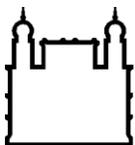


FIOCRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PROTEÍNAS
ANTIOFÍDICAS ISOLADAS DO SORO DE *Didelphis marsupialis* DA COLÔMBIA**

LUIS MIGUEL MUÑOZ GÓMEZ

RIO DE JANEIRO
BRASIL
2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Luis Miguel Muñoz Gómez

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PROTEÍNAS COM
PROPRIEDADES ANTIOFÍDICAS ISOLADAS DO SORO DE *Didelphis marsupialis*
DA COLÔMBIA**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dra. Ana Gisele da Costa Neves Ferreira
Prof. Dr. Jonas Enrique Perales Aguilar

RIO DE JANEIRO

2020

Muñoz Gómez, Luis Miguel.

Caracterização Molecular e Funcional de Proteínas Antiofídicas Isoladas do Soro de *Didelphis marsupialis* da Colômbia / Luis Miguel Muñoz Gómez. - Rio de Janeiro, 2020.

148 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientadora: Ana Gisele Da Costa Neves Ferreira.

Co-orientador: Jonas Enrique Perales Aguilar.

Bibliografia: f. 111-127

1. *Didelphis marsupialis*. 2. Antiveneno. 3. Inibidores naturais. 4. DM43-like. 5. DM64-like. I. Título

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: LUIS MIGUEL MUÑOZ GÓMEZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PROTEÍNAS COM
PROPRIEDADES ANTIOFÍDICAS ISOLADAS DO SORO DE *Didelphis marsupialis*
DA COLÔMBIA**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Ana Gisele Da Costa Neves Ferreira
Prof. Dr. Jonas Enrique Perales Aguilar**

Aprovada em: 25 de junho de 2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fernando Ariel Genta (IOC/FIOCRUZ-RJ) - **Presidente**
Prof. Dra. Russolina Benedeta Zingali (UFRJ-RJ)
Prof. Dr. André Lopes Fuly (UFF-RJ)
Prof. Dr. Rubem Figueredo Sadok Menna Barreto (IOC/FIOCRUZ-RJ)
Prof. Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos (IOC/FIOCRUZ-RJ)

Rio de Janeiro, 25 de junho de 2020

DEDICATORIA

Este trabalho está dedicado principalmente ao criador(a), quem compõe cada átomo dos quais estamos feitos, e a quem devemos tudo.

Dedico a minha mãe, que sempre está do meu lado, me brinda suporte e ajuda a realizar meus sonhos.

Dedico a Daniele, que com seu constante amor me nutre de forças e esperanças. Concluir este trabalho seria imensamente mais difícil sem você ao meu lado.

Dedico também a cada povo que habita sobre nosso planeta, porque a ciência nos pertence a todos por igual!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer de primeira mão ao criador(a) do nosso universo, pois é ele(a) quem rege sobre todas as coisas, e cuja mão faz tdo possível.

A meus orientadores, Ana Gisele e Jonas, pois eles me permitiram conhecer e viver neste país maravilhoso, que tanto amo e tenho aproveitado. Baixo a batuta deles aprendi tanto de ciência, como das pessoas que eles são.

A todo o LATOX, que me acolheu com carinho e compreensão, apesar de que no início eu não entendia nada do que eles falavam. Especialmente a minhas colegas da sala 7, a Priscila, a Jô, a Barbarela, a Luciana Saraiva, a Luana e a Marcelle. São elas a quem devo meu português atual, e com que passamos juntos cada experimento, trabalhando cotovelo com cotovelo, e ajudando-nos entre todos. A Vivi especialmente agradeço a sua grande ajuda para me ajudar a entender melhor os experimentos e por me ajudar a construir esta dissertação, pois ela leva consigo parte dela também. Ao Richard, Pink, Chico, Monique, Luciana agradeço imensamente cada aporte feito a este trabalho e pelo conhecimento compartilhado, seja dentro ou fora de uma sala de aula. A Surzinha especialmente agradeço a IMENSA paciência que ela teve comigo, que foi que mais teve que lidar com o garoto gringo que não falava português.

A todos os professores do programa de pós-graduação, pelas excelentes aulas, das quais levo por sempre comigo.

A minha família, minha mãe, meus irmãos, meus avós, tios, tias, primos e primas, que sempre estão atentos e prestes a me dar suporte quando mais tenho necessitado. Sempre eles se encarregam de me lembrar que nunca estou sozinho, assim esteja a 6000 km de distância deles.

A minha namorada Daniele, pois ela sempre é uma fonte de inspiração, de carinho, de amor ao meu trabalho, a quem devo muitas vezes a força para sair adiante, no meio do caos de uma cidade como Rio de Janeiro, e mais agora, no meio da pandemia.

Ao alojamento no centro de referência professor Hélio Fraga da Fiocruz, por ter me acolhido por todo o tempo do meu mestrado, e por me permitir conhecer esse mundo de pessoas latinoamericanas, africanas e asiáticas, pessoas que como eu, estão longe dos seus lares e famílias, e com quem compartilhei tantas memórias, risadas e aventuras. A elas agradeço imensamente sua companhia, amizade, e por me ajudar a estruturar uma visão do mundo muito mais ampla do que alguma vez pensei que teria. Especialmente quero agradecer a Anabel, Tamara, Liliana, Murilo, Hugo, Fernando, Saba, Adriane, Debora, Juci, Mario, todos os Luises, Avohanne, Paty e Elena.

A todo o pessoal do *Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas*, ao Dr. Jimmy Guerrero pelo grande apoio prestado e pelas orientações pertinentes. A Mary, quem

sacrificou muito do tempo dela para me ajudar com tramites enquanto eu estava no Brasil e por todo o carinho e amizade. A todo o pessoal do *Centro Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca*, que teve toda a disposição de colaborar com a manipulação dos gambás.

A os meus amigos, Javier, Karen, Angie, Juan Diego, Rafael, Angela, Astrid, Yisela, Laura, Leidy, que mesmo longe, seguem aí presentes.

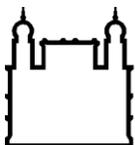
Agradeço também a cada animal que passou pelas minhas mãos, que doou sangue para o avanço da ciência.

Finalmente, agradeço a Fiocruz, o IOC pela formação e pela bolsa, o ministério da saúde, a CAPES, o CNPq, a FAPERJ e ao governo brasileiro, por terem investido na realização deste projeto.

;

“O fraco que recusa o combate nada ganha, porque a nada renunciou. Só quem lutou e venceu pode enriquecer o mundo compartilhando os frutos de sua experiência vitoriosa”.

Paramahansa Yogananda



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PROTEÍNAS COM PROPRIEDADES ANTIOFÍDICAS ISOLADAS DO SORO DE *Didelphis marsupialis* DA COLÔMBIA

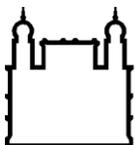
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luis Miguel Muñoz Gómez

Na Colômbia, serpentes do complexo *Bothrops asper/atrox* são responsáveis por mais de 90% dos acidentes, sendo a *Bothrops rhombeatus* a principal espécie venenosa no norte do estado (“departamento”) do Cauca. Os venenos deste complexo se caracterizam por serem hemorrágicos, mionecróticos e/ou pró-coagulantes. Embora existam antissoros comerciais com atividade neutralizante contra eles, a inibição dos efeitos locais é pouco eficiente. Alguns marsupiais da família *Didelphidae* possuem resistência natural a diversos venenos botrópicos. Através de coevolução presa-predador, estes animais selecionaram proteínas séricas que neutralizam metaloendopeptidases hemorrágicas e fosfolipases A₂ miotóxicas, principais responsáveis pelos danos teciduais locais. Do soro da espécie brasileira *Didelphis aurita* foram já isoladas proteínas anti-hemorrágica (DM43) e antimiotóxica (DM64) com alta afinidade por estas toxinas. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivos principais: 1) isolar e caracterizar bioquímica- e funcionalmente a(s) proteína(s) com propriedade(s) antiofídica(s) do soro do *Didelphis marsupialis* do departamento do Cauca, Colômbia; 2) caracterizar o veneno da serpente simpátrica *Bothrops rhombeatus* segundo suas atividades biológicas e seu conteúdo proteico. Este veneno mostrou intensa atividade pró-coagulante sobre plasma humano citratado, com dose coagulante mínima de 0,68 µg/mL, a menor já descrita na literatura para o gênero *Bothrops*. Esta atividade foi totalmente inibida por 1,10-fenantrolina, indicando a participação de metaloendopeptidase(s). A dose coagulante mínima sobre fibrinogênio, dependente de serinoendopeptidase(s), foi 20 vezes maior. A(s) metaloendopeptidase(s) foram as principais responsáveis pela atividade proteolítica do veneno sobre azocaseína. O soro de *D. marsupialis* inibiu a proteólise e também a atividade pró-coagulante do veneno sobre plasma, mas não mostrou efeito sobre a indução de coagulação de fibrinogênio nas concentrações testadas. A presença de proteínas similares a DM43 e DM64 no soro do marsupial colombiano foi confirmada através de *immunoblotting*, utilizando anticorpos anti-DM43 ou anti-DM64. As proteínas DM43-like e DM64-like foram purificadas através de cromatografias em coluna de troca iônica, seguida de afinidade utilizando miotoxina II de *B. asper* imobilizada. A fração DM43-like contém

três bandas proteicas principais, todas ácidas ($pI < 3,5$) e glicosiladas (~ 26% da massa total). A identificação por espectrometria de massas indicou homologia com DM43, dado corroborado pelo ensaio de imunorrevelação. Uma única proteína, menos ácida (pI 4,2) e menos glicosilada (14%) do que a fração DM43-like, foi identificada como DM64-like. DM43-like inibiu o efeito pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* e formou complexo com a metaloendopeptidase jararagina. A proteína DM64-like formou complexo com miotoxina II, mas não inibiu a atividade fosfolipásica do veneno de *B. asper*. Ainda que homólogas, estas proteínas têm especificidades distintas quanto às toxinas-alvo. O veneno de *B. rhombeatus* é composto principalmente por metaloendopeptidases e fosfolipases A₂ e, em menor medida, por L-aminoácido oxidases e serinoendopeptidases, entre outras proteínas minoritárias. Esta composição permite explicar as intensas atividades proteolítica e pró-coagulante dependentes de metaloendopeptidases observadas neste trabalho. Em conclusão, DM43-like e DM64-like constituem novos arcabouços moleculares antiveneno que poderão contribuir para o desenvolvimento de tratamentos otimizados para o envenenamento por serpentes colombianas. Como perspectivas, pretendemos aprofundar o estudo da relação estrutura-função dos inibidores e de suas toxinas-alvo em venenos do complexo *Bothrops asper/atrox* da Colômbia.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PROTEÍNAS ANTIOFÍDICAS ISOLADAS DO SORO DE *DIDELPHIS MARSUPIALIS* DA COLÔMBIA

