura 3. Edifício Pavilhão Lemos Monteiro, atual Laboratório de Imunopatologia (Foto de: Instituto Butantan, 2016).

1.4 DESCRIÇÃO DO LOCAL

O Laboratório de Imunopatologia faz parte da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantan e tem como objetivo a realização de pesquisa científica nas áreas de Imunologia e Toxinologia. Dentre os profissionais que compõem o Laboratório de Imunopatologia estão biólogos, biomédicos, farmacêuticos, médicos veterinários, biotecnólogos, entre outros, realizando pós-doutorados, doutorados, mestrados e orientação de alunos de iniciação científica.

A estrutura do laboratório possui uma sala de lavagem (Figura 4), com vidrarias e utensílios laboratoriais, biotério de experimentação animal, sala de organismos geneticamente modificados (OGM), salas de cultivo celulares, diversas salas de laboratórios de pesquisa (Figura 5), de acordo com cada área dos

pesquisadores que compõem o laboratório, sala de cromatografia (Figura 6). Em destaque abaixo as salas mais utilizadas durante o período de estágio.



Figura 4 Sala de Lavagem (Foto de: Gabriele D. G. Ladeira, 2023).



Figura 5 Laboratório de Pesquisa (Foto de: Gabriele D. G. Ladeira, 2023).



Figura 6 Sala de Cromatografia (Foto de: Gabriele D. G. Ladeira, 2023).

1.5 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

O Laboratório de Imunopatologia, possui como uma das principais áreas de pesquisa a caracterização de venenos das principais serpentes responsáveis pelos acidentes ofídicos do Brasil, e realiza diversas técnicas para o levantamento de dados, dentre as atividades que realizei:

1.5.1 Dosagem de proteínas e preparação das soluções de veneno

Para aprendizado e treinamento de como é realizada a dosagem de proteínas, foi utilizado o veneno de *Bothrops jararacussu*. Cerca de 6,4mg de veneno liofilizado previamente foi pesado em uma balança analítica e diluído em 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS), após esse procedimento a solução diluída foi centrifugada por 10 minutos a 14.000 RPM. Após os 10 minutos na centrífuga, foi separado com muita cautela o sobrenadante do *pellet* através da pipetagem. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi chamado de solução mãe (s.m.).

O próximo passo foi dosar a quantidade de proteínas presente na solução mãe por espectrofotometria. A concentração da amostra de solução mãe é alta devido a quantidade de veneno utilizada, então para poder definir a quantidade de proteínas dessa solução é necessário a preparação de soluções mais diluídas. Assim, as diluições utilizadas foram 1:10, 1:100 e 1:200 (volume da solução mãe/ volume de PBS). Como a leitura das soluções é realizada em uma cubeta de quartzo com volume mínimo para leitura de 400 μL , as soluções nas diluições acima mencionadas foram preparadas em um volume final de 500 μL . Conforme demonstrado nas tabelas 01, 02 e 03.

Tabela 1- Cálculo diluição 1:10 – 2023.

1:10
$1x = 1 \mu\text{L (s.m)} + 9 \mu\text{L (PBS)} = 10 \mu\text{L}$
$50x = 50 \mu\text{L (s.m)} + 450 \mu\text{L (PBS)} = 500 \mu\text{L}$

Tabela 2 - Cálculo diluição 1:100 – 2023.

1:100
$1x = 1 \mu\text{L (s.m)} + 99 \mu\text{L (PBS)} = 100 \mu\text{L}$
$5x = 5 \mu\text{L (s.m)} + 495 \mu\text{L (PBS)} = 500 \mu\text{L}$

Tabela 3 - Cálculo diluição 1:200 – 2023.

1:200
$1x = 1 \mu\text{L (s.m)} + 199 \mu\text{L (PBS)} = 200 \mu\text{L}$
$3x = 3 \mu\text{L (s.m)} + 597 \mu\text{L (PBS)} = 600 \mu\text{L}$

Após ser misturado a solução mãe com o PBS nas 3 diferentes diluições, essas foram mantidas em gelo, e preparado o espectrofotômetro para leitura dessas soluções. O espectrofotômetro só é capaz de quantificar as proteínas de uma amostra, avaliando diretamente a absorvância em 280 nm, pois os anéis aromáticos dos aminoácidos (triptofano, tirosina e fenilalanina) das proteínas absorvem a luz ultravioleta em um comprimento de onda de 280nm. Então foi lavado a cubeta de quartzo com água destilada e depois colocamos o PBS na cubeta para fazer o branco no espectrofotômetro. Para eliminar tais interferências, deve-se zerar o aparelho com uma solução que é denominada “branco”. O branco deve conter todos os constituintes

do sistema, exceto a amostra a ser estudada. A cada conjunto de determinações, bem como após alterar o comprimento de onda, o aparelho deve ser sempre zerado e calibrado com o tubo que contém o branco. Após zerar o aparelho com o branco o PBS foi descartado e colocado as amostras uma por vez para a leitura, sendo que entre as amostras foi lavado a cubeta com água destilada e cada amostra foi repostada no seu respectivo *eppendorf*.

Em seguida, os resultados obtidos no espectrofotômetro no comprimento de onda de 280nm, foram analisados utilizando o seguinte critério, em que para ter um resultado preciso é necessário o valor de absorvância ser $> 0,1$ e $< 2,0$. Se caso for $< 0,1$ é necessário concentrar e se for > 2 é necessário diluir.

Resultados:

1:200 \rightarrow 0,068

1:100 \rightarrow 0,070

1: 10 \rightarrow 0,643 (ideal)

Como as três soluções utilizadas eram provenientes da mesma solução mãe, utilizamos a concentração da solução 1:10 para definir a concentração de proteínas da solução mãe. Assim, o valor de absorvância em 280nm é proporcional a quantidade de proteínas em uma solução, por exemplo, o valor de absorvância igual a 1 equivale a 1 mg/mL de proteína em uma solução. Com os cálculos de absorvância e fator de diluição, o resultado da concentração final da solução foi de 6,4 mg/mL.

1.5.2 Dosagem de proteínas e preparação das soluções de veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus*

Para dar início ao projeto científico, foi feito todo o processo de pesagem com o veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus*. Foi utilizado o veneno de dois indivíduos de *Bothrops bilineatus* e um indivíduo de *Bothrops taeniatus*.

Foi pesado em uma balança analítica 21 mg de veneno liofilizado da *Bothrops bilineatus* 2 (BB2), 23mg de veneno liofilizado da *Bothrops bilineatus* 3 (BB3) e 6 mg de veneno liofilizado da *Bothrops taeniatus* (BT2). Depois foi pipetado 1,5 mL de bicarbonato de amônio (AMBIC) 10 mM com pH 7,4 em cada *eppendorf* do veneno pesado para diluição, após esse procedimento a solução diluída foi centrifugada por

10 minutos a 14.000 RPM. Após os 10 minutos na centrifuga, foi separado com muita cautela o sobrenadante do *pellete* através da pipetagem. O sobrenadante é chamado de solução mãe.

O próximo passo foi dosar a quantidade de proteínas presente na solução mãe por espectrofotometria. A diluição inicial utilizada foi 1:100 (volume da solução mãe/ volume de PBS) para todas as amostras.

Após, o AMBIC foi utilizado para o processo de branqueamento para as 3 diferentes amostras, essas foram mantidas em gelo, e todo o processo ocorreu conforme descrito no tópico anterior.

Em seguida, os resultados foram obtidos no espectrofotômetro e as regras de absorvância foram analisadas.

Resultados:

1:100 BB2 → DO 0,211

1:100 BB3 → DO 0,205

1:100 BT2 → DO 0,029

Diante dos resultados, foi necessário concentrar o veneno BT2 para 1:20, conforme demonstrado na tabela 04.

Tabela 4 – Cálculo diluição 1:20 – 2023.

1:20
$1x = 1\mu\text{L}(\text{s.m}) + 19\mu\text{l}(\text{PBS}) = 20\mu\text{l}$
$25x = 25\mu\text{L}(\text{s.m}) + 475\mu\text{l}(\text{PBS}): 500\mu\text{l}$

Em seguida, o resultado foi lido no espectrofotômetro novamente.

Resultado:

1:20 BT2 → 0,141.

Foi utilizado a concentração 1:100 para BB2 e BB3 e 1:20 para BT2. Com os cálculos de absorvância e fator de diluição, o resultado da concentração final da solução foi de 21mg/mL para BB2, 20,5mg/mL para BB3 e 2,9mg/mL para BT2.

O restante das amostras foram alíquotadas em 100µl no *ependorf* de 500µl.