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luis Miguel Muñoz Gómez

In Colombia, snakes from the *Bothrops asper/atrox* complex are responsible for more than 90% of accidents, and *Bothrops rhombeatus* is the main venomous species in the north of the state (“department”) of Cauca. The venoms of this complex induce hemorrhage, myonecrosis and/or coagulation. Although there are commercial antisera with neutralizing activity against them, the inhibition of local effects is not efficient. Some Didelphidae marsupials have natural resistance to several bothropic venoms. Through prey-predator coevolution, these animals selected serum proteins that neutralize hemorrhagic metalloendopeptidases and myotoxic phospholipases A₂, the main toxins inducing local tissue damage. Anti-hemorrhagic (DM43) and antimiotoxic (DM64) proteins with high affinity for these toxins have been isolated from the serum of the Brazilian species *Didelphis aurita*. In this context, this dissertation had as main objectives: 1) to isolate and characterize biochemically- and functionally the protein(s) with antiophidic properties from the serum of *Didelphis marsupialis* from the department of Cauca, Colombia; 2) to characterize the venom of the sympatric snake *Bothrops rhombeatus* according to its biological activities and its protein content. This venom showed intense pro-coagulant activity on citrated human plasma, with a minimum coagulant dose of 0.68 µg/mL, the lowest ever described in the literature for the *Bothrops* genus. This activity was completely inhibited by 1,10-phenanthroline, indicating the participation of metalloendopeptidase(s). The minimum coagulant dose on fibrinogen, dependent on serinoendopeptidase(s), was 20 times higher. Metalloendopeptidases were the main responsible for the proteolytic activity of the venom on azocasein. The serum of *D. marsupialis* inhibited the proteolysis and also the pro-coagulant activity of the venom on plasma but did not show any effect on fibrinogen coagulation at the tested concentrations. The presence of proteins similar to DM43 and DM64 in the Colombian marsupial serum was confirmed by immunoblotting, using anti-DM43 or anti-DM64 antibodies. The DM43-like and DM64-like proteins were purified by ion exchange chromatography, followed by affinity using immobilized *B. asper* myotoxin II. DM43-like fraction contains three main protein

bands, all acidic (pI < 3.5) and glycosylated (~ 26% of the total mass). Corroborating the immunorevelation assay, identification by mass spectrometry indicated homology with DM43. A single protein, less acidic (pI 4.2) and less glycosylated (14%) than the DM43-like fraction, was identified as DM64-like. DM43-like inhibited the procoagulant effect of *B. rhombeatus* venom and formed a complex with the metalloendopeptidase jararhagin. DM64-like protein formed a complex with myotoxin II but did not inhibit the phospholipase activity of *B. asper* venom. Although homologous, these proteins have different specificities regarding their target toxins. *B. rhombeatus* venom is mainly composed of metalloendopeptidases and phospholipases A₂ and, to a lesser extent, L-amino acid oxidases and serinoendopeptidases, among others. This composition allows to explain the intense proteolytic and pro-coagulant activities dependent on metalloendopeptidases observed. In conclusion, DM43-like and DM64-like are new antivenom molecular templates that may contribute to the development of optimized treatments for envenomation by Colombian snakes. As perspectives, we intend to deepen the study of the structure-function relationship of these inhibitors and their target toxins in the venoms of Colombia's *Bothrops asper/atrox* complex.

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Acidentes ofídicos e envenenamento.....	19
1.2 Epidemiologia	20
1.3 Envenenamento botrópico	23
1.4 Composição bioquímica dos venenos botrópicos.....	23
1.4.1 Metaloendopeptidases	24
1.4.2 Fosfolipases A ₂ (PLA ₂)	26
1.4.3 Serinoendopeptidases (serinoproteases)	28
1.4.4 Componentes minoritários	28
1.5 Terapia antiofídica atual	30
1.5.1 Imunização	30
1.5.2 Extração e purificação	31
1.5.3 Principais problemáticas	32
1.6 Resistência natural a venenos de serpentes.....	34
1.6.1 Proteínas isoladas do soro de animais resistentes	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 Amostras	43
2.2 Quantificação de proteínas.....	44
2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	44
2.4 Atividade proteolítica dos venenos de <i>B. rhombeatus</i> e <i>B. jararaca</i>.....	45
2.5 Atividade pró-coagulante do veneno de <i>B. rhombeatus</i>	45
2.6 Atividade fosfolipásica do veneno de <i>Bothrops asper</i>	46
2.7 <i>Western blotting</i> seguido de imunorrevelação	47
2.8 Purificação da(s) proteína(s) antiofídica(s) do soro de <i>Didelphis marsupialis</i> colombiano	48
2.9 Identificação da(s) proteína(s) antiofídica(s) do soro de <i>Didelphis marsupialis</i>	50
2.10 Determinação do ponto isoeletrico das proteínas DM64-like e DM43-like	51

2.11	Determinação da presença de glicosilação	52
2.12	Análise da formação de complexos	53
2.13	Análise do veneno da serpente colombiana <i>Bothrops rhombeatus</i>	54
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1	Análise da atividade neutralizante do soro do <i>D. marsupialis</i> colombiano sobre o veneno de <i>B. rhombeatus</i>	57
3.1.1	Dosagem de proteínas	57
3.1.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras ...	58
3.1.3	Atividade proteolítica do veneno de <i>B. rhombeatus</i> e testes de inibição pelo soro sanguíneo de <i>D. marsupialis</i> ou inibidores sintéticos	59
3.1.4	Atividade pró-coagulante do veneno de <i>B. rhombeatus</i> e testes de inibição pelo soro de <i>D. marsupialis</i> ou inibidores sintéticos	60
3.2	Purificação e caracterização da(s) proteína(s) antiofídica(s) do soro de <i>D. marsupialis</i> colombiano	69
3.2.1	Análise da presença de proteínas similares a DM43 ou DM64 no soro de <i>Didelphis marsupialis</i>	69
3.2.2	Isolamento das proteínas antiofídicas similares a DM43 ou DM64 a partir do soro de <i>D. marsupialis</i>	71
3.2.3	Monitoramento da imunorreatividade das proteínas antiofídicas isoladas do soro de <i>D. marsupialis</i>	83
3.2.4	Caracterização das propriedades físico-químicas das proteínas DM43-like e DM64-like	85
3.2.5	Caracterização das atividades biológicas das proteínas antiofídicas DM43-like e DM64-like	89
3.2.6	Formação de complexo entre as proteínas antiofídicas DM43-like ou DM64-like e suas toxinas-alvo	93
3.3	Caracterização preliminar da composição proteica do veneno de <i>Bothrops rhombeatus</i>	96
4.	CONCLUSÕES	109
5.	BIBLIOGRAFIA	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Mapa político da Colombia. Representação da incidencia do envenenamento por departamentos (estados)	21
Figura 1.2 Distribuição das espécies <i>Bothrops asper</i> , <i>Bothrops ayerbei</i> e <i>Bothrops rhombeatus</i> no departamento do Cauca, Colômbia	23
Figura 1.3. Proteoma médio do gênero <i>Bothrops</i>	24
Figura 1.4. Subclassificação das SVMF	26
Figura 3.1. SDS-PAGE (12% T) em condições redutoras das amostras utilizadas neste projeto.	59
Figura 3.2. Análise da atividade proteolítica dos venenos de <i>B. jararaca</i> (A) e <i>B. rhombeatus</i> (B) utilizando azocaseína como substrato	60
Figura 3.3. Doses coagulantes mínimas do veneno de <i>Bothrops rhombeatus</i> determinadas sobre plasma humano citratado (DCM-P) (linha vermelha) e fibrinogênio bovino (DCM-F) (linha azul)	62
Figura 3.4. Inibição da atividade pró-coagulante em plasma do veneno de <i>B. rhombeatus</i> pelo soro de <i>D. marsupialis</i>	66
Figura 3.5 Atividade pró-coagulante do veneno de <i>B. rhombeatus</i> sobre fibrinogênio na presença de quantidade crescentes do soro de <i>D. marsupialis</i>	67
Figura 3.6. Análise da atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. asper</i> utilizando o kit Enzchek PLA ₂ na presença ou ausência do inibidor de PLA ₂ p-BPB ou do soro de <i>D. marsupialis</i>	68
Figura 3.7. <i>Western-blotting</i> unidimensional (SDS-PAGE 12% T em condições redutoras) revelado com anticorpo policlonal anti-DM43	69
Figura 3.8. <i>Western-blotting</i> bidimensional (pH 3-10, SDS-PAGE 12% T em condições redutoras) do soro de <i>Didelphis aurita</i> (A) e <i>Didelphis marsupialis</i> (B) revelado com anticorpo policlonal anti-DM43	71
Figura 3.9. Cromatografia de troca iônica do soro de <i>D. marsupialis</i> em coluna de troca iônica em DEAE-Sephacel	72
Figura 3.10. SDS-PAGE (12% T) das frações do soro de <i>Didelphis marsupialis</i> obtidas por cromatografia em coluna de DEAE-Sephacel em pH 3,7	74
Figura 3.11. Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap NHS (acoplada com miotoxina II de <i>B. asper</i>) da fração do soro de <i>D. marsupialis</i> que não interagiu com a coluna de troca iônica DEAE-Sephacel	82
Figura 3.12. SDS-PAGE (12% T) da fração do soro de <i>D. marsupialis</i> não-ligada à coluna de DEAE-Sephacel e que foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna NHS-HiTrap-miotoxina II de <i>B. asper</i>	83
Figura 3.13. <i>Western-blotting</i> unidimensional (SDS-PAGE 12% T em condições redutoras) revelado com antissoro anti-DM43	84
Figura 3.14. SDS-PAGE (12% T) do soro de <i>D. marsupialis</i> e de suas frações antiofídicas purificadas.	85
Figura 3.15. Eletroforese bidimensional (pH 3-10, SDS-PAGE 12% T em condições redutoras) das proteínas DM43-like e DM64-like isoladas do soro de <i>D. marsupialis</i> da Colômbia.	86
Figura 3.16. SDS-PAGE (12% T) em condições redutoras das proteínas DM43-like e DM64-like de <i>D. marsupialis</i> tratadas com PNGase F	87

Figura 3.17. Inibição da atividade pró-coagulante do veneno de <i>B. rhombeatus</i> em plasma humano citratado pelas proteínas antiofídicas DM43-like ou DM64-like	90
Figura 3.18. Atividade pró-coagulante do veneno de <i>B. rhombeatus</i> sobre solução de fibrinogênio a 0.3% na ausência e presença das proteínas antiofídicas DM43-like ou DM64-like	91
Figura 3.19. Ensaio de inibição da atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. asper</i> pelas proteínas antiofídicas de <i>D. marsupialis</i> DM43-like (A) ou DM64-like (B)	92
Figura 3.20. Eletroforese em gel nativo (12% T) para caracterizar a formação de complexo entre a miotoxina II de <i>B. asper</i> e a proteína DM64-like	93
Figura 3.21. A) Eletroforese em gel nativo (12% T) para analisar a formação de complexo entre a jararagina de <i>B. jararaca</i> e a proteína DM43-like. B) Eletroforese em gel nativo (12% T) dos controles negativos de interação.....	94
Figura 3.22. SDS-PAGE do veneno de <i>B. rhombeatus</i> em condições redutoras (raia 1) ou não-redutoras (raia 2).....	97
Figura 3.23. Padrão de bandas excisadas que foram analisadas por MALDI-TOF/TOF.....	98
Figura 3.24. Spectral counts de peptídeos únicos do veneno de <i>B. rhombeatus</i>	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Dosagem de proteínas do veneno de <i>B. rhombeatus</i> e <i>B. jararaca</i> e dos soros sanguíneos de <i>D. marsupialis</i> e <i>D. aurita</i>	58
Tabela 3.2. DCM-P determinadas para o veneno de várias espécies do gênero <i>Bothrops</i>	63
Tabela 3.3. Inibição da atividade pró-coagulante do veneno de <i>B. rhombeatus</i> sobre plasma humano citratado por inibidores sintéticos	64
Tabela 3.4. Inibição da atividade pró-coagulante do veneno de <i>B. rhombeatus</i> sobre fibrinogênio bovino por inibidores sintéticos.....	65
Tabela 3.5. Identificações por nLC-MS/MS das proteínas purificadas do soro de <i>Didelphis marsupialis</i> da Colômbia.....	76
Tabela 3.6. Valores de ponto isoelétrico e massa molecular das proteínas isoladas do soro de <i>D. marsupialis</i>	86
Tabela 3.7. Massa molecular relativa das proteínas isoladas do soro de <i>D. marsupialis</i> da Colômbia antes e após desglicosilação com PNGase F	88
Tabela 3.8. Lista de peptídeos gerados por espectrometria de Massas (MALDI-TOF/TOF). Cada amostra corresponde a banda do gel (figura 3.23) do mesmo número	99
Tabela 3.9. Proteínas identificadas utilizando a técnica shotgun de proteômica do veneno de <i>B. rhombeatus</i>	108