1.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese é utilizada para determinar a massa molecular das proteínas de interesse e foi realizada conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). As amostras de proteínas são separadas usando um campo elétrico e passam por uma matriz de gel de poliacrilamida na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) que influencia a migração das proteínas. A variação da porcentagem de poliacrilamida no gel permite alterar o tamanho dos poros do gel, o que significa que podemos separar diferentes tamanhos de proteína em diferentes porcentagens das concentrações de géis. O gel de poliacrilamida utilizado foi preparado na concentração de 4% para o gel de empilhamento e 12,5% para o gel de resolução de acordo com os volumes descritos na tabela 05. O gel de base é formado por uma rede de poliacrilamida de maior resolução que separa as proteínas por tamanho, pois polimeriza, formando poros que possibilitam sua migração e para realizar esse gel, utilizamos a solução A composta por 30% de acrilamida, solução B composta por 1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8, SDS (confere carga negativa as proteínas), persulfato de amônio (APS), TEMED (como estabilizador) e H₂O. Já o gel de empilhamento é uma acrilamida de baixa porcentagem que serve para concentrar as amostras em uma única banda antes de prosseguir para o gel de resolução, e para realizar o gel de empilhamento utilizamos a solução A, composta por 30% de acrilamida, solução C composta por 0.5M Tris-HCl buffer, pH 6.8 e utilizamos SDS, APS, TEMED e H₂O.

Após misturar as soluções nos volumes descritos na tabela 05, a solução do gel de resolução (base) foi colocada no cassete de vidro previamente preparados para a montagem vertical do gel. Após a polimerização do gel de resolução foi adicionado o gel de empilhamento preparado usando os volumes descritos na tabela 01 e logo em seguida encaixado o suporte de formação dos poços (pente com 10 poços) onde as amostras serão aplicadas.

Tabela 5 - Quantidades de soluções necessárias para a preparação do gel de SDS-PAGE – 2023.

GEL DE EMPILHAMENTO	GEL DE RESOLUÇÃO
SOLUÇÃO A: 0,5mL	SOLUÇÃO A: 3,13mL
SOLUÇÃO C: 1,26,mL	SOLUÇÃO B: 2,5,mL
SDS: 50 µl	SDS: 100 µl
APS: 25 µl	APS: 50 µl

TEMED: 10 μ l	TEMED: 10 μ l
H2O: 3, 2 mL	H2O: 4, 21 mL

Fonte: Arquivo pessoal (2023)

Após a preparação dos géis, o próximo passo foi a preparação das amostras para o processo de eletroforese. A quantidade de proteína utilizada foi de 20 μ g de proteína para cada uma das amostras de veneno. Assim, levando em consideração a concentração de proteínas obtidas nos passos anteriores utilizamos os volumes correspondentes a quantidade de 20 μ g para cada amostra como mostram os cálculos na tabela 06, 07 e 08 abaixo:

Resultados:

Tabela 6 – Regra de três para resultado do volume final de BB2 – 2023.

BB2
21.000ug – 1000ul
20ug – X
X = 0,95ul

Tabela 7 - Regra de três para resultado do volume final de BB3 – 2023.

BB3
20.000ug – 1000ul
20ug – X
X = 1ul

Tabela 8 - Regra de três para resultado do volume final de BT2 – 2023.

BT2
2.800ug – 1000ul
20ug – X
X = 7,14ul

Para realizar o gel de eletroforese, as amostras foram preparadas na presença e na ausência de um agente redutor. O agente redutor utilizado foi o b-mercaptoetano, que tem a função de denaturação de proteínas, dessa forma reduz as pontes de dissulfeto, mostrando uma maior quantidade de cadeias das proteínas daquela amostra. Assim, foi feito uma solução com a amostra de veneno e um tampão

de amostra reduzido (SDS, glicerol, b-mercaptoetano e bromofenol blue) e outra com tampão de amostra não reduzido (SDS, glicerol e bromofenol blue). Sendo os valores totais das amostras do veneno 0,95 µl (BB2), 1 µl (BB3) e 7,14 µl (BT2) e um valor padrão para os tampões de amostra 10 µl e quantidade de água suficiente para completar um volume final de 20 µL de cada amostra. Após as soluções serem feitas, foram fervidas por 5 minutos.

A seguir, as mesmas foram submetidas à eletroforese com amperagem constante de 35 mA e voltagem de 180 V (Figura 7). O gel resultante foi corado com azul de Comassie (0,1% de brilhant blue R-250; 25% de metanol; 5% de ácido acético) e descorado com solução descorante (metanol 37% + ácido acético 10%). O padrão de massa molecular (GE Healthcare) utilizado para comparação apresentava as seguintes proteínas: fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e clactalbumina (14,4 kDa).

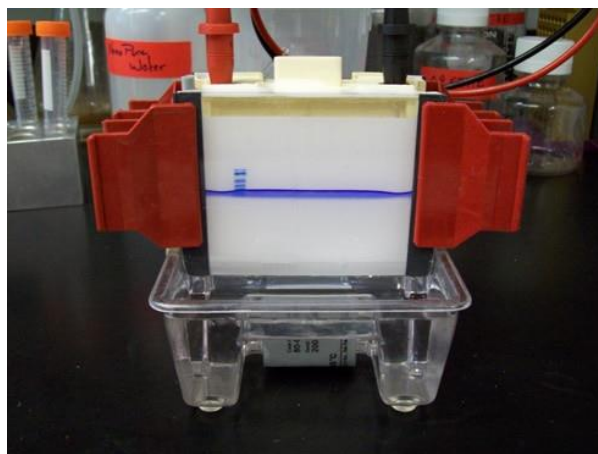


Figura 7 Demonstração do gel SDS-PAGE (Foto de: Jode Plank, 2010).

1.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

A cromatografia de fase reversa consiste em uma técnica físico-química de cromatografia líquida que envolve a separação de moléculas com base em interações

hidrofóbicas entre as moléculas de soluto na fase móvel e os ligantes fixados na fase estacionária. No laboratório de imunopatologia, são aplicadas amostras de venenos de serpentes com a finalidade de verificar quais são as principais toxinas presentes.

A migração dos componentes se dá por duas fases: a fase móvel (solvente) possui característica polar, sendo os solventes mais comuns utilizados água, metanol, acetonitrila e tampões, já a fase estacionária é apolar, caracterizada pela presença de hidrocarbonetos ligados à sílica, permitindo que sua superfície adquira características hidrofóbicas. Nesse caso, os componentes mais polares são eluídos primeiro.

A cromatografia líquida de alta pressão é uma variação de cromatografia em coluna, o que torna indispensável o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel. As válvulas de injeção apresentam uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para a liberação da amostra para a coluna. As colunas cromatográficas mais comuns são as colunas C8 e C18, que se diferenciam na quantidade de hidrocarbonetos. Como a C8 possui um menor número de carbonos na fase estacionária, logo, a sua polaridade é maior quando comparado a C18, e assim, os analitos tendem a eluir de forma mais rápida.

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC), se tornou um equipamento poderoso para análise de peptídeos e proteínas, pois possui maior estabilidade testada da matriz em uma variedade de cenários de fase móvel, também possui facilidade de separações e recuperações/rendimento notáveis.

Para detecção dos resultados de HPLC, utiliza-se o comprimento de onda ultravioleta, podendo ser empregados também detectores de fluorescência, de índice de refração, eletroquímicos, entre outros. O registro de dados é feito num computador instalado um software específico. O utilizado no decorrer do estágio foi o LabSolutions LC.

Para a realização da cromatografia, foi preparado a solução A, composta por ácido trifluoroacético 0,1% (TFA) dentro da capela, para maior segurança. Foi colocado 1000 mL de água Milliq para 1 mL de TFA. Após isso, foi lavado o equipamento de filtragem com água Milliq e filtrado essa solução (Figura 8).

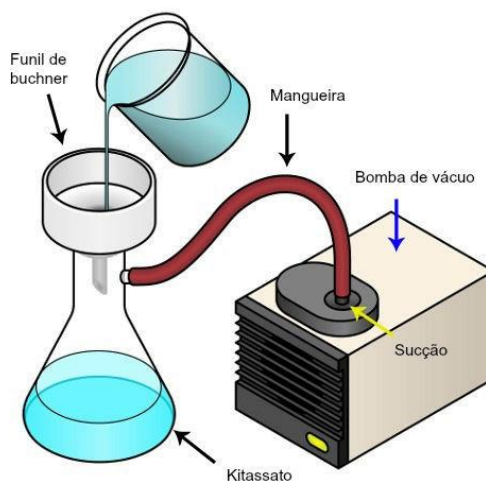


Figura 8 Materiais necessários para realizar a filtração a vácuo. (Foto de: mundoeducação.uol.com.br, 2023).

Por fim, passado no banho de ultrassom por 10 minutos para retirada das bolhas. A solução B, é composta apenas por Acetonitrila (ACN) e não necessita de filtração pois já é ultrapura e estava completa no recipiente.

Antes de ligar o cromatógrafo, algumas etapas são necessárias como verificar o descarte, o isopropanol usado para lubrificar as bombas e se a válvula que conecta a coluna cromatográfica ao sistema estava aberta ou fechada, após essa checagem foi ligado o HPLC. Inicialmente, é realizado a purga automática do sistema, esse passo consiste em retirar as possíveis bolhas de ar que possam estar dentro do sistema do equipamento. Após a purga, é necessário lavar as bombas que serão utilizadas para bombear as soluções A e B, para isso é necessário deixar 50% de solução A e 50% de solução B por aproximadamente 5 minutos, tempo necessário de retirar os solventes anteriores das bombas. Nesse passo, o fluxo para a coluna cromatográfica ainda está fechado e o fluxo utilizado para a lavagem das bombas é de 2mL /min. Após isso, muda-se para 0,3ml, e é aberta a válvula que conecta a coluna cromatográfica ao sistema e é necessário ir aumentando o fluxo aos poucos até chegar em 2 mL/min. Após ambientar a coluna com o fluxo de trabalho, o próximo passo é realizar a lavagem da coluna e equilibrar a mesma para a cromatografia. A lavagem é realizada utilizando o aumento gradativo de ACN até chegar 100% e depois a diminuição até atingir a concentração inicial da corrida que é 5% de ACN. Antes do veneno ser injetado, o *loop* (local onde as amostras são injetadas) foi lavado com a seringa de vidro com água Milli Q e a CBM (interface que conecta o HPLC ao um

computador) foi ligada para o registro dos dados através do software instalado no computador (Figura 9).

Amostras de 2 mg de veneno de cada amostra foram dissolvidas em 500 μ L de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água foram aplicadas na coluna previamente equilibrada com a mesma solução. Os parâmetros para eluição foram fluxos de 2 mL/min, detecção UV214nm, e sistema gradiente com a concentração de 0 a 100% da solução B (ACN), durante 100 minutos. O gradiente foi segmentado em 6 etapas:

- 1- 0 a 5 min: 5% de B
- 2- 5 a 15 min: 5% a 15% de B
- 3- 15 a 75 min: 15% a 45 % de B
- 4- 75 a 85 min: 45 % a 70 % de B
- 5- 85 a 90 min: 70 % a 100 de B
- 6- 90 a 100 min: 100 % de B

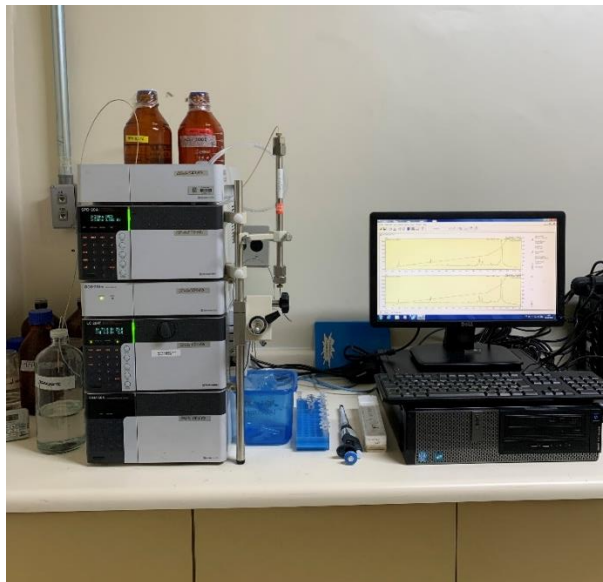


Figura 9 Equipamento de HPLC da marca Shimadzu (Foto: Gabriele D. G. Ladeira, 2023).

1.5.5 *Western Blotting*

Essa técnica também conhecida como *protein blotting* ou *immunoblotting*, é um método em biologia molecular/bioquímica para detectar proteínas por eletroforese em gel, seguida de uma transferência para membrana de nitrocelulose,

em um campo elétrico com tampão básico, onde as proteínas se ligam a membrana por meio de interações hidrofóbicas. Em seguida, é adicionado um anticorpo primário e depois um anticorpo secundário complexado com uma enzima reveladora.

Para a realização dessa técnica, foi utilizado um gel feito com os venenos BB2, BB3 e BT2 através da técnica de eletroforese. As proteínas do gel foram transferidas em uma membrana de nitrocelulose e para realização dessa transferência foi feito um sanduiche com papel filtro imergido em um tampão básico de transferência (Tris, glicina, metanol), e em seguida, foi submetido a um campo elétrico, onde as proteínas se ligaram a membrana por meio de interações hidrofóbicas. Ficando na sequência: três filtros de papéis úmidos, o gel, a membrana e mais três filtros de papéis úmidos. Foi transferido durante uma hora em 80 mA (Figura 10).



Figura 10 . Membrana de nitrocelulose sendo preparada e equipamento de *Western Blotting* da marca Amersham (Foto: Gabriele D. G. Ladeira,2023).

Após a transferência das proteínas do veneno, a membrana foi corada com Ponceau-S, que tem como objetivo corar a membrana para verificar se as proteínas foram transferidas. Em sequência, a membrana foi descorada usando uma solução Tris Salina 10%, pH 7.4. Para a detecção da proteína específica é necessário bloquear a membrana para evitar que os anticorpos se liguem em toda a sua superfície e não ao antígeno, no caso, foi utilizado leite em pó desnatado Mólico (5g) diluído em tampão Tris/salina (100mL) por duas horas

Após essa etapa, a membrana foi lavada por três vezes com solução Tris Salina, e adicionado o primeiro anticorpo a membrana (amostra de soro anti-botrópico do Instituto Butantan, SAB-IBU), no qual se ligou ao antígeno presente na membrana. A diluição do anticorpo é realizada com a solução de bloqueio. Após duas horas foi adicionado o anticorpo conjugado imunoenzimático que está ligado covalentemente a enzima peroxidase, no qual tem função de revelar os dados. Esse anticorpo é um anti-IgG, ou seja, é um anticorpo que reconhece um anticorpo. Após duas horas, foi lavado novamente três vezes com a solução Tris Salina e depois adicionado água oxigenada (substrato da enzima peroxidase), gerando uma precipitação no papel e logo uma mudança de coloração.

1.5.6 ELISA para Titulação do Soro Anti-Bostrópico – Instituto Butantan (SAB-IBU):

O ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) é um teste sorológico imunoenzimático cuja metodologia consiste em reações antígeno-anticorpo que são detectáveis através de reações enzimáticas. Ela é utilizada para a detecção e diagnóstico de diferentes doenças infecciosas, autoimunes, alergias, infecções bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias. Por isso, é possível observar se em algum momento aquele indivíduo entrou em contato com esses agentes. O ELISA é um teste amplamente utilizado em laboratórios, pois, essa técnica é bem eficiente, sendo um dos mais sensíveis dos imunoenaios, oferecendo alto rendimento. Existem quatro tipos principais dessa técnica: ELISA direta, ELISA indireto, ELISA sanduiche e ELISA de bloqueio. No experimento foi utilizado o ELISA indireto, em que primeiro um anticorpo primário foi ligado ao antígeno específico e depois foi adicionado um segundo anticorpo ligado a uma enzima que se liga ao anticorpo primário. Placa de microtitulação foi sensibilizada com 100 µL/poço de venenos de: *Bothrops bilineatus*, *Bothrops taeniatus*, também usamos como parâmetro o veneno de *Bothrops jararaca*, pois o soro antibotrópico utilizado durante o procedimento é feito a partir do veneno dessa espécie, garantindo o seu reconhecimento. Foi utilizado 5 µg/mL em PBS de

cada veneno e deixado por 18 horas em temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS + Tween 20 0,05%) por três vezes para retirada do excesso de antígeno, e bloqueada com 200 µl/poço de uma solução de PBS contendo 2% de albumina de soro bovino (BSA) e deixada por 2 horas a 37°C. Após esse procedimento, o soro anti- botrópico (SAB-IBU) foi diluído em tampão de incubação (PBS/BSA 1% + Tween 20 0,05%) e plaqueado com 100 µL/poço, em diluições seriadas a partir de 1/2000, incubado por 1 e ½ h a 37°C. Após esse período, a placa foi lavada novamente por três vezes e incubada com 100ul/poço do conjugado imunoenzimático anti-IgG de cavalo marcado com peroxidase diluído 1/2000 em tampão de incubação e mantida por 1 h a 37°C. Após esse processo, a placa foi lavada novamente e a reação foi revelada com 100 µL/poço da solução cromógena orto-fenilenodiamina (OPD) + H₂O₂ e a reação bloqueada com 50 ul/poço de H 2 SO 4 30%. A leitura da densidade óptica a 492 nm foi efetuada em aparelho SpectraMax M2 e com auxílio do programa Soft Max Pro 5.4.1.

1.5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o período de estágio foram concedidas diversas oportunidades de conhecimento e aperfeiçoamento. Mas, principalmente aprendizados inovadores para minha carreira acadêmica. No decorrer dos meses aprendi sobre dosagem dos venenos, técnicas de purificação de proteínas, e caracterização molecular de toxinas presentes nos venenos ofídicos.

Além disso, adquiri novos conhecimentos sobre as diferentes proteínas presentes no veneno da serpente do gênero *Bothrops*, e seu interesse na saúde pública, dando início ao aprendizado dos efeitos dessas toxinas no organismo.