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM: *a desintegrin and metalloproteinase* (metaloendopeptidase com domínio desintegrina)
APMSF: *p-amidinophenylmethylsulfonylfluoride*
BCA: *bicinchoninic acid* (ácido bicinchonínico)
BSA: *bovine serum albumin* (soro albumina bovina)
CTL: *C-type lectin* (lectina tipo-C)
CRiSP: *cysteine rich secretory protein* (proteína secretada rica em cisteína)
DAB: 3-3-diaminobenzidina
DIS: desintegrina
DTN: doença tropical negligenciada
DOPC: *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*
DOPG: *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol)*
DTT: ditioneitol
FDR: *false discovery rate* (taxa de falsas descobertas)
FWHM: *full width at half maximum* (largura do pico a meia altura)
HCD: *higher energy collision-induced dissociation* (dissociação induzida por colisão de maior energia)
IAA: iodoacetamida
IgE: imunoglobulina E
IgG: imunoglobulina G
LAAO: L-amino acid oxidase (L-aminoácido oxidase)
MALDI: *matrix assisted laser desorption ionization* (ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz)
MVC: *minor venom components* (componentes minoritários do veneno)
NP: *natriuretic peptide* (peptídeo natriurético)
OMS: Organização Mundial da Saúde
p-BPB: *p-bromophenacyl bromide* (brometo de p-bromofenacil)
PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)
PLA₂: phospholipase A₂
PLI: *phospholipase inhibitor* (inibidor de fosfolipase)
PSD: *post source decay* (decaimento pós-fonte)
PSM: *peptide spectrum match* (correspondência peptídeo-espectro)
SDS: *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
Snaclec: *snake venom C-type lectin* (lectina tipo-C de veneno)
SSP: *small serum protein* (proteína sérica pequena)
SVMP: *snake venom metalloproteinase* (metaloendopeptidase de veneno de serpente)
SVMPI: *snake venom metalloproteinase inhibitor* (inibidor de metaloendopeptidase de veneno de serpente)
SVSP: *snake venom serine proteinase* (serinoendopeptidase de veneno de serpente)
TOF: *time of flight* (tempo de voo)
VEGF: *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial vascular)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Acidentes ofídicos e envenenamento

O acidente ofídico é um evento que acontece devido à picada de uma serpente, com inoculação de veneno ou não (Ayerbe-González, 2009). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS - WHO “*World Health Organization*”) classificou o envenenamento ofídico como uma doença tropical negligenciada (DTN) da categoria A (Chippaux, 2017). Esta classificação indica que o acidente ofídico é um problema de saúde de relevância mundial, já que: a) a maior parte da população atingida é pobre, tendo impactos não só físicos - morbidade e mortalidade - sobre a vítima, mas também sociais, pois a vítima muitas vezes fica impossibilitada de trabalhar, além de ser estigmatizada e discriminada; b) as populações afetadas residem em países tropicais ou subtropicais, principalmente; c) poderia ser controlado com o uso de políticas públicas recomendadas pelo departamento de controle de DTNs; d) é um problema com pouco investimento em pesquisas tanto básicas como aplicadas e com relativamente poucos grupos de pesquisa sobre o tema no mundo (OMS, 2019)¹.

Graças a essa classificação, o acidente ofídico ganhou maior visibilidade e a expectativa é que passe a ser considerado uma prioridade de saúde pública por diversos governos e agências de fomento. Em 2019, a OMS lançou uma estratégia global de prevenção e controle cujo objetivo é reduzir em 50% a mortalidade e a morbidade decorrentes dos envenenamentos ofídicos até 2030 (Williams *et al.*, 2019). As diretrizes elencadas estão distribuídas em quatro eixos principais, a saber: 1) garantir o acesso de todos a tratamentos seguros e eficazes; 2) educar as comunidades em risco sobre medidas corretas de prevenção e tratamento; 3) fortalecer os sistemas de saúde das comunidades através de uma abordagem integrada; 4) fomentar maior integração e efetiva coordenação entre países/governos/regiões (Williams *et al.*, 2019).

¹ http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/Adoption_additional_NTDs.pdf?ua=1 (acessado em 19/08/2019)

1.2 Epidemiologia

O envenenamento acontece em todos os continentes e em praticamente todos os países do mundo, exceto nas regiões onde não há serpentes, como na Irlanda, no polo sul, na Groenlândia, na Nova Zelândia e em Madagascar. Os acidentes são mais frequentes em países tropicais e nas populações rurais e pobres, onde os envenenamentos tendem a ser mais mortais e deixar piores sequelas, devido à falta de acesso ao tratamento existente (Harrison *et al.*, 2009).

No mundo, estima-se a ocorrência de 1,8-2,7 milhões de envenenamentos por ano, dos quais a maior parte acontece na África (435-580 mil), Ásia (1,2-2 milhões) e América Latina (137-150 mil), com aproximadamente 100.000 mortes/ano (Chippaux, 1998; Kasturiratne *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2017). Na Colômbia, desde 2004 o sistema de vigilância em saúde pública (SIVIGILA) passou a incluir a notificação dos acidentes ofídicos, registrando mais de 4.000 casos em todo o território nacional por ano, com uma mortalidade de 0.5%² (Figura 1.1). Os números relatados são certamente subestimados, pois se baseiam apenas nos registros hospitalares, que muitas vezes são incompletos ou não estão sistematizados. Além disso, muitas vítimas dos acidentes preferem ser atendidas por médicos tradicionais ou por curandeiros das comunidades rurais, fazendo com que os acidentes não sejam devidamente registrados (Otero-Patiño, 2009; Rahman *et al.*, 2010).

² <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2046.pdf> (Acessado 24/08/2019)

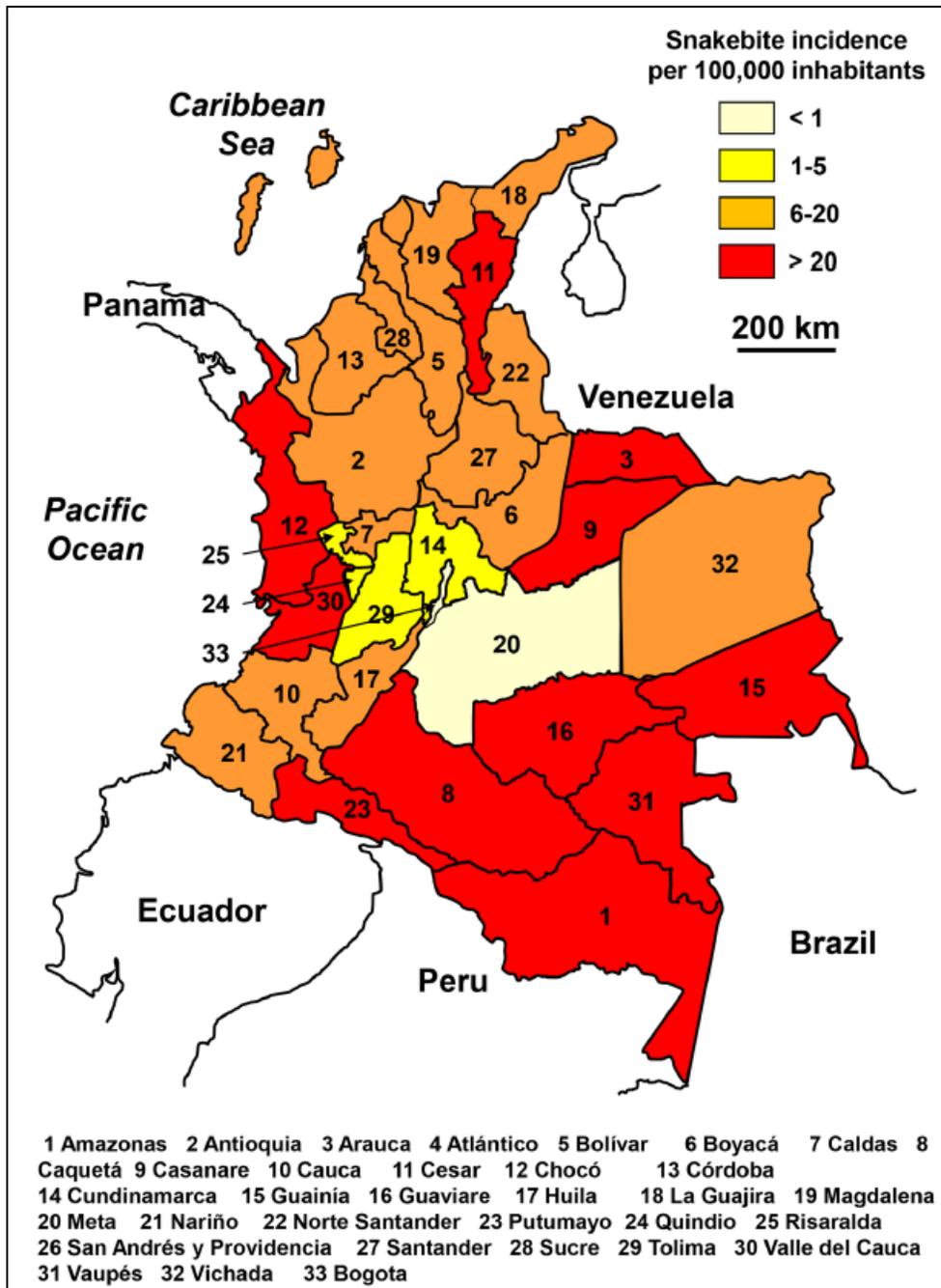


Figura 1.1 Mapa político da Colômbia. Representação da incidência do envenenamento por estados (“departamentos”). Extraído de Chippaux (2017).

Dentre as diferentes famílias de serpentes, duas se destacam por serem as que ocasionam a maioria dos envenenamentos: as famílias Viperidae e Elapidae. Nas Américas, o gênero *Bothrops* (i.e., jararacas), da família Viperidae, é o principal responsável pelos acidentes, respondendo por 90% deles. Outros gêneros importantes desta família são *Crotalus* (i.e.,

cascaveis, 7-8% dos acidentes) e *Lachesis* (*i.e.*, surucucu, 1-2% dos acidentes). O gênero *Micrurus*, da família Elapidae, é responsável por cerca de 1% dos acidentes (Gutierrez, 1995; Campbell & Lamar, 2004). Na América do Sul, a espécie *Bothrops asper* causa a maior parte dos acidentes no norte do continente (Warrell, 2004; Ayerbe-González, 2009; Otero-Patiño, 2009), enquanto que a *Bothrops atrox* é a principal responsável no território amazônico e as *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus* respondem pela maioria dos acidentes no sul (Gutierrez, 2011).

Na Colômbia ocorreram 5.434 acidentes ofídicos (11 por cada 100.000 habitantes) no ano 2018, com uma mortalidade do 0,6%, sendo a espécie *Bothrops asper* (Garman, 1883) a responsável por 60% destas ocorrências (Otero-Patiño, 2009; Rojas Bárcenas, 2018). Esta serpente se distribui pelos litorais do Caribe e Pacífico e entre os vales inter-andinos, entre 0 e 2.000 metros acima do nível do mar. No departamento (estado) do Cauca, foram observadas diferenças morfológicas nas populações de *Bothrops asper* que justificaram a definição de três espécies diferentes: 1) *Bothrops asper*, distribuída pela planície pacífica; 2) *Bothrops ayerbei*, localizada na bacia do rio Patía, no sul do departamento, e *Bothrops rhombeatus*, situada ao norte da bacia do rio Cauca (Figura 1.2)(Folleco-Fernández, 2010). Esta classificação não é aceita por alguns autores, que não consideram que as diferenças morfológicas sejam significativas. Erros na publicação original e a falta de um holótipo também prejudicaram a ampla aceitação da proposta (Ramírez-Chaves & Solari, 2014; Liévano-Bonilla, 2016). Ainda assim, a existência das espécies *Bothrops ayerbei* e *Bothrops rhombeatus* foi ratificada pelo catálogo “*Snakes of the World: A catalog of living and extinct species*” (Wallach *et al.*, 2014).