O laboratório de Imunopatologia me incentivou e despertou o interesse de dar início a um mestrado, associando o veneno ofídico a medicina veterinária, e apesar de todas as dificuldades e desafios encontrados, como: a distância percorrida para chegar até o Instituto Butantan e por ser uma área totalmente desconhecida, pois não vemos muito durante a graduação de medicina veterinária, sem dúvidas, esse

período de estágio me fez crescer profissionalmente e ampliou o meu olhar sobre a carreira científica.

Composição do veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus* do Oeste do Pará-Brasil

Gabriele Drigo Galan¹, Mônica Colombini¹, Marllus Rafael Negreiros de Almeida³, Wirven Lima da Fonseca³, Paulo Sérgio Bernarde³, Alfredo Pedroso dos Santos Junior⁴, Hipócrates M. Chalkidis⁵
Felipe Gobbi Grazziotin², Ana Maria Moura-da-Silva¹, Luciana Aparecida Freitas-de-Sousa¹

¹Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

²Laboratório de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

³Laboratório de Herpetologia, Universidade Federal do Acre, Cruzeiro do Sul, AC, Brazil

⁴Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brazil

⁵Laboratório de Pesquisas Zoológicas, Unama Centro Universitário da Amazônia, 68010-200 Santarém, PA, Brazil

E-mail: gabrieledgalan1@gmail.com

RESUMO

As serpentes *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus* são encontradas em florestas tropicais de terras baixas e ambas são consideradas espécies semi-arborícolas. Essas espécies são raras no Brasil, refletindo no pouco conhecimento sobre a composição de seus venenos e o baixo envolvimento em casos de acidentes ofídicos. Apesar do baixo número de acidentes, ainda é necessário conhecer a composição do veneno dessas espécies. O entendimento da composição dos venenos e sua variabilidade é de fundamental importância para a obtenção de antivenenos eficazes para o tratamento de humanos vítimas de acidentes ofídicos. Aqui, nós investigamos

a composição do veneno de duas serpentes amazônicas, *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus* do Pará. As diferenças na composição dos venenos foram avaliadas por cromatografia de fase reversa e SDS-PAGE. Em ambas as espécies, a maioria das toxinas foram metaloproteínas da classe PIII. No entanto, *B. bilineatus* tem um perfil cromatográfico menos complexo que *B. taeniatus*, principalmente na região onde as metaloproteínas da classe PIII são eluídas. *B. taeniatus* apresenta muito mais picos na região após 80 min, resultado também evidenciado por SDS-PAGE que mostra mais bandas na região entre 45 e 90 kDa, que é a região das metaloproteínas da classe PIII. Diferenças quantitativas foram observadas no cromatograma de *B. taeniatus* principalmente na região de eluição entre 60 e 80 minutos, onde, de acordo com dados da literatura, são eluídas fosfolipase A2, serino-proteínas, metaloproteínas da classe PI e lectinas do tipo C. Em conjunto, esses resultados mostram que, apesar da distribuição geográfica e do comportamento arbóreo semelhantes, os venenos de *B. taeniatus* e *B. bilineatus* apresentam perfis cromatográficos e eletroforéticos diferentes.

Palavras-chave: Cromatografia; Eletroforese; ELISA; Serpente; Venenos.

Venom composition of *Bothrops bilineatus* and *Bothrops taeniatus* from West do Pará-Brazil

Gabriele Drigo Galan¹, Mônica Colombini¹, Marllus Rafael Negreiros de Almeida³, Wirven Lima da Fonseca³, Paulo Sérgio Bernarde³, Alfredo Pedroso dos Santos Junior⁴, Hipócrates M. Chalkidis⁵
Felipe Gobbi Grazziotin², Ana Maria Moura-da-Silva¹, Luciana Aparecida Freitas-de-Sousa¹

¹Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

²Laboratório de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

³Laboratório de Herpetologia, Universidade Federal do Acre, Cruzeiro do Sul, AC, Brazil

⁴Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal, Universidade Federal do Oeste do Pará,
Santarém, PA, Brazil

⁵ Laboratório de Pesquisas Zoológicas, Unama Centro Universitário da Amazônia, 68010-200
Santarém, PA, Brazil

E-mail: gabrieledgalan1@gmail.com

ABSTRACT

The pit vipers *Bothrops bilineatus* and *Bothrops taeniatus* are found in lowland rainforests and both are considered semi-arboreal species. These species are rare in Brazil reflecting the limited knowledge of their venom composition and their low involvement in cases of snakebites. Despite the low number of accidents, it is still necessary to know the venom composition of this species. Understanding the composition of venoms and their variability is of fundamental importance to obtain effective antivenoms to treat human victims of snakebites. Here, we investigated the venom composition of two Amazonian snakes, *Bothrops bilineatus* and *Bothrops taeniatus* from Acre and Pará. The differences in the composition of the venoms were evaluated by reverse phase chromatography and SDS-PAGE. In both species, the toxin majority were PIII-class metalloproteinases. However, *B. bilineatus* has a less complex chromatographic profile than *B. taeniatus*, mainly in the region where PIII-class metalloproteinases are eluted. *B. taeniatus* presents many more peaks in the region after 80 min, a result also evidenced by SDS-PAGE that shows more bands in the region between 45 and 90 kDa, which is the region of PIII-class metalloproteinases. Quantitative differences were observed in *B. taeniatus* chromatogram mainly in the elution region between 60 and 80 minutes, where according to literature data are eluted phospholipase A2, serine proteinases, PI-class metalloproteinases and C-type lectins. Together, these results show that despite the similar geographical distribution and arboreal behavior, venoms of *B. taeniatus* and *B. bilineatus* present different chromatographic and electrophoretic profiles.

Key-words: Chromatography; Electrophoresis; ELISA; Snake; Poisons.

2 INTRODUÇÃO

No Brasil existem cerca de 430 espécies de serpentes das quais as espécies das famílias Viperidae e Elapidae são capazes de produzir quantidades significativas de toxinas e podem ser perigosas ao homem (Costa et al., 2021). Os viperídeos apresentam grande importância para saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos do nosso País (Melgarejo, 2009). A família Viperidae é formada por serpentes peçonhentas, que possuem aparelho inoculador do tipo solenóglifa (Lock, 2008). Também são identificadas pela cabeça triangular, revestida por pequenas escamas quilhadas e a presença de fosseta loreal entre a região do olho e narina (Campbell & Lamar, 2004). A fauna do Brasil inclui três gêneros da família Viperidae, sendo o gênero *Bothrops*, onde estão incluídas as jararacas, *Crotalus*, onde encontramos as cascavéis e *Lachesis*, popularmente chamada de surucucu.

As jararacas, são caracterizadas por possuírem a cauda sem muitas modificações, geralmente com escamas caudais em pares, sendo serpentes de tamanho médio e com a distribuição geográfica principalmente na Mata Atlântica e região Amazônica (Campbell & Lamar, 2004). O gênero *Bothrops* é o responsável pela maioria dos acidentes ofídicos registrados por ano no nosso País, registrando 22.223 mil casos no ano de 2021 (SINAN, 2021). As espécies de maior importância médica no Brasil são: *Bothrops atrox* (Amazônia); *Bothrops erythromelas* (região Nordeste); *Bothrops jararaca* (Sudeste); *Bothrops jararacussu* (Sul e Sudeste); *Bothrops moojeni* (Cerrado); e *Bothrops alternatus* (Centro-oeste até a Sul). Além dessas espécies existem muitas outras que apresentam importância médica, mas devido a sua distribuição e abundância estão envolvidas em menos acidentes. Dentro dessas espécies que são pouco exploradas, temos a *B. bilineatus* e suas duas subespécies: *B. bilineatus bilineatus* e *B. bilineatus smaragdinus* (Bernarde et al., 2021) e a *B. taeniatus* e sua subespécie: *B. taeniatus lichenosus*. *Bothrops bilineatus* (Figura 11), é uma serpente arbórea, seu habitat compõe a Amazônia e a Mata Atlântica, especialmente em florestas tropicais de várzea, em terras firmes, florestas secundárias e em plantações de cacau vizinhas a florestas. Por ser uma serpente de vida arbórea, possui sua morfologia adaptada, sendo facilmente identificada com a cauda longa e a coloração verde, com tamanho máximo relatado de 1.230 mm

(Bernarde et al., 2021). A espécie *B. bilineatus* possui hábitos de caça noturnos, predando aves, roedores, morcegos, anfíbios e lagartos. As serpentes mais jovens da espécie *B. bilineatus* possuem um comportamento de chamariz caudal, no qual realizam movimentos sinuosos através da ponta da sua cauda que possui uma cor distinta, para conseguir capturar sua presa. Em outras espécies de *Bothrops* esse comportamento tende a acabar quando adultos, não é o caso da *B. bilineatus*, que mantém essa estratégia de caça por toda a vida (Bernarde et al., 2021).



Figura 11 *Bothrops bilineatus* (Floriano et al., 2014).