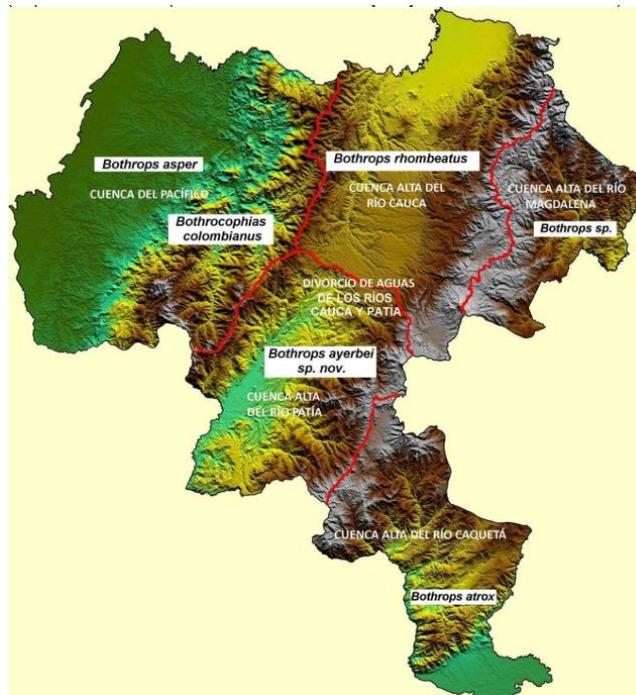


Figura 1.2 Distribuição das espécies *Bothrops asper*, *Bothrops ayerbe* e *Bothrops rhombeatus* no estado (“departamento”) do Cauca, Colômbia. Reproduzido de Folleco-Fernández (2010).

1.3 Envenenamento botrópico

O envenenamento geralmente tem manifestações clínicas características dos diferentes gêneros (Chippaux *et al.*, 1991). Os venenos do gênero *Bothrops* estão associados a efeitos locais importantes, tais como dor intensa, edema, equimose, bolha, dermonecrose e mionecrose; sistemicamente, podem ser observadas alterações na hemostasia/hemorragias, hipotensão e insuficiência renal aguda (Ayerbe-González, 2009; Otero-Patiño, 2009). As manifestações clínicas vão depender fundamentalmente da composição bioquímica dos venenos, que varia de espécie para espécie, entre indivíduos da serpente, ontogeneticamente (*i.e.*, variação entre juvenil e adultos) e geograficamente (regiões próximas podem conter populações com venenos diferentes) (Alape-Girón *et al.*, 2008; Casewell *et al.*, 2014).

1.4 Composição bioquímica dos venenos botrópicos

Os venenos de serpente são compostos principalmente por proteínas, com ou sem atividade enzimática, que exercem várias atividades farmacológicas (Devi, 1968). Nas *Bothrops*, os

componentes dominantes são as metaloendopeptidases (SVMP, do inglês *Snake Venom MetalloProteinase*), as fosfolipases A₂ (PLA₂, do inglês *Phospholipase A₂*) e as serinoendopeptidases (SVSP, do inglês *Snake Venom SerinoProtease*) (Tasoulis & Isbister, 2017) (Figura 1.3).

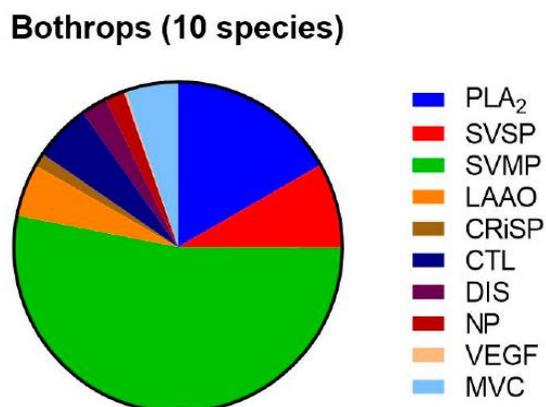


Figura 1.3. Proteoma médio do gênero *Bothrops*. PLA₂: Fosfolipase A₂. SVMP: Metaloendopeptidase. SVSP: Serinoendopeptidase. LAAO: L-amino ácido oxidase. CRiSP: Proteína secretada rica em cisteína. CTL: Lectinas tipo-C. DIS: Desintegrinas. NP: Peptídeos natriuréticos. VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial. MVC: Componentes minoritários do veneno. Retirado de Tasoulis & Isbister (2017).

1.4.1 Metaloendopeptidases

As metaloendopeptidases (ou metaloproteases) de veneno de serpentes são enzimas proteolíticas dependentes de Zn⁺ (Bjarnason & Tu, 1978). Segundo a classificação do MEROPS (Rawlings *et al.*, 2018), elas pertencem à família M12, subfamília M12B, também chamada de reprotisina, que também inclui as enzimas ADAMs (*A Desintegrin and metalloproteinase*)(Fox & Serrano, 2005). As metaloendopeptidases são os principais componentes dos venenos víperos, representando, em média, 32% do total de proteínas do veneno, calculado em base nos proteomas revisados de crotalinae (Fox & Serrano, 2008; Tasoulis & Isbister, 2017).

Estas toxinas podem exercer várias atividades no organismo das vítimas, tais como induzir hemorragias (Bjarnason & Tu, 1978) e coagulopatias, resultado de fibrinogénólise,

fibrinólise, ativação de protrombina, ativação de fator X e/ou inibição da agregação plaquetária (Fox & Serrano, 2005) e inflamação (Teixeira *et al.*, 2005). A atividade de SVMP e os seus diversos efeitos contribuem para a letalidade dos venenos (De Roodt *et al.*, 2003; Rucavado *et al.*, 2004; Chacón *et al.*, 2015).

As metaloendopeptidases hemorrágicas agem hidrolisando proteínas da membrana basal dos capilares, como o colágeno tipo IV (Escalante *et al.*, 2011), que ficam estruturalmente fragilizados e acabam se rompendo por ação da pressão sanguínea (Gutiérrez *et al.*, 2005). Estas enzimas se caracterizam por apresentar o sítio catalítico HEXGHXXGXXHD conservado (Fox & Serrano, 2005). Elas são classificadas de acordo com a existência/composição de domínios não-catalíticos: as PI são as enzimas mais simples, com massas moleculares inferiores a 30 kDa, que apresentam o domínio catalítico e nenhum domínio adicional; as PII possuem um domínio desintegrina, além do domínio metaloendopeptidase, o que faz com que as massas moleculares variem entre 30 e 50 kDa; as PIII possuem o domínio catalítico, um domínio desintegrina-*like* e mais um domínio rico em cisteína e suas massas moleculares estão entre 50 e 80 kDa (Bjarnason & Fox, 1995; Fox & Serrano, 2008).

As classes PII e PIII ainda podem ser subclassificadas segundo: 1) suas características multiméricas; 2) a estrutura da proteína madura pós-processamento proteolítico, em comparação com os transcritos de mRNA correspondentes (Fox & Serrano, 2005). Desta forma, existem metaloendopeptidases classificadas como PI, PIIa-PIIe, PIIIa-PIIID (Figura 1.4).

As SVMP PII podem sofrer processamento proteolítico, levando à separação dos domínios catalítico e desintegrina (PIIa) ou estes dois domínios podem se manter unidos na proteína madura (PIIb-c). As PIIb são proteínas monoméricas e as PIIc são diméricas; por outro lado, em relação a PIIId e PIIe maduras, só se encontrou nos venenos sua porção desintegrina.

As PIII também podem ser encontradas com os domínios endopeptidase, desintegrina-símile e rico em cisteína juntos (PIIIa, c, d) ou separados (PIIIb). As PIIIa e b são monoméricas, as PIIIc são diméricas e as PIIId apresentam domínios lectina tipo-C covalentemente ligados

(Fox and Serrano, 2008). As PIII costumam exercer efeitos sistêmicos e mais potentes do que as PI, que atingem fundamentalmente alvos locais (Gutiérrez *et al.*, 2016).

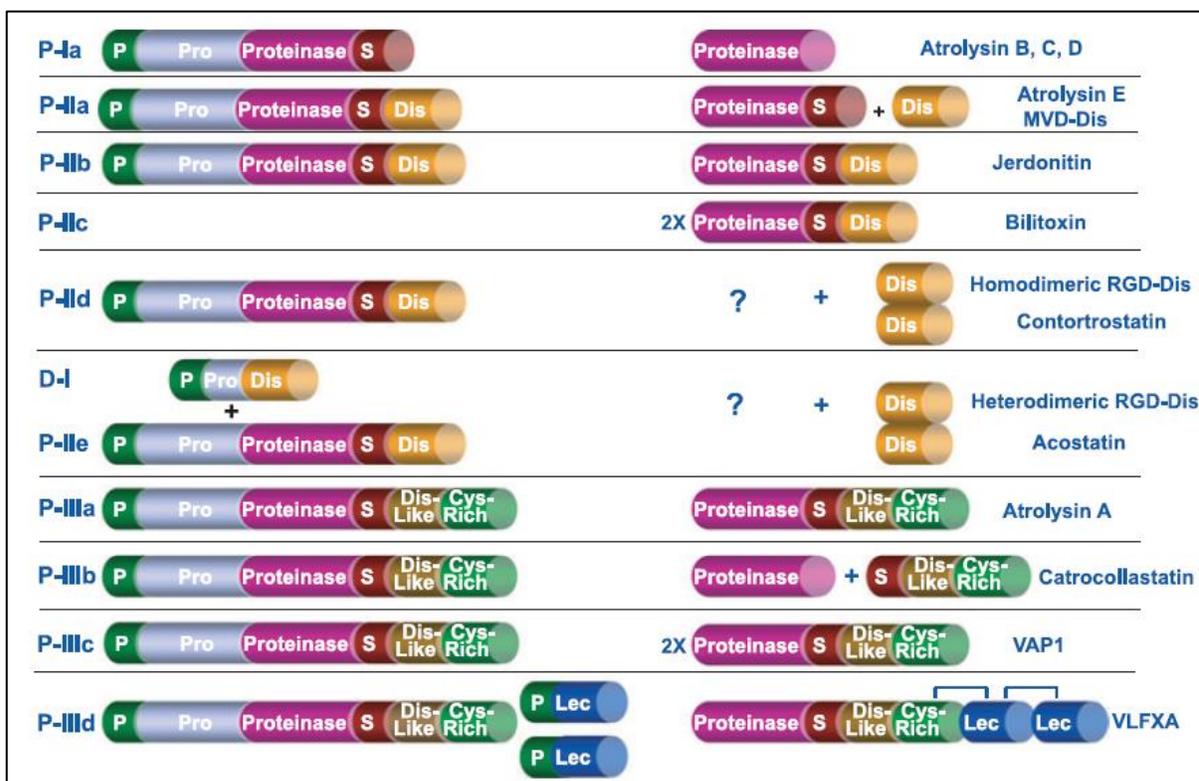


Figura 1.4. Subclassificação das SVMP: À esquerda: enzimas com estruturas não-processadas, inferidas com base no RNAm; a direita: enzimas na forma processada final; P: peptídeo-sinal; Pro: pró-domínio; Proteinase: domínio catalítico; S: região espaçadora; Dis: domínio desintegrina; Dis-like: domínio similar ao domínio desintegrina; Lec: domínio lectina tipo-C; Cys-rich: domínio rico em cisteína. Retirado de Fox & Serrano (2008).