Conhecida como jararaca estrela ou jararaca-cinza, a *Bothrops taeniatus* (Figura 12), também é uma serpente arbórea, que vive geralmente sobre a vegetação, encontrada em toda a Amazônia, menos a região de Manaus. Essa espécie apresenta um padrão de cor complexo, variando de uma coloração esverdeada, até cinzento-azulado, sempre com manchas escuras nas laterais e manchas claras na lateral inferior do corpo (Campbell & Lamar, 2004). Seu porte é em torno de 1000 mm, porém existem registros na literatura de indivíduos que chegam a atingir 1,5 m de comprimento. Assim como a *B. bilineatus*, a *B. taeniatus* também se alimenta de rãs, lagartos, roedores, aves.



Figura 12 *Bothrops taeniatus* Floriano et al., 2014).

A raridade de encontros com essas serpentes se reflete na baixa ocorrência de casos de acidentes ofídicos em toda a sua distribuição geográfica e no baixo número de publicações clínicas (Bernarde et al., 2021). O que se reflete diretamente no escasso conhecimento sobre a composição dos venenos dessas espécies. Para entender a ação dos venenos e suas toxinas, é necessário conhecer a composição dos venenos. O veneno das serpentes é uma mistura muito complexa, sendo 95% do seu peso seco de fração proteica, que compõe grande variedade de enzimas, toxinas não enzimáticas e peptídeos, e uma fração não proteica, composta por carboidratos, lipídios, nucleosídeos, aminas biogênicas e níveis mais baixos de aminoácidos livres (Caproni, 2009).

As manifestações clínicas locais que caracterizam os envenenamentos causados por serpentes da espécie de *B. bilineatus* são semelhantes às de outras espécies de *Bothrops*, sendo edema, aumento de temperatura local, formação de bolhas, sangramento no local da picada, equimose, necrose e infecção secundária (Bernarde et al., 2021). E os efeitos sistêmicos mais comuns são desencadeados pela ação proteolítica, coagulante e hemorrágica do veneno (Albuquerque et al., 2013).

Em relatos de acidentes ofídicos, o veneno de *Bothrops taeniatus* causa edema acentuado no membro que foi acometido, sem evidência de necrose ou hemorragia no local da picada (Torrez et al., 2009). Uma característica notável dessa espécie, é o efeito anticoagulante, além das atividades hemorrágica e miotóxica. A atividade coagulante do veneno de *B. taeniatus*, é considerada como o maior fator de letalidade, efeito associado a atividade proteolítica e enzimática do veneno (Kuch et al., 1996).

Apesar dos dados até então publicados demonstrarem que os efeitos do veneno de *B. bilineatus* e *B. taeniatus* serem semelhantes aos causada por outras *Bothrops*, pouco se sabe se os venenos dessas espécies e suas subespécies apresentam variabilidade na composição. A variabilidade na composição dos venenos e, por conseguinte o seu impacto nas atividades biológicas dos venenos é considerada uma grande vantagem adaptativa para as serpentes peçonhentas. Além disso, dado ao grande número de acidentes ofídicos, a variabilidade pode também ter consequências importantes para envenenamentos em humanos (Moura-da-Silva et al., 2020).

Nesse contexto, pretendemos expandir o conhecimento da composição do veneno da *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus* coletados na Região Oeste do Pará. Diante disso, esse projeto irá realizar a caracterização bioquímica das principais toxinas presentes no veneno de *B. bilineatus* e *B. taeniatus* para analisar se há diferenças significativas nessa Região, e podendo assim, contribuir com o aumento de dados epidemiológicas dessas espécies na literatura.

3 OBJETIVO

Caracterizar o veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus* coletados na região Oeste do Pará.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus* por gel de poliacrilamida em presença de SDS;
- Caracterizar o veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus* por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

- Avaliar a reatividade dos venenos com o soro antitoxinogênico comercial do Instituto Butantan através do método de Western Blot e do teste imunoenzimático (ELISA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 VENENOS

Os venenos de dois indivíduos da espécie de *Bothrops bilineatus* e um indivíduo de *B. taeniatus* foram coletados mediante autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (Licença ICMBIO/SISBio 10341) na Floresta Nacional do Tapajós que é uma unidade de conservação federal brasileira, localizada no estado do Pará. O comprimento rostro-cloacal (CRC) e o comprimento da cauda (CC) foram medidos para os três indivíduos. As amostras de veneno foram coletadas através de técnicas de extração manual e foram liofilizadas e armazenadas a -80° C até o momento do uso.

4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Os venenos foram diluídos em tampão bicarbonato de amônio 10 mM (AMBIC) e centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm para a retirada de restos de células ou tecidos da glândula de veneno. A dosagem foi realizada num espectrofotômetro (SpectraMax® M2) com leitor de placas de 96 poços. Os venenos

foram diluídos numa proporção de 1:10 (1 parte de veneno: 9 partes de AMBIC) e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 280 nm. Por conta do caminho óptico percorrido na placa, todos os valores de absorbância obtidos foram divididos por 0,29 (Mitchell, 2009) e multiplicado pelo fator de diluição para assim, considerar a leitura de uma unidade de absorbância correspondente a concentração de 1 mg/mL.

4.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)

Aproximadamente 20 µg das amostras individuais de veneno de *B. Bilineatus* e *B. taeniatus* foram analisadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida a 12,5% conforme o método descrito por Laemmli (1970). As amostras foram submetidas a condições não redutoras (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, mais glicerol a 10%, 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol) e redutoras (solução equivalente à descrita anteriormente, com adição de 2-mercaptoetanol 58,3 M). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel de empilhamento e submetido à eletroforese. A amperagem para realização foi de 35 mA a 180 V. Após o término da corrida, as amostras foram coradas com solução Coomassie blue R-250 a 0,2% em metanol 50%. A solução descorante utilizada tem 30% de etanol e 10% de ácido acético. As proteínas que foram utilizadas como padrão de peso molecular (GE Healthcare, 2006) foram fosforilase B (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa).

4.4 FRACIONAMENTO EM COLUNA DE FASE REVERSA

Os venenos de *B. bilineatus* e *B. taeniatus* foram fracionados em coluna de fase reversa semipreparativa (Coluna C-18, Vydac, 10 µm, 4,6 mm i.d. x 250 mm), em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE (Shimadzu, Japão). Amostras de 2 mg de veneno foram dissolvidas em 500 µL de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água. Em seguida, o sobrenadante foi aplicado na coluna previamente equilibrada com a mesma solução. Os parâmetros para eluição foram

fluxo de 2 mL/min, detecção UV214nm, e sistema gradiente com a concentração de 0 a 100% da solução B (acetonitrila), durante 100 minutos. O gradiente foi segmentado em 6 etapas:

- 1- 0 a 5 min: 5% de B
- 2- 5 a 15 min: 5% a 15% de B
- 3- 15 a 75 min: 15% a 45 % de B
- 4- 75 a 85 min: 45 % a 70 % de B
- 5- 85 a 90 min: 70 % a 100 % de B
- 6- 90 a 100 min: 100 % de B

4.5 IMUNOBLOTTING

Para a realização do *imunoblotting* inicialmente foi realizado a separação das proteínas por SDS-PAGE como descrito no item 4.3 e então as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de acordo com Towbin et al. (1979). A seguir, os antígenos presentes nas membranas foram submetidos à caracterização imunoenzimática. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé®), diluído em salina tamponada com Tris-salina (Tris 10 mM e NaCl 150 mM), pH 7,4 (tampão de bloqueio), por 2 horas a 4°C. O Soro Anti-Boত্রópico (SBA) foi adicionado na diluição 1/2000, em tampão de bloqueio e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem com salina tamponada com Tris, a membrana foi incubada com o conjugado imunoenzimático IgG de coelho anti-IgG de cavalo, marcado com peroxidase (Sigma®) (1/2000), diluído em tampão de bloqueio, por 2 horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com Tris-salina e a reação foi visualizada pela coloração com 2,5 mL de 4-cloro-1-naphtol (3 mg/mL) em metanol e 12,5 mL de salina tamponada com Tris em presença de 50 µL de H₂O₂ 30V 0,3%. Para o bloqueio da reação foram feitas lavagens com água de torneira.

4.6 ELISA PARA TITULAÇÃO DO SORO ANTI-BOTRÓPICO – INSTITUTO BUTANTAN

Placas de microtitulação (High Binding - Corning) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de veneno de *B. bilineatus* e *B. taeniatus* a 2 µg/mL em PBS (Tampão Fosfato Salina) e deixadas por 18 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com tampão de lavagem para a retirada do excesso de antígeno, bloqueadas com 200 µL/poço de albumina sérica bovina (BSA) a 2% diluída em PBS e deixadas por 2 horas a 37° C. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com: SBA (Soro Anti-Bostrópico – Instituto Butantan) diluído 1/2000 em 1% BSA diluído em PBS contendo Tween 20 a 0,05%. Foram feitas diluições seriadas e as placas foram deixadas por 1:30 horas a 37° C. Após esta incubação, as placas foram novamente lavadas e reincubadas com 100 µL/poço do conjugado imunoenzimático anti-IgG de cavalo 1/2000 em 1% BSA diluído em PBS contendo Tween 20 a 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem a reação foi revelada com 100 µL/poço da solução cromógena orto-fenilenodiamina (OPD) + H₂O₂ por 4 minutos e bloqueada com 50 µL/poço de H₂SO₄ a 30%. A leitura da densidade óptica a 492 nm foi efetuada em aparelho SpectraMax M2 e com auxílio do programa Soft Max Pro 5.4.1.

5 RESULTADO

5.1 SERPENTES

As características das serpentes coletadas na região Oeste do Pará estão descritas na tabela 09. Todos os indivíduos utilizados nesse estudo eram fêmeas com um comprimento rostro cloacal entre 540 a 723 mm. O indivíduo BT2 de *B. taeniatus* foi considerado um juvenil juntamente com o BB3 de *B. bilineatus*, e o BB2 foi o único indivíduo adulto das nossas amostras.

Tabela 9 - Características dos espécimes utilizados no estudo.

Código	Sinonímias	idade	CRC (mm)	CC (mm)	peso (g)	sexo
BB2	<i>B. bilineatus</i>	adulta	723	110	100g	F
BB3	<i>B. bilineatus</i>	juvenil	663	82	50g	F
BT2	<i>B. taeniatus</i>	juvenil	540	62	64g	F

CRC: Comprimento Rostro Cloacal

CC: Comprimento da cauda

5.2 COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DE *B. BILINEATUS* E *B. TAENIATUS*

A comparação entre os venenos de *B. bilineatus* e *B. taeniatus* proveniente da Região Oeste do Pará foi realizada por cromatografia em fase reversa e por SDS-PAGE e está demonstrada nas figuras 13 e 14. Na figura 13 é possível observar o perfil cromatográfico dos venenos de *B. bilineatus* (A e B) e de *B. taeniatus* (C). Os cromatogramas seguem o perfil geral observados em outros estudos com venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Sousa et al., 2013 e 2017). De maneira geral de acordo com esses estudos as proteínas de veneno de *Bothrops* são eluídas em tempos específicos de acordo com o grupo que pertencem. Assim, as toxinas que podem ser eluídas são desintegrinas (30 minutos), as fosfolipases A₂-PLA₂ (50 - 65 minutos), as serinoproteinases-SVSPs (65 – 72 minutos), metaloproteinases de classe PI-SVMPI e lectinas tipo C-CTLs (75 – 82 minutos) e metaloproteinases de classe PIII-SVMPIII (82 – 90 minutos). Dessa forma, quanto ao tempo de retenção de cada pico, os perfis cromatográficos do veneno de *B. bilineatus* (A e B) foram similares entre si e também com os perfis descritos na literatura (Bernarde et al., 2021). Entretanto, houve uma diferença marcante entre os cromatogramas de *B. bilineatus* e *B. taeniatus* nas áreas dos picos e sua distribuição, principalmente entre os tempos de eluição de 60 a 92 minutos. Onde o veneno de *B. taeniatus* parece ser um pouco mais complexo, apresentando um pico na região das PLA₂ que não é visto em *B. bilineatus*. Além disso, um pico na região de 72 minutos e outro em 80 minutos que também estão

ausentes em *B. bilineatus*. Nessa região são eluídas SVSPs e metaloproteínas de classe PI e CTLs respectivamente.

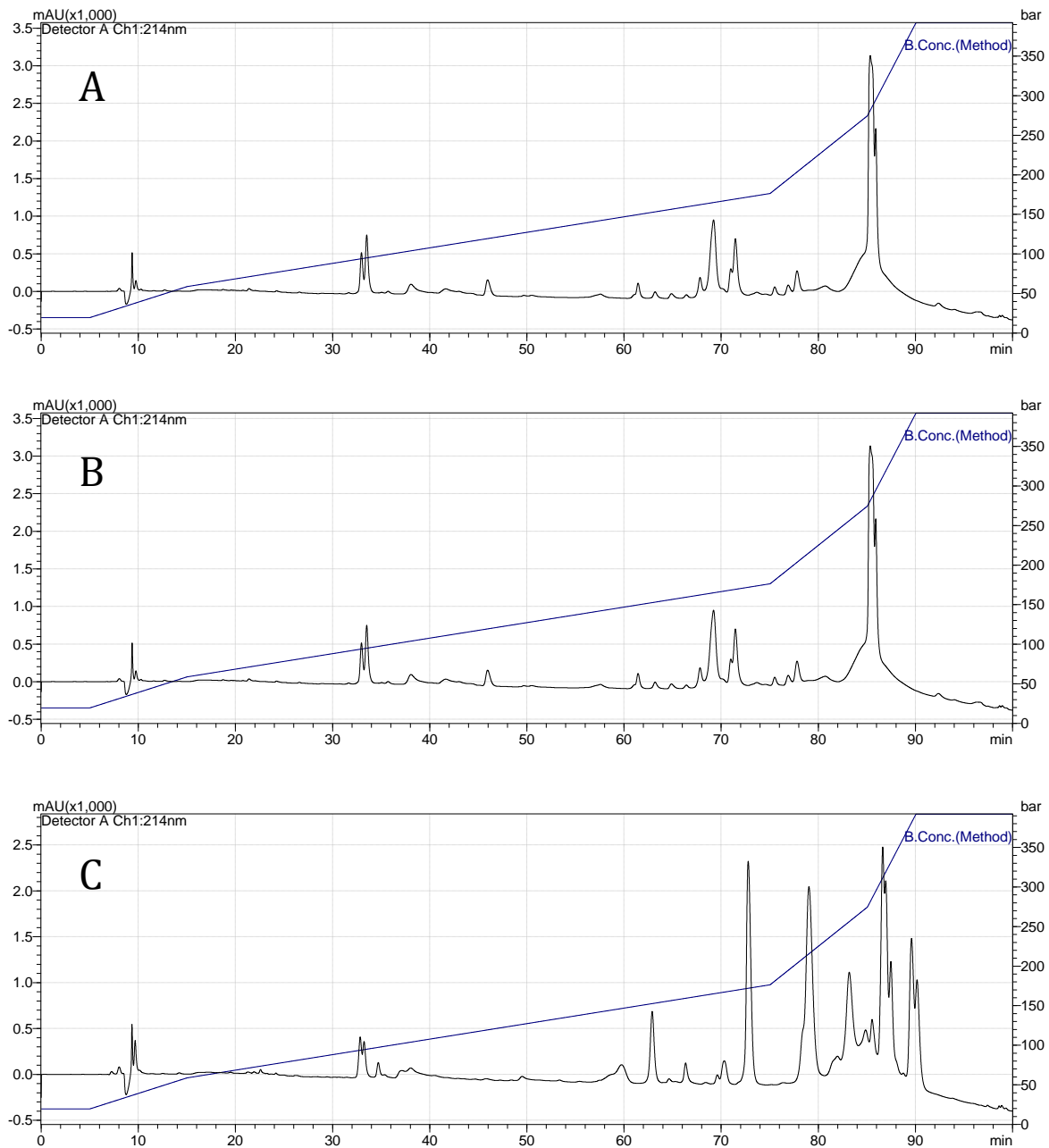


Figura 13 Perfil cromatográfico e eletroforético do veneno de *Bothrops bilineatus* (A e B) e *Bothrops taeniatus* (C) de espécimes coletados na Região Oeste do Pará. Amostras de peçonha foram aplicadas em uma coluna Coluna C-18 (Vydac, 10 μ m, 4,6 mm x 250 mm), acoplada em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE (Shimadzu).

A composição dos venenos também foi analisada através de SDS-PAGE e está demonstrada na Figura 14. De maneira geral, o perfil eletroforético dos venenos

também foi similar entre os dois indivíduos de *B. bilineatus* utilizados (BB2 e BB3). Com os valores totais dos componentes proteicos presente no gel de poliacrilamina reduzido e não reduzido de BB2, BB3 e BT2, a massa molecular relativa variou de aproximadamente 97 kDa a 14 kDa, com um predomínio de bandas na região entre 66 a 20 kDa, e bandas minoritárias em torno de 14 kDa e 97 kDa (Figura 14). *B. taeniatus* apresentou mais bandas nas regiões de 50-80 kDa em ambas as condições, enquanto *B. bilineatus* apresentou apenas uma banda majoritária nessa região. Essa região é conhecida por representar a massa molecular de metaloproteinases de veneno de serpente (SVMPs), um componente importante encontrado na maioria dos venenos de serpentes (FOX e SERRANO, 2008). Por outro lado, na região entre 14 e 30 kDa, apenas o veneno de *B. bilineatus* apresenta uma banda com presença acentuada.