1.4.2 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As fosfolipases são enzimas esterolíticas que hidrolisam glicerofosfolípídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfolípídeos, sendo classificadas como A₁, A₂, B, C e D, dependendo da posição onde hidrolisam o fosfolípídeo (Wang, 2001). As fosfolipases A₂ (EC: 3.1.1.4) são enzimas que hidrolisam glicerofosfolípídeos na posição *sn*-2 (Dennis, 1983, 1994; Wang, 2001; Gutiérrez & Lomonte, 2013) e são classificadas em 6 tipos e 16 grupos: 1) secretadas (sPLA₂-grupos I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV); 2) citosólicas (cPLA₂-grupo IV); 3) independentes de cálcio (iPLA₂-grupo VI); 4) acetil hidrolases-fator ativador de plaquetas

(PAF-AH-grupos VII e VIII); 5) associadas a lipoproteínas (Lp-PLA₂-grupo XV); 6) adipose (AdPLA₂-Grupo XVI) (Dennis *et al.*, 2011; Aloulou *et al.*, 2018). As PLA₂ de veneno de serpente foram as primeiras a serem descritas, sendo atualmente classificadas como enzimas secretadas dos grupos IA (Elapídeos) e IIA/B (Viperídeos), com base na localização das pontes dissulfeto (Heinrikson *et al.*, 1977; Davidson & Dennis, 1990; Dennis *et al.*, 2011).

As sPLA₂ são proteínas pequenas (14-18 kDa), contendo 6-8 pontes dissulfeto (Schaloske & Dennis, 2006). Elas são dependentes de Ca⁺², íon que faz parte da tríade catalítica composta também por resíduos de ácido aspártico e histidina (Donne-Op den Kelder *et al.*, 1981). Além de ajudar na polarização correta do oxigênio da carbonila da ligação éster da posição *sn*-2 do substrato, o cálcio é fundamental para a coordenação das moléculas de água catalítica. Nos venenos de viperídeos, existem 2 tipos de sPLA₂: 1) sPLA₂ com atividade catalítica, contendo o ácido aspártico na posição 49 (D49); 2) sPLA₂ sem atividade catalítica, frequentemente com uma lisina substituindo o ácido aspártico na posição 49 (K49) (Maraganore *et al.*, 1984; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Lomonte *et al.*, 2003).

As fosfolipases A₂ são um dos principais componentes dos venenos de viperídeos, perfazendo em média 20% do total de proteínas, calculado pela média reportada para venenos da subfamília Crotalinae (Tasoulis & Isbister, 2017). Elas estão envolvidas com os efeitos locais, induzindo a degeneração do músculo esquelético através da ruptura das membranas celulares dos miócitos, causando mionecrose (Harris & Cullen, 1990; Otero *et al.*, 2002; Gutiérrez & Ownby, 2003). Tanto as D49 quanto as K49 possuem atividade miotóxica: o primeiro grupo hidrolisa os glicerofosfolipídeos das membranas celulares, enquanto que as toxinas cataliticamente inativas rompem a integridade do sarcolema por meio de interações através de um *cluster* de resíduos hidrofóbicos e catiônicos localizados em sua porção C-terminal (resíduos 115-129). A interação com a toxina leva ao fluxo aumentado de Ca⁺² para dentro da célula muscular, causando hipercontração dos miofilamentos, disfunção mitocondrial e ativação das fosfolipases citosólicas, levando finalmente à morte celular (Gutiérrez & Ownby, 2003; Montecucco *et al.*, 2008; Lomonte & Rangel, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2017).

1.4.3 Serinoendopeptidases (serinoproteases)

Estas proteínas são enzimas proteolíticas que possuem um resíduo de serina altamente reativo no sítio catalítico, sendo classificadas no banco de dados MEROPS (versão 12.1) em 12 clãs e 38 famílias, tomando por base suas estruturas tridimensional e primária, respectivamente (Rawlings *et al.*, 2018). As serinoendopeptidases de veneno de serpente (SVSP *Snake Venom Serine Protease*) fazem parte do clã PA, subclã PA(S), família S1 (quimotripsina), subfamília A. Trata-se de enzimas normalmente glicosiladas, de cadeia única e massa molecular variando de 26 a 67 kDa (Page & Di Cera, 2008; Serrano, 2013). Segundo a especificidade de substrato, as SVSP são classificadas como tripsina-símile, pois clivam ligações peptídicas no C-terminal de resíduos de arginina ou lisina, ainda que sua atividade proteolítica seja bastante influenciada pela sequência de aminoácidos na circunvizinhança do sítio de clivagem, sendo bastante específicas para determinados substratos macromoleculares (Serrano & Maroun, 2005).

As SVSP induzem alterações da hemostasia, consequência de sua interferência com a cascata de coagulação, agregação plaquetária, sistema fibrinolítico e/ou sistema caliceína-cinina. Estas enzimas podem atuar como ativadores de fatores VIII, V ou XIII, ativadores de protrombina, enzimas tipo-trombina, fibrinogenases ou ativadores de plasminogênio (Sajevic *et al.*, 2011; Serrano, 2013). Trata-se do menos abundante entre os principais componentes do veneno, representando em média 15% do total de proteínas reportado para a subfamília Crotalinae, família Viperidae (Tasoulis & Isbister, 2017).

1.4.4 Componentes minoritários

1.4.4.1 L-Aminoácido oxidases (SV-LAAO)

As L-aminoácido oxidases (EC:1.4.3.2) são flavoenzimas estereoespecíficas que catalisam a reação de desaminação oxidativa de L-aminoácidos a α -cetoácidos, liberando peróxido de hidrogênio e amônia (Du & Clemetson, 2002; Moustafa *et al.*, 2006). Nos venenos da subfamília Crotalinae (ex.: *Bothrops*), representam cerca de 4,7% do total de proteínas (Tasoulis & Isbister, 2017). As SV-LAAO já foram associadas a efeitos citotóxicos e a

ativação e/ou inibição de agregação plaquetária e são as responsáveis pela coloração amarelada característica de vários venenos (Li *et al.*, 2008; Naumann *et al.*, 2011).

1.4.4.2 Lectinas tipo-C (CTLs e Snaclecs)

As lectinas do tipo-C são uma superfamília de proteínas sem atividade enzimática, sendo classificadas em 17 subgrupos (Zelensky & Gready, 2005; Cummings & McEver, 2009). Nos venenos de serpente, existem as lectinas tipo-C verdadeiras, que se ligam a mono- ou oligossacarídeos de uma maneira cálcio-dependente, e as Snaclecs (*Snake venom C-type lectin-like protein*), proteínas homólogas às lectinas tipo-C, mas que não apresentam o *loop* de ligação de carboidratos e cálcio, que é típico das lectinas tipo-C verdadeiras (Clemetson *et al.*, 2009). Elas estão envolvidas com a modulação da hemostasia, ativando ou inativando a agregação plaquetária (Clemetson, 2010) ou inibindo a coagulação via interação com proteínas da cascata de coagulação, tais como a trombina e os fatores IX ou X (Mizuno *et al.*, 2001). Podemos citar como exemplos de Snaclecs as proteínas isoladas do veneno de *B. jararaca*, botrocetina, que aumenta a afinidade do domínio A1 do fator de von Willebrand (vWF) pela glicoproteína receptora de plaqueta Iba (GPIIb), induzindo agregação plaquetária (Usami *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 2002), e a botrojaracina, que interage primariamente com o (pro)exosítio I da (pro)trombina, causando efeitos antitrombótico e anticoagulante (Zingali *et al.*, 1993; Assafim *et al.*, 2016). As lectinas tipo-C e as Snaclecs representam, em média, 6,74% dos venenos de Crotalinae (Tasoulis & Isbister, 2017).

1.4.4.3 Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP-*Cysteine Rich Secretory Proteins*)

São proteínas de 20-30 kDa que se caracterizam por terem sequências e todas as 16 cisteínas conservadas (Yamazaki & Morita, 2004). Ainda que já tenham sido isoladas tanto de *Elapidae* (Osipov *et al.*, 2005), *Viperidae* (Yamazaki *et al.*, 2002) e *Colubridae* (Hill & Mackessy, 2000), só se conhece a função de umas poucas isoladas de venenos de elapídeos e que são principalmente neurotóxicas (Heybone & Mackessy, 2016). Em média, as CRISP correspondem a 2,4% do proteoma dos venenos de Crotalinae (Tasoulis & Isbister, 2017).

1.4.4.4 Desintegrinas (*Disintegrins*)

As desintegrinas são proteínas de baixa massa molecular, ricas em cisteínas, caracterizadas por se ligarem especificamente às integrinas, proteínas essenciais para interação célula-célula ou na adesão de células à matriz extracelular (Gould *et al.*, 1990). Nos venenos de serpente, são responsáveis pela inibição da agregação plaquetária (Chakrabarty & Chanda, 2017). Em média, as desintegrinas representam 3,74% do proteoma dos venenos da subfamília Crotalinae (Tasoulis & Isbister, 2017).

1.5 Terapia antiofídica atual

Os soros antiofídicos ou antivenenos são atualmente os únicos tratamentos existentes contra o envenenamento ofídico, e são constituídos de imunoglobulinas produzidas contra os venenos de serpente. Foram desenvolvidos simultaneamente por Calmette (1894) e Phisalix e Bertrand (1894), aplicando-se pequenas quantidades de veneno em animais de grande porte até que eles conseguissem produzir níveis suficientemente altos de imunoglobulinas G neutralizantes contra os venenos (Laloo & Theakston, 2003). Após a etapa de imunização, procede-se a retirada do sangue do animal. Originalmente, utilizava-se o soro sanguíneo total dos animais imunizados, o que ocasionava reações adversas nas pessoas (Gutiérrez *et al.*, 2011). Na época, Calmette acreditava que o soro era um antídoto universal para qualquer veneno, fato desmentido por Vital Brazil, que descreveu a ausência de atividade neutralizante do soro produzido por Calmette contra sobre os envenenamentos por *Crotallus* no Brasil. Na sequência, Vital Brazil passou a desenvolver um soro específico para as serpentes da região (Hawgood, 1992).

Atualmente, os antivenenos são um pouco diferentes, já que foram implementados alguns passos extras a partir da ideia original e que levaram à purificação dos anticorpos do soro para evitar as reações adversas por conta de contaminantes presentes no soro, como albumina (Gutiérrez *et al.*, 2011).

1.5.1 Imunização

No início do processo, devem-se selecionar o(s) veneno(s) que serão inoculados nos animais posteriormente. Para isto, recomenda-se usar venenos que sejam representativos da região, pois venenos de outras regiões/países serão neutralizados com menor eficácia que os locais, isto devido às grandes variações em composição segundo a localização geográfica das serpentes (Jiménez-Porras, 1964; Alape-Girón *et al.*, 2008). Neste sentido, existem dois tipos de antiveneno: monoespecíficos e poliespecíficos. Os monoespecíficos se caracterizam por utilizar o veneno de uma espécie única para imunização, sendo este tipo de antiveneno específico (como os antivenenos desenvolvidos por Calmette, Phisalix e Bertrand contra o veneno de *Naja naja*), enquanto que os poliespecíficos utilizam mais de uma espécie, resultando em um antiveneno de amplo uso (como os antivenenos feitos por Vital Brazil com veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops atrox* (Hawgood, 1992).

1.5.2 Extração e purificação

Posterior ao esquema de imunização, o sangue é extraído dos animais, misturado com anticoagulantes e separado o plasma das células, que são retornadas aos animais para evitar que eles sofram de anemia. O plasma resultante pode ser manipulado de diversas maneiras para produzir três tipos diferentes de antiveneno: moléculas de imunoglobulina G intactas (IgG), fragmentos F(ab')₂ e fragmentos Fab.

- IgG intacta: Neste tipo de antiveneno, usam-se as imunoglobulinas G íntegras e, para sua purificação, são utilizados métodos de *salting out*, como a precipitação com sulfato de amônio ou com ácido caprílico, sendo que este último consegue levar à obtenção de frações ricas em imunoglobulinas com maior pureza do que aquelas obtidas com o sulfato de amônio (Otero *et al.*, 1999).
- Fragmento F(ab')₂: Nesta preparação, as imunoglobulinas são clivadas usando a enzima pepsina, que cliva o fragmento Fc das imunoglobulinas G, reduzindo a frequência de reações adversas dos antivenenos dependentes do complemento (León *et al.*, 2001). Para isto, o plasma inteiro é tratado com a pepsina em pH ácido, posteriormente tratado com calor (reação de termocoagulação) e, depois de

vários passos de *salting out*, é obtida a preparação contendo os fragmentos $F(ab')_2$ (Pope, 1939a, 1939b).

- Fragmento Fab: Este tipo de antiveneno é feito por alguns produtores a partir do soro de ovelhas e utiliza-se a enzima papaína para clivar as proteínas, sendo que o sítio de clivagem nas imunoglobulinas é diferente da pepsina, clivando entre os fragmentos Fab e, portanto, liberando ambos em separado. Para isto, as imunoglobulinas são purificadas inicialmente com sulfato de amônio e posteriormente tratadas enzimaticamente em pH neutro.

Estes três tipos de antivenenos apresentam algumas diferenças farmacocinéticas importantes que lhes diferenciam; Fab e $F(ab')_2$ têm um maior volume de distribuição e um menor tempo de vida médio (Gutierrez *et al.*, 2003) e uma rápida eliminação (Ho *et al.*, 1990; Ariaratnam *et al.*, 1999). Estes fenômenos têm a ver com a massa molecular dos fragmentos, pois quanto menor o tamanho dos anticorpos, mais facilmente serão distribuídos e eliminados (Covell *et al.*, 1986). Após a purificação das imunoglobulinas, os antivenenos podem ser envasadas na forma líquida ou liofilizados, de forma a ajudar a preservá-los por mais tempo em lugares que não possuem refrigeração.

1.5.3 Principais problemáticas

Os antivenenos produzidos a partir de plasmas hiperimunes apresentam alguns problemas evidentes como, por exemplo, a frequência de reações adversas. As reações adversas se dividem em reações agudas (anafiláticas, hipersensibilidade I: ativação dos mastócitos ou degranulação dos basófilos dependente de IgE ou não-imunológica (conhecida anteriormente como reação anafilactóide, termo atualmente em desuso (Simons *et al.*, 2014) e reações tardias (doença do soro, hipersensibilidade IV, menos frequente) (Lalloo & Theakston, 2003; De Silva *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que os antivenenos não neutralizam de modo eficiente os efeitos tóxicos locais induzidos pelos venenos botrópicos, como o de *Bothrops asper* (ex.: efeito mionecrótico)(Lomonte *et al.*, 1982; Gutiérrez *et al.*, 1998). Isto faz com que a incidência de amputações e perda de massa muscular devido à necrose ainda se

mantenha alta em diversas regiões, incapacitando as vítimas e possivelmente afetando a vida laboral delas, que frequentemente são trabalhadores do campo e pobres.

Outro ponto importante é que a produção de antivenenos não é economicamente viável para as empresas privadas, o que faz com que as companhias farmacêuticas percam o interesse na produção, como foi o caso da empresa Sanofi, quem em 2010 decidiu parar a produção do antiveneno polivalente FAV-Afrique (Schiermeier, 2015). Infelizmente, este insumo passou a ter que ser produzido pelos governos locais, que muitas vezes não contam com recursos suficientes. Apesar de ser um produto com alta relação custo-efetividade (Brown & Landon, 2010), a cadeia de produção apresenta um alto custo (manutenção de serpentários, laboratórios para extração e manipulação dos venenos, manutenção de uma fazenda, alimentação dos animais de grande porte, cuidados veterinários, medicamentos, equipamentos para extração de sangue, processamento e embalagem do produto final) (Habib & Brown, 2018). Em muitos países, este custo é assumido pelas vítimas, as quais devem se endividar para conseguir pagar o tratamento, perpetuando assim a pobreza de muitas populações rurais onde isto acontece (Habib & Brown, 2018).

Por conta deste quadro bastante preocupante, a OMS lançou um conjunto de diretrizes (*roadmap*) visando reduzir à metade a mortalidade e morbidade dos envenenamentos ofídicos até 2030, melhorando o tratamento atual para fazê-lo seguro e eficaz, além de fomentar maior apoio para pesquisas sobre terapêuticas novas e inovadoras (Williams *et al.*, 2019). Dentre as novas terapêuticas sendo pesquisadas, podemos citar o uso de moléculas sintéticas, os anticorpos recombinantes (Laustsen *et al.*, 2017), as nanopartículas (Karain *et al.*, 2016) ou os peptídeos sintéticos (de la Rosa *et al.*, 2017; Titus *et al.*, 2019).

Destas propostas, as que têm tido maior sucesso são as moléculas pequenas, como por exemplo o *varespladib* ou o *batimastat*. Estas moléculas foram originalmente desenvolvidas para outras finalidades, como o tratamento de doenças cardiovasculares, no caso do *varespladib*, ou o tratamento do câncer, no caso no *batimastat*. Infelizmente, estas drogas foram reprovadas nos testes clínicos e não conseguiram entrar no mercado, sendo redirecionadas para testes no tratamento do envenenamento ofídico devido a que ainda

representam um potencial para tratamentos diferentes (*drug repurposing*) (Knudsen & Laustsen, 2018).

O *varespladib* é um potente inibidor de fosfolipases A₂ secretadas que conseguiu inibir os efeitos neurotóxicos dos venenos de *Micrurus fulvius* e *Vipera berus*, causados principalmente por fosfolipases A₂ (Lewin *et al.*, 2016), além do inibir os efeitos hemorrágico e miotóxico de *Naja atra*, *Deignakistrodon actus*, *Gloydius halys* e *Bungarus multicinctus* (Wang *et al.*, 2018). Por ser fisiologicamente ativo só por 24 horas, o *varespladib* não conseguiu auxiliar na restauração da mionecrose muscular e, portanto, foi sugerido o uso apenas como um adjuvante primário, antes do uso do antiveneno comercial padrão (Lewin *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2018).

O *batimastat* e o *marimastat* são inibidores de metaloendopeptidases de matriz que foram estudados quanto ao potencial de inibição dos efeitos locais e sistêmicos provocados por SVMPs de *Echis ocellatus* e *Bothrops asper*, conseguindo inibir os efeitos hemorrágico local, coagulante e desfibrinante, assim como a letalidade (Rucavado *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2017). O *batimastat* se mostrou mais efetivo do que o *marimastat*, apesar de não poder ser administrado oralmente como este último. Ambos os compostos podem provocar síndrome músculo-esquelética e inflamação após um longo tratamento, mas a curto prazo não apresentam problemas (Rao, 2005), portanto se recomenda o uso apenas como ajudante inicial do tratamento no envenenamento (Wang *et al.*, 2018).

1.6 Resistência natural a venenos de serpentes

A resistência natural é a imunidade que alguns animais têm contra os venenos de certas espécies de serpentes, sendo que esta imunidade tem uma base genética, ou seja, é inata e não-adaptativa. É um fenômeno que pode ser produto da interação de uma espécie peçonhenta com uma espécie não-peçonhenta, em uma relação de predação, num fenômeno coevolutivo denominado *arms race* (Casewell *et al.*, 2013; Holding *et al.*, 2016) ou constituir um mecanismo de defesa das serpentes contra o próprio veneno, como descrito por Felice

Fontana (Fontana, 1787), o primeiro a perceber que a serpente não é envenenada por seu próprio veneno.

As serpentes são animais cosmopolitas, de hábitos carnívoros obrigatórios. Portanto, na maioria dos casos, exercem a função de predador, mas em alguns outros podem ser presas de animais tanto carnívoros quanto onívoros. Um dos primeiros exemplos foi reportado pelo naturalista espanhol Felix de Azara, que fez referência ao fato de algumas pessoas terem visto um espécimen do marsupial *Lutreolina crassicaudata* matar uma víbora não especificada (De Azara, 1802; Voss *et al.*, 2009). Posteriormente, outros casos foram descritos, como por exemplo os mangustos (*Herpestes ichneumon*) (Calmette, 1895) e ouriços (*Erinaceus europaeus*) (Phisalix & Bertrand, 1895). Estes organismos desenvolveram traços fisiológicos que os permitem caçar serpentes peçonhentas sem correr o risco de morrer por conta do veneno, garantido a eles a possibilidade de uma dieta ofiófaga (Robert S Voss & Jansa, 2012).

Dois mecanismos principais para explicar a imunidade destes animais contra os venenos já foram descritos: 1) a existência de proteínas circulantes no sangue que neutralizam as toxinas principais dos venenos, tais como metaloendopeptidases e fosfolipases A₂; 2) a modificação dos alvos moleculares de algumas toxinas, de tal forma que estas não conseguem exercer seu efeito tóxico (Jansa & Voss, 2011; Robert S Voss & Jansa, 2012). O primeiro mecanismo pode ser transferido para outros animais através do plasma ou soro, dando proteção contra o envenenamento, enquanto o segundo não é transferível.

O mecanismo mais estudado é primeiro, devido ao potencial biotecnológico das proteínas antiofídicas, já que estas proteínas (ou seus peptídeos) poderiam ser usados no tratamento do envenenamento. Para isto, o sangue dos animais é extraído e se obtém o soro. A partir do soro, é possível testar a atividade antiofídica e isolar as proteínas responsáveis pela neutralização usando cromatografia (Domont *et al.*, 1991). Estas proteínas com propriedades antiofídicas já foram descritas no soro/plasma de diversos animais, tais como as serpentes venenosas *Bothrops asper* (Borkow *et al.*, 1997), *Bothrops jararaca* (Tanizaki *et al.*, 1991), *Crotalus durissus terrificus* (Fortes-dias *et al.*, 1994), *Agkistrodon blomhoffii* (Ohkura *et al.*, 1994a), *Vipera palestinae* (Ovadia, 1978), *Naja naja* (Ohkura *et al.*, 1994b) e *Laticauda*

semifasciata (Ohkura *et al.*, 1999), as serpentes não-venenosas *Clelia clelia* (Lomonte *et al.*, 1982) e *Dinodon semicarinatus* (Tomihara *et al.*, 1988), o ouriço-cacheiro *Erinaceus europeus* (de Wit & Weström, 1987; De Wit & Weström, 1987), o mangusto *Herpestes edwardsii* (Tomihara *et al.*, 1987) e o esquilo-terrestre *Spermophilus beecheyi* (Biardi *et al.*, 2000, 2011), entre outros.

Dentre os marsupiais americanos, várias espécies da subfamília Didelphinae, família Didelphidae apresentam resistência natural contra os venenos de viperídeos (Robert S. Voss & Jansa, 2012). Estas espécies se distribuem por todo o continente americano, encontrando-se em simpatria com várias espécies de serpentes crotalíneas. Os estudos de Vellard (Vellard, 1945, 1949) demonstraram experimentalmente, pela primeira vez, a resistência de várias espécies de didelfídeos. Posteriormente, alguns grupos de pesquisa demonstraram a imunidade que apresentam outros marsupiais, como os gambás *Didelphis virginiana* (Werner & Vick, 1977; Catanese & Kress, 1992), *Didelphis aurita* (Perales *et al.*, 1989) e *Didelphis albiventris* (Lovo Farah *et al.*, 1996), além das cuícas *Philander opossum* e *Lutreolina crassicaudata* (Perales *et al.*, 1994).