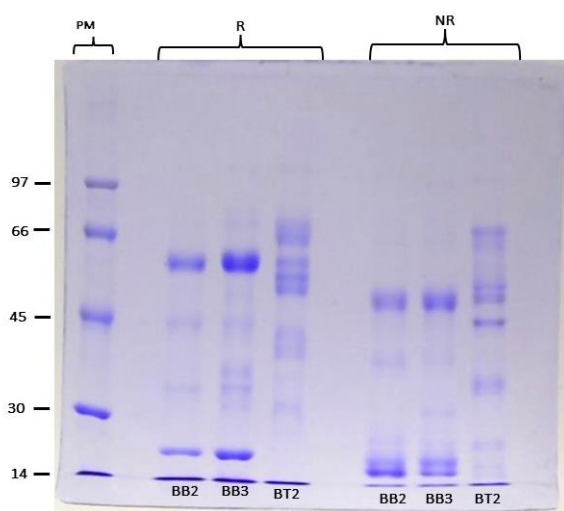


Figura 14 Comparação do perfil eletroforético das espécies do gênero *Bothrops*. (Fonte: Arquivo pessoal).

Foram aplicados 20 μ g dos venenos de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus*. As amostras foram fracionadas por SDS-PAGE (12,5% de gel poliacrilamida) sob condições redutoras (R) e não redutoras (NR) e coradas com Coomassie blue Rd-250.

5.3 REATIVIDADE DOS VENENOS COM O SORO ANTI-BOTRÓPICO COMERCIAL DO INSTITUTO BUTANTAN (SBA)

A reatividade dos venenos com o soro antibotrópico comercial do Instituto Butantan foi avaliada através do método de Western Blot e do teste imunoenzimático (ELISA). O soro antibotrópico do Instituto Butantan reconheceu os antígenos de condições não redutoras do veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus* (Figura 3). E na presença de agente redutor, o SAB reconheceu fracamente os antígenos dos venenos de *Bothrops bilineatus* 2 e 3 e *Bothrops taeniatus* 2 situados entre 66 e 45kDa, provavelmente SVMPs. Componentes de massa molecular com agente redutor entre 45 kDa a 20 kDa o SBA não reconheceu. O não reconhecimento dos antígenos quando as amostras foram reduzidas, possivelmente está relacionado a perda da conformação dos epítomos das proteínas. A redução das proteínas leva a perda de conformação e desnaturação, enquanto, a fração do não reduzido está no seu estado natural.

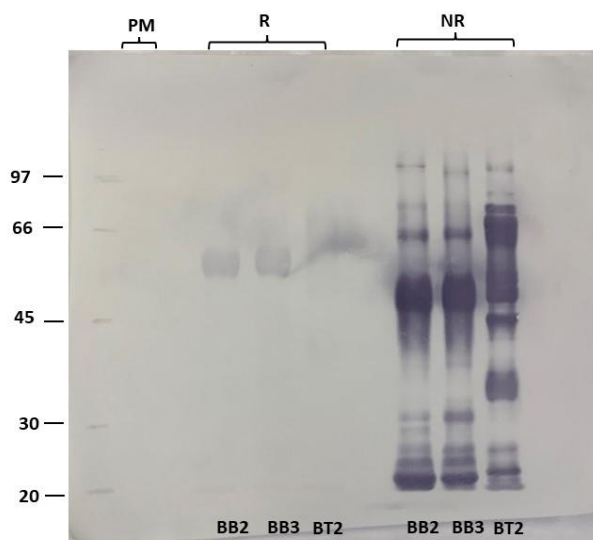


Figura 15 Reatividade do SAB com os venenos por *Western Blotting*. (Fonte: Arquivo pessoal)

Além da reatividade com o SAB, também foi analisado o título de anticorpos do SAB frente aos venenos de: *Bothrops bilineatus*, *Bothrops taeniatus* e *Bothrops jararaca* (veneno que compõem o pool de imunização), utilizando o teste de ELISA. O soro Anti- Botrópico do Instituto Butantan é capaz de reconhecer forte e igualmente esses venenos. O valor do título do SAB para todos os venenos corresponde a diluição

que apresenta leitura de Absorbância a 492 nm de aproximadamente 0,100, isto ocorreu na diluição de 1/256.000 (referente a coluna 10 da placa). Obs.: A diluição de 1/2000 começou na coluna 2).

6 DISCUSSÃO

A variabilidade da composição dos venenos das serpentes pode ser vista em diferentes espécies, e pode ter implicações tanto na pesquisa dos venenos, quanto em acidentes ofídicos (Chippaux & Goyffon, 1990). Essas variações estão correlacionadas com características bioquímicas e farmacológicas dos venenos (Calvete et al., 2011) e podem ser representadas de forma intraespecífica (Saldarriaga et al., 2003; Guèrcio et al., 2006); ligadas ao sexo (Menezes et al., 2006); relacionadas a dieta da serpente (Daltry et al., 1996; Andrade et al., 1999; Pawlak et al., 2006; Casewell et al., 2013b); a variações ontogenéticas (Saldarriaga et al., 2003; Guèrcio et al., 2006); ou conforme a distribuição geográfica (Alape-Girón et al., 2008), podendo repercutir na ação dos venenos quanto em manifestações clínicas dos envenenamentos.

De acordo com os dados presentes na literatura, as metaloproteinases (SVMPs) de classe PI e P-III são as principais toxinas da maioria dos venenos de *Bothrops*. Logo, o principal grupo de toxinas da *Bothrops bilineatus* são as SVMPs, sobretudo as de classe P-III (Calvete et al., 2020; Bernarde et al., 2021). Vemos também em estudos proteômicos estruturais e funcionais relatos da presença de outras toxinas no veneno de *Bothrops bilineatus*, como as serino-proteinases de veneno de cobra (SVSP), proteínas semelhantes a lectina tipo C (CTL), fosfolipase A2 (PLA₂), proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP) e L aminoácido oxidases (LAO), representando os outros integrantes do proteoma de veneno (Calvete et al., 2020). Com os resultados alcançados no presente trabalho, foi possível encontrar uma variabilidade na composição do veneno dessa espécie, porém a toxina SVMPs como

componente majoritário. As outras toxinas citadas anteriormente também foram vistas no resultado do perfil cromatográfico, e na eletroforese em gel SDS-PAGE, porém em graus menores, se mostrando um veneno compatível com o já descrito na literatura para essa espécie. E apesar dos dois indivíduos de *B. bilineatus* serem fêmeas, sendo um juvenil e um adulto, o veneno parece não variar, diferentemente do veneno de outras espécies do gênero *Bothrops* que possuem variação (Guèrcio et al., 2006). E com relação a *Bothrops taeniatus* foi observado no perfil cromatográfico, que a espécie exibiu uma proporção maior da toxina serino-proteinase (SVSP), se comparado com o cromatograma da *B. bilineatus*. Também foi possível encontrar que as SVMPs são o componente majoritário. E de acordo com o peso molecular da eletroforese em gel SDS-PAGE e com o tempo de retenção nos picos do perfil cromatográfico, as toxinas como: SVMPs, SVSP, CTL, PLA₂ e LAO possivelmente estão presentes.

Dessa forma, como podemos observar as SVMPs foram os componentes majoritários de ambos os venenos e provavelmente são as toxinas responsáveis pela maioria dos efeitos ocasionados em caso de acidentes com essas espécies. As SVMPs são metaloproteases com domínios catalíticos dependente de íons de zinco (Gomis-Ruth & Xavier, 2009). Elas são classificadas em três classes: classe PI, classe PII e classe PIII, sendo que as SVMPs de classe PI e de classe PIII são funcionalmente versáteis e possuem efeitos locais e sistêmicos, podendo causar hemorragias através de clivagem de proteínas da membrana basal e interagir com as integrinas que estão relacionadas a ligações celulares, resultando na morte celular por apoptose e enfraquecimento do endotélio (Moura-da-Silva et al., 2007), além disso também possuem na agregação plaquetária (Moura-da-Silva et al., 2001; Higuchi et al., 2011) e ativação de fatores de coagulação (Bernadoni et al., 2012; Modesto et al., 2005) e induzem ativação de mediadores inflamatórios (Moura-da-Silva et al., 2007).

Além disso, no presente estudo, através da técnica de *western blotting*, o soro antibotrópico (SAB) reconheceu visualmente a fração não reduzida dos componentes do veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus*. Entretanto, o SAB reconheceu fracamente a fração reduzida dos componentes do veneno dessas espécies, pois as proteínas se encontram no estado desnaturado (perdem a conformação) e a fração não reduzida as proteínas ficam e seu estado natural.

Com relação a técnica de ELISA, o reconhecimento do veneno de *Bothrops bilineatus* e *Bothrops taeniatus*, apresentaram imunorreatividade até a titulação de 1/256.000. O soro (pentavalente) é obtido a partir do plasma de equinos hiperimunizados, com uma mistura de venenos de cinco espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacuçu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*).

Como podemos observar, apesar dos venenos aqui analisados não estarem presentes no pool de imunização observamos o reconhecimento. Assim, quando analisamos a reatividade do soro antitoxinotrópico com os venenos podemos inferir que o soro provavelmente é capaz de neutralizar a atividade das SVMPs bem como os outros componentes minoritários dos venenos. No entanto, ensaios de neutralização *in vivo* são necessários para comprovar com certeza a eficácia na neutralização dos efeitos causados por esses venenos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que independente da distribuição geográfica e comportamento arbóreo semelhantes, os venenos de *B. taeniatus* e *B. bilineatus* mostram perfis cromatográficos e eletroforéticos diferentes. O veneno de *B. bilineatus*, mostra-se mais simples quando comparado ao de *B. taeniatus*. A análise dos venenos de *B. bilineatus* e *B. taeniatus* por *western blotting* e ELISA, evidenciaram semelhanças no reconhecimento entre os venenos.

8 REFERÊNCIAS

ALAPE-GIRÓN, A; SANZ L, ESCOLA J; FLORES-DIA M; MADRIGAL M; SASA M; CALVETE, J. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of proteome research**, v. 7, p. 3556-3571, 2008. DOI: 10.1021/pr800332p.

ALBUQUERQUE, P. L.; JACINTO, C. N.; SILVA JUNIOR, G. B.; LIMA, J. B. Veras, MSB; Daher, EF. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 55, p. 295-301, 2013. DOI: 10.1590/S0036-46652013000500001.

ANDRADE, DV; ABE, AS. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, p. 200-204, 1999. DOI: [jstor.org/stable/3893080](https://doi.org/10.1093/herpet/3893080).

BERNARDE, P.S; PUCCA, M.B; MOTA-da-SILVA, A; FONSECA, W.L; ALMEIDA, M.R.N; OLIVEIRA, I.S; CERNI, F.A; GRAZZIOTIN, F.G; SARTIM, M.A; SACHETT, J; WEN, F.H; MOURA-da-SILVA, A.M; MONTEIRO, W.M. *Bothrops bilineatus*: an arboreal pitviper in the Amazon and Atlantic forest. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 778302, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.778302.

BERNARDONI, J.L; SOUSA, L.F; WERMELINGER, L.S; LOPES, A.S; PREZOTO, B.C; SERRANO, S.M.T; ZINGALI, R.B; MOURA-da-SILVA, A.M. Variabilidade funcional de metaloproteinasas de veneno de cobra: vantagens adaptativas no direcionamento de diferentes presas e implicações para o envenenamento humano. **PLOS ONE**, v. 9, p. e109651, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109651.

CALVETE, J.J; SANZ, L; PÉREZ, A; BORGES, A; VARGAS A.M; LOMONTE, B; ÂNGULO, Y; GUTIÉRREZ J.M; CHALKIDIS, H.M; MOURAO, R.H.V; FURTADO, M.F.D; MOURA-da-SILVA A.M. 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**, v. 74, p. 510-527, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.01.003.

CALVETE, J; BONILLA, F; GRANADOS-MARTINEZ, S; SANZ, L; LOMONTE, B; SASA, M. Venomics of the Duvernoy's gland secretion of the false coral snake *Rhinobothryum bovallii* (Andersson, 1916) and assessment of venom lethality towards synapsid and diapsid animal models. **Journal of proteomics**, v. 225, p. 103882, 2020. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103882.

CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Cornell University Press, Ithaca, 2004. 425p.

Caproni, P. **Ação da Bothropstoxina-1 do veneno total de *Bothrops jararacussu* irradiados sobre o sistema imune**. 2009 Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CASEWELL N.R; WUSTER W; VONK FJ; HARISSON R.A; FRY, B.G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, p. 219-229, 2013 DOI: 10.1016/j.tree.2012.10.020.

CHIPPAUX, J. P; GOYFFON, M. Antivenom serotherapy: Its applications, its limitations, its future. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique (1990)** v. 84, p. 286-297, 1991. PMID: 1764758.

DALTRY, J.C.; WÜSTER, W; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, p. 537-540, 1996. DOI: 10.1038/379537a0.

FLORIANO, R.S. **Estudo do veneno total da serpente *Bothriopsis bilineata smaragdina* e de sua fosfolipase A2 Asp49 sobre a junção neuromuscular**.

2014. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de

Ciências Médicas. GOMIS-RÜTH, F. X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. **Journal of biological chemistry**, v. 284, p. 15353-15357, 2009. DOI: 10.1074/jbc.R800069200.

GUÉRCIO, R.AP; SHEVCHENKO, A; SHEEVCHENKO, A; LÓPEZ-LOZANO, J.L; PABA, J; SOUSA, MV; RICART, C.AO. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome science**, v. 4, p. 1-14, 2006. DOI: 10.1186/1477-5956-4-11.

HIGUCHI, D.A; ALMEIDA, M.C; BARROS C.C; SANCHEZ, E.F; PESQUERO, P.R; LANG, E.A.S; SAMAAN, M; ARAUJO, R.C; PESQUERO, J.B; PESQUERO, J.L. Leucurogina, uma nova desintegrina recombinante clonada de *Bothrops Leucurus* (Jararaca de cauda branca) com atividade potente sobre agregação plaquetária e crescimento tumoral. **Toxicon**, v. 58, p. 123-129, 2011. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.05.013.

Kuch, U; MEBS D; GUTIÉRREZ J.M; FREIRE, A. Biochemical and biological characterization of Ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). **Toxicon**, v.34, p. 714-7, 1996. DOI: 10.1016/0041-0101(96)00016-5.

LOCK, B. Venomous snake restraint and handling. **Journal of Exotic Pet Medicine** v.17, p.273-284, 2008. DOI: 10.1053/j.jepm.2008.07.012.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. (Ed). **Animais Peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p.42-70.

MODESTO, J.C de A; JUNQUEIRA-de-AZEVEDO I.L.M; NEVES-FERREIRA, A.G.C; FRITZEN, M; OLIVA M.L.V; HO, P.L; PERALES, J; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A insularinase A, um ativador de protrombina do veneno de *Bothrops Insularis*, é uma metaloprotease derivada de um gene que codifica domínios de protease e desintegrina. **Biological Chemistry**, p.386:589–600, 2005. DOI: 10.1515/BC.2005.069.

Moura-da-Silva AM, Butera D, Tanjoni I. Importância das metaloproteínas do veneno de cobra na biologia celular: efeitos nas plaquetas, células inflamatórias e endoteliais. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2893–905, 2007. DOI: 10.2174/138161207782023711.

MOURA-DA-SILVA, A.M; CONTRERAS-BERNAL, J.C; GIMENES, S.N.C; FREITAS-de-SOUSA, L.A; PORTES-JUNIOR, J.A; PEIXOTO, P.S; IWAI, L.K; MOURA, V.M;

BISNETO, P.F; LACERDA, M; SILVA, I.M; FERREIRA, L.C.L; OLIVEIRA, S.S; MONTEIRO, W.M. The relationship between clinics and the venom of the causative Amazon pit viper (*Bothrops atrox*). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, p. e0008299, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008299

Moura-da-Silva A.M; Marcinkiewicz C; Marcinkiewicz M; Niewarowski S. Reconhecimento seletivo de integrina alfa 2 beta 1 por Jararhagin, uma metaloproteinase-/desintegrina do veneno de *Bothrops Jararaca*. **Thrombosis research**, v. 102, p. 153–9, 2001: DOI 10.1016/S0049-3848(01)00216-X.

PAWLAK, J; MACKESSY, S.P; FRY, B.G; STURA, E; MÉNEZ, A; KINI, R.M.. Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove Catsnake) with bird-specific activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 29030-29041, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M605850200.

SALDARRIAGA, M.M; OTERO, R; NUNEZ, V; TORO, M.F; DIAZ, A; GUTIERREZ, J.M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, p. 405-411, 2003. DOI: 10.1016/S0041-0101(03)00171-5.

SOUSA, L.F.; NICOLAU C.A.; PEIXOTO, P.S.; BERNARDONI, J.L.; OLIVEIRA, S.S; PORTES-JUNIOR, J.A.; MOURAO, R.H.V.; LIMA-dos-SANTOS, I; SANO-MARTINS, I.S.; CHALKIDIS, H.M.; VALENTE, RH; MOURA-da-SILVA, A. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 2442, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002442.

SOUSA, L.F.; PORTES-JUNIOR, J.A.; NICOLAU, C.A.; BERNARDONI, J.L.; NISHIYAMA, M.Y; AMAZONAS, D.R.; FREITAS-DE-SOUZA, L.A.; MOURAO, RHV; CHALKIDIS, H.M.; VALENTE, R.H; MOURA-da-SILVA, A. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. **Journal of Proteomics**, v. 159, p. 32–46, 2017. DOI 10.1016/j.jprot.2017.03.003.

Torrez, P.Q., Duarte, M.R., França, F.O.S., Figueiredo, L., Abati, P., Campos, L.R., Parda, P.P.O., Quiroga, M., Mascheretti, M., Boulos, M. First report of an accident with the speckled forest pit viper (*Bothriopsis taeniata*) in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 342–344, 2009. DOI: 10.1590/S0037-86822009000300020.