Neste contexto, a espécie mais estudada é o *Didelphis aurita*, encontrada na região sudeste do Brasil, em simpatria com a serpente *Bothrops jararaca*. O soro de *D. aurita* inibe os efeitos miotóxico (Melo & Suarez-Kurtz, 1988), hemorrágico (Neves-Ferreira *et al.*, 1997), edematogênico (Perales *et al.*, 1992) e hiperalgésico (Rocha *et al.*, 2000) do veneno de *B. jararaca*. A partir dele, foi purificado um complexo antibotrópico (Perales *et al.*, 1994), do qual foram isoladas as proteínas DM40, DM43 (Neves-Ferreira *et al.*, 2000) e DM64 (Rocha *et al.*, 2002). Estas proteínas inibem a ação proteolítica de metaloendopeptidases e a miotoxicidade das fosfolipases A₂, respectivamente.

O *Didelphis marsupialis* é o gambá comum que se distribui desde o sul do México até o norte da América do Sul, na Colômbia, Venezuela, Equador e no norte do Brasil, na Amazônia (A. L. Gardner, 2007). Ao longo de toda sua distribuição geográfica, ele apresenta simpatria com diversas serpentes, tais como a *Bothrops asper* ou a *Bothrops atrox* na região da Amazônia (Campbell & Lamar, 2004). Existem alguns poucos estudos que avaliaram a resistência

destes animais aos venenos de *Bothrops lanceolatus* (Rodriguez-acosta *et al.*, 1993) e *Crotalus vegrandis* (Rodriguez-Acosta *et al.*, 1995). Neste último caso, mostrou-se a neutralização do efeito neurotóxico desta serpente endêmica da Venezuela.

1.6.1 Proteínas isoladas do soro de animais resistentes

Utilizando várias etapas cromatográficas, diversas proteínas foram isoladas e caracterizadas a partir do soro de espécies resistentes a venenos de serpentes. Trata-se de glicoproteínas ácidas, de massas moleculares variáveis, que inibem a ação de metaloendopeptidases ou fosfolipases A₂, inibindo portanto seus efeitos hemorrágico/letal, miotóxico/neurotóxico, respectivamente (Domont *et al.*, 1991; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998; Fortes-Dias, 2002; Lizano *et al.*, 2003; Perales *et al.*, 2005; Duque Osorio *et al.*, 2007; Neves-Ferreira *et al.*, 2010; Bastos *et al.*, 2016).

1.6.1.1 Inibidores de metaloendopeptidases (SVMPs)

Dependendo se foram isoladas de serpentes ou mamíferos, estas proteínas têm diferenças estruturais importantes (Bastos *et al.*, 2016). A maior parte dos inibidores de serpentes foi classificado como pertencente à superfamília das cistatinas. São glicoproteínas de 40 a 70 kDa, com pI menor do que 4, capazes de formar complexos não-covalentes com metaloendopeptidases PI, e/ou PIII (Bastos *et al.*, 2016). As proteínas mais estudadas desta família são a HSF (Habu serum fator) isolada do soro *Protobothrops flavoviridis* (Omori-Satoh *et al.*, 1972; Omori-Satoh, 1977) e a BJ46a isolada do soro de *Bothrops jararaca* (Valente *et al.*, 2001). Estas proteínas têm 86% de identidade da sequência e possuem dois domínios tipo-cistatina (as cistatinas verdadeiras inibem cisteino-proteases). No caso de HSF, foi relatado que, para inibição de uma metaloendopeptidase específica (HV1, uma metaloendopeptidase PIII do veneno de *P. flavoviridis*), haveria a necessidade adicional de complexação com uma proteína sérica de baixa massa molecular (SSP, *Small Serum Protein*)(Shioi *et al.*, 2011).

Algumas outras proteínas presentes no soro de outras serpentes como *Agkistrodon contortrix mokasen* (Gloyd, 1933; Weinstein *et al.*, 1991), *Bothrops asper* (Borkow *et al.*, 1997), *Vipera*

palestinae (Ovadia *et al.*, 1975; Ovadia, 1978), entre outras, ainda não tiveram a estrutura primária caracterizada, não sendo possível classificá-las do ponto de vista estrutural (Bastos *et al.*, 2016).

Nos mamíferos naturalmente resistentes ao envenenamento, foram descritos principalmente inibidores de metaloendopeptidases pertencentes à superfamília gênica das imunoglobulinas. Eles são glicoproteínas ácidas de massas moleculares entre 40 e 100 kDa, estáveis à temperatura e pH (3-10) que foram isolados do soro de várias espécies. Como exemplos, podemos citar a proteína isolada de *Spermophilus beecheyii* (Biardi *et al.*, 2011), as AHF-1, AHF-2 e AHF-3 de *Herpestes edwardsii* (Tomihara *et al.*, 1987; Qi *et al.*, 1994), oprin e AHF de *Didelphis virginiana*, PO41 de *Philander opossum* (Perales *et al.*, 1994; Jurgilas *et al.*, 2003) e DA2-II de *Didelphis albiventris* (Lovo Farah *et al.*, 1996). Estas proteínas se caracterizam por terem alta similaridade de sequência com a α 1B-glicoproteína humana, apresentando vários domínios tipo imunoglobulina em suas estruturas.

O gambá sul americano *Didelphis aurita* é a espécie de mamífero mais bem estudada. De seu soro foram isoladas duas proteínas com atividade anti-hemorrágica que se complexam com metaloendopeptidases: a DM40 e a DM43 (Neves-Ferreira *et al.*, 2000), nomes atribuídos em função das iniciais da espécie, anteriormente denominada *D. marsupialis* (Alfred L. Gardner, 2007) e da massa molecular determinada por espectrometria de massas. Estas glicoproteínas ácidas (pI < 3.5) são termoestáveis (0-100°C) e estáveis a pH (3-10), possuem massas moleculares de 40 e 43 kDa respectivamente e foram isoladas do complexo antibotrópico isolado originalmente do soro deste marsupial.

A DM43 é a proteína mais estudada, apresentando uma cadeia polipeptídica única, com três domínios tipo-imunoglobulina. A glicosilação corresponde a cerca de 21% de sua massa molecular (Neves-Ferreira *et al.*, 2002; Rodriguez León *et al.*, 2012) e conta com a presença de N-acetil glucosamina, manose, galactose e ácido siálico, numa relação molar de 4:3:2:2 (Neves-Ferreira *et al.*, 2002). O glicanos do tipo complexo ocupam os quatro sítios de N-glicosilação da proteína e foram detectadas por espectrometria de massas pelo menos duas glicofomas principais (Brand *et al.*, 2012). A proteína inibiu completamente a atividade

proteolítica das toxinas jararagina (SVMP PIII) e botrolisina (SVMP PI) isoladas de *B. jararaca*, numa relação molar de 1:1, mas não foi capaz de neutralizar as atrolisinas a ou c de *Crotalus atrox* (Neves-Ferreira *et al.*, 2002). A constante de dissociação no equilíbrio do complexo DM43-jararagina foi determinada por ressonância plasmônica de superfície (Biacore), indicando uma alta afinidade de interação (0.33 ± 0.06 nM)(Brand *et al.*, 2012). A proteína ainda não teve sua estrutura terciária determinada, mas está sendo modelada com a ajuda de restrições de distância geradas experimentalmente através de *cross-linking* e/ou troca hidrogênio-deutério acoplados à espectrometria de massas. Usando cromatografia de afinidade, onde a DM43 foi imobilizada covalentemente em coluna HiTrap NHS, mostrou-se que DM43 se liga a diversas (mas não todas) metaloendopeptidases dos venenos de *Crotalus atrox*, *B. atrox*, *B. jararaca* e *B. insularis* (Rocha *et al.*, 2009). Estes dados foram corroborados pelo fato de que a DM43 não interagiu com a HF3 isolada do veneno de *B. jararaca*, que é uma metaloendopeptidase PIII altamente glicosilada (Asega *et al.*, 2014).

A erinacina foi isolada do extrato de músculo esquelético de *Erinaceus europeus* e caracterizada (Mebs *et al.*, 1996). Ela tem alta massa molecular (aproximadamente 1.090 kDa), sendo constituída por duas subunidades iguais (α), que consistem de 10 subunidades de 35 kDa ligadas por pontes dissulfeto e a subunidade β , formada por dez subunidades de 39 kDa (Mebs *et al.*, 1996; Omori-Satoh *et al.*, 2000). A proteína é homóloga às ficolinas alfa e beta, à proteína opsolina P53 e ao antígeno de hakata. Portanto, foi classificada como pertencente à família ficolina/opsolina P53. Ao microscópio eletrônico, a proteína tem uma conformação que lembra um buquê de flores e que é típica dessa família. A proteína não inibiu completamente a atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca*, nem inibiu a TPCK-tripsina ou a quimotripsina. Por outro lado, inibiu completamente a atividade hemorrágica desse veneno e a atividade proteolítica sobre insulina de uma hemorragina isolada de jararaca (Omori-Satoh *et al.*, 2000).

1.6.1.2 Inibidores de fosfolipases A₂

Este componente importante dos venenos também tem inibidores isolados dos soros tanto de serpentes quanto de mamíferos (PLIs ou *Phospholipase Inhibitors*), sendo estas proteínas

também glicoproteínas, mas específicas para as fosfolipases A₂, não apresentando interação com metaloendopeptidases ou outros componentes do veneno. Os PLIs de serpentes são classificados em α , β e γ , como proposto por Okhura (1997). Estas proteínas conseguem inibir tanto o efeito miotóxico como a atividade catalítica das PLA₂ (Campos *et al.*, 2016).

As PLI α são glicoproteínas com massas moleculares de 75 a 150 kDa, que têm em comum um domínio de lectina tipo-C, uma núcleo hidrofóbico na região C terminal e uma alfa hélice super-enrolada entre os resíduos 13 e 36 (Campos *et al.*, 2016). Estas proteínas têm afinidade por fosfolipases A₂ ácidas, mas também por neutras e básicas em alguns casos (Campos *et al.*, 2016).

As PLIs β são glicoproteínas ácidas, de massas moleculares entre 150-160 kDa, e têm uma região rica em leucinas, as quais estão dispostas em *tandem* (Campos *et al.*, 2016). Estes inibidores são específicos para fosfolipases A₂ básicas e formam complexos equimolares com estas toxinas (Naoki Ohkura *et al.*, 1997; Okumura *et al.*, 1998).

Por fim, os inibidores do tipo PLIs γ são os melhor caracterizados, tendo sido encontrados nas famílias Colubridae, Pythonidae, Viperidae e Elapidae (Campos *et al.*, 2016). São glicoproteínas ácidas, de massa molecular maior do que 100 kDa e que apresentam 2 motivos de três dedos (Ohkura *et al.*, 1994b) e uma região rica em prolina na sua estrutura (Dunn & Broady, 2001). Estas proteínas estão subclassificadas como tipo 1 ou 2, dependendo se a estrutura é homologa ao receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (U-PAR)(tipo 1) ou à proteína Ly-6 (tipo 2)(Hains *et al.*, 2001).

Até a presente data, apenas uma proteína que interage com fosfolipases A₂ foi isolada do soro de mamíferos, sendo denominada DM64 (isolada do soro do gambá *D. aurita*) (Rocha *et al.*, 2002). Comprovou-se também que *D. albiventris* tem no soro também uma proteína com atividade antimiotóxica, que infelizmente nunca foi isolada (Soares *et al.*, 1997). Por outro lado, o plasma de *Erinaceus europaeus* demonstrou também ter atividade antifosfolipásica. O inibidor foi parcialmente isolado, encontrando-se uma proteína de aproximadamente 140 kDa, todavia não caracterizada (Lindahl *et al.*, 1991).

A DM64 é uma glicoproteína cujos carboidratos representam 15% da massa total, tem caráter ácido (pI 4.5), 64 kDa de massa molecular e cinco domínios tipo-imunoglobulina. Ela é homóloga a DM43 e DM40 (também isoladas de *D. aurita*) e da oprina, isolada de *D. virginiana*. A DM64 inibiu completamente o efeito miotóxico das miotoxinas I e II de *B. asper* em relações de 2:1 (mol:mol) *in vivo* e 1:1 (mol:mol) *in vitro*. Além disto, formou complexo com ambas miotoxinas, mas não conseguiu inibir a atividade enzimática da miotoxina I, uma fosfolipase A₂ cataliticamente ativa (Rocha *et al.*, 2002). Assim como a DM43, a estrutura tridimensional de DM64 está sendo resolvida através de uma abordagem híbrida, juntando métodos experimentais de baixa resolução e modelagem molecular. Mostrou-se ainda que esta proteína não se liga universalmente a todas as fosfolipases de veneno, mas consegue se complexar com diversas fosfolipases A₂ de *B. asper*, tanto básicas como ácidas (Rocha *et al.*, 2017).

Uma vez que inibidores naturais de toxinas de venenos de serpentes são capazes de inibir de maneira eficaz tanto os efeitos sistêmicos graves (ex.: hemorragia), quanto os efeitos locais (ex.: hemorragia e mionecrose) do envenenamento, que não costumam ser bem neutralizados pelos antivenenos comerciais, estas proteínas são consideradas promissoras como fonte de *templates* para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. A ideia seria utilizar moléculas de natureza peptídica eficazes na neutralização das principais toxinas responsáveis pelos efeitos deletérios dos venenos, uma abordagem denominada *toxin-centric* (Laustsen, 2018), como drogas adjuvantes na soroterapia tradicional. Como a especificidade destes inibidores contra diferentes venenos é moldada através do fenômeno de coevolução entre espécies simpátricas, é importante a caracterização de diferentes variantes destes inibidores, de forma a ampliar nosso conhecimento acerca de sua relação estrutura-função, eventualmente levando ao desenvolvimento de inibidores eficazes contra um repertório mais amplo de toxinas de venenos homólogos.

Objetivo principal:

Neste contexto, os objetivos principais desta dissertação de mestrado foram: 1) isolar e caracterizar bioquímica- e funcionalmente a(s) proteína(s) com propriedade(s) antiofídica(s) presente(s) no soro do marsupial colombiano *Didelphis marsupialis* do departamento do Cauca, Colômbia; 2) caracterizar o veneno da serpente simpátrica *Bothrops rhombeatus* segundo suas principais atividades biológicas e seu conteúdo proteico.

Objetivos específicos:

- Caracterização da presença de proteína(s) com atividade antiofídica no soro de *Didelphis marsupialis* da Colômbia;
- Isolamento, caracterização bioquímica e análise da imunorreatividade desta(s) proteína(s), comparando-as com as proteínas DM43 e DM64 isoladas do soro de *Didelphis aurita* do Brasil;
- Caracterização funcional da(s) proteína(s) isolada(s) do soro do gambá colombiano, analisando sua capacidade de inibir atividades tóxicas dos venenos das serpentes *Bothrops rhombeatus* (Colômbia) e *B. asper* (Costa Rica);
- Análise por proteômica *shotgun* do conteúdo proteico do veneno da serpente colombiana *B. rhombeatus*, espécie pouco estudada encontrada na mesma região geográfica do *D. marsupialis* (*i.e.*, simpátrica).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

a) Soro de *D. marsupialis* e *D. aurita*

Quatro espécimes de *Didelphis marsupialis* foram capturados na periferia da cidade de Popayán (Cauca, Colômbia) usando armadilhas *Tomahawk live trap*®. Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina/quetamina (0.3:1 v/v)(0.5 mL de anestésico/kg animal) e posteriormente o sangue extraído da veia jugular foi coletado em tubos sem anticoagulante e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos (volume final de sangue obtido: 50 mL). Após este tempo de coagulação, o sangue foi centrifugado a 860 x g por 15 minutos, a 8°C. O sobrenadante obtido (volume final de soro obtido: 25 mL) foi misturado, liofilizado e estocado a -20°C para formar um pool, procedimento feito no *Centro de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas* da *Universidad del Cauca*, em Popayán, Colômbia. A coleta de animais foi amparada pela resolução 0152 de 15 de fevereiro de 2015 do ministério do meio ambiente da Colômbia, que outorga permissão de coleta para a *Universidad del Cauca*, e aprovado pelo comitê de bioética da Vicerectoria de Investigaciones da Universidad del Cauca segundo acta N°6.1 – 1.25/09 do 19 de junho de 2019. O soro de *Didelphis aurita* foi doado pelo Laboratório de Toxinologia da Fiocruz, o qual foi obtido de maneira similar, de animais capturados nas cercanias da cidade do Rio de Janeiro, Brasil, amparado pela licença de coleta SISBIO No. 13373-1, licença CEUA/IOC L036/2018 e cadastro no SISGEN AF0A111

b) Venenos

O veneno de *Bothrops rhombeatus* foi extraído manualmente de 3 espécimes mantidos em cativeiro na *Universidad del Cauca*, em Popayán, Colômbia. O veneno foi coletado, misturado para formar um *pool*, centrifugado a 20000 x g por 15 minutos e o sobrenadante coletado foi liofilizado e estocado a -20°C. A coleta foi amparada pela permissão de coleta e com aprovação do comitê de bioética descritos acima. Os venenos liofilizados de *Bothrops*

jararaca e *B. asper* do pacífico da Costa Rica foram gentilmente cedidos pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil) e pelo Instituto Clodomiro Picado (San José, Costa Rica), respectivamente. O acesso ao veneno de *B. jararaca* está devidamente amparado pelo registro SISGEN AF0A111.

2.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteína do soro de *D. marsupialis* e dos venenos botrópicos foi feita pelo método do ácido bicinchonínico [*Bicinchoninic acid* (BCA)], como descrito por Smith *et al.* (1985), utilizando o kit BCA1, da Sigma-Aldrich. A curva de proteína padrão foi preparada com albumina de soro bovino [Bovine Serum Albumin (BSA)], variando de 0-50 µg de proteína, sempre no volume final de 100 µL. As amostras desconhecidas foram dissolvidas em água MilliQ e diluídas o suficiente de forma a não extrapolar a concentração limite de 0,5 µg/µL. Para cada 100 µL de solução de BSA ou amostra desconhecida, foram adicionados 2 mL do reagente de trabalho composto por 50 partes da solução de ácido bicinchonínico e 1 parte da solução de sulfato de cobre a 4% (p/v). Após incubação a 37°C por 30 min, 200 µL de cada mistura foram transferidos para uma placa de 96 poços, que foi lida a 562 nm.

2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise dos perfis proteicos dos soros e dos venenos foi feita por SDS-PAGE a 12% T, na presença do agente redutor ditioneitol (DTT) (Laemmli, 1970), utilizando o sistema Vert-i10 (Loccus Biotecnologia). As condições de corrida foram 200 V por 1:15 h, usando um tampão feito de tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0.1% (p/v). Após a corrida, o gel foi fixado com 50 mL de uma solução de ácido acético 10% (v/v) contendo 50% (v/v) de etanol, por 30 minutos, e posteriormente corado por azul de Coomassie R250 0,1% (p/v) em solução fixadora *overnight*. O excesso de corante foi retirado por lavagens com a solução fixadora e com água. O gel foi guardado em água MilliQ e escaneado no *scanner* ImageScanner III (GE healthcare).

2.4 Atividade proteolítica dos venenos de *B. rhombeatus* e *B. jararaca*

Esta atividade foi medida usando azocaseína como descrito por Charney & Tomarelli (1947). A azocaseína foi preparada a 0,5% (p/v) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,6 contendo NaCl 100 mM, em banho-maria. Posteriormente, foi misturada com CaCl₂ 20 mM em uma relação 1:1 (v/v). Em seguida, a solução de azocaseína foi incubada a 37°C com o veneno (25 azocaseína: 1 veneno, p:p), retirando-se alíquotas a cada 2 minutos, que eram posteriormente misturadas ao ácido tricloroacético 15% (v/v) para precipitar as proteínas que sofreram pouca/nenhuma hidrólise. Após centrifugação por 10 minutos à temperatura ambiente a 18.000 x g, foram retiradas alíquotas de 150 µL do sobrenadante, às quais foram adicionados 150 µL de NaOH 0,5 M. A absorvância da amostra foi determinada a 380 nm. Para determinação da inibição da atividade caseinolítica, o veneno foi incubado por 10 min a 37 °C em 100 µM do inibidor de serinoendopeptidase APMSF, 10 mM do inibidor de metaloendopeptidase 1,10-fenantrolina ou soro de *D. marsupialis* (veneno:soro 1:20 m/m). Em seguida, a atividade caseinolítica residual foi determinada como descrito anteriormente. Como controle do inibidor APMSF, fizemos curvas de progresso de tripsina (5 µg) na ausência ou presença do inibidor. Cada experimento foi feito em duplicata (técnica e biológica).

2.5 Atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus*

A atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* foi testada segundo o método de Theakston e Reid (1983), que definiu a Dose Coagulante Mínima (DCM). Alíquotas de um *pool* de plasma humano citratado ou fibrinogênio bovino à 0,3% (p/v) (200 µL) foram incubadas por 3 minutos a 37°C e posteriormente misturadas com 100 µL das soluções de veneno em diferentes concentrações, medindo-se o tempo até a formação de um coágulo visível (a solução se torna opaca e se gelifica ou começam a aparecer fibras brancas no meio da solução). Como controle positivo do ensaio, utilizamos a enzima trombina bovina (2.5 UI/mL). Os dados foram plotados em um gráfico linear, cujo eixo x representa o logaritmo de base 10 das concentrações de veneno e o eixo y, o logaritmo de base 10 dos tempos de coagulação medidos em segundos. A dose coagulante mínima é definida como a

concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ou quantidade de veneno (medido em peso seco ou proteína) que induz a formação de coágulo em 60 segundos. Para os ensaios de inibição, 2 doses coagulantes mínimas do veneno de *B. rhombeatus* foram incubadas, por 5 minutos a 37°C , com APMSF ($100\ \mu\text{M}$) ou 1-10 fenantrolina ($10\ \text{mM}$) ou com concentrações crescentes de soro de *D. marsupialis* ou das proteínas antiofídicas isoladas deste. O restante do procedimento foi igual ao descrito anteriormente, usando uma solução de veneno como controle positivo e, como controle negativo, tampão, soro, ou as proteínas purificadas do soro. Cada grupo foi analisado para comparar o grupo controle com os outros, utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, devido ao baixo número de amostras, com nível de significância estatística do 0.05%, utilizando o programa GraphPad Prisma 5. Finalmente realizamos um teste de correlação de Spearman (não paramétrico), entre o soro e as proteínas purificadas, para verificar que existe uma correlação entre a atividade neutralizante do soro e as das proteínas purificadas, com o programa R.

2.6 Atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops asper*

Para este ensaio, foi utilizado o kit EnzChek phospholipase A_2 ® (Thermo Scientific). O veneno de *Bothrops asper* da Costa Rica ($0,5\ \mu\text{g}$ em $50\ \mu\text{L}$) foi misturado com $50\ \mu\text{L}$ da mistura de lipídeos [dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) $10\ \text{mM}$, dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG) $10\ \text{mM}$ e substrato fluorescente de PLA_2 (FRET-based Red/Green BODIPY PC-A2) $1\ \text{mM}$] em tampão Tris-HCl $50\ \text{mM}$, NaCl $100\ \text{mM}$, CaCl_2 $1\ \text{mM}$, pH 8,9, em uma placa escura de fundo chato, com 96 poços. Imediatamente, a placa foi levada ao fluorímetro Gemini XPS e as amostras foram incubadas a 37°C e monitoradas por 10 minutos, usando um comprimento de onda de excitação de $460\ \text{nm}$ e de emissão de $515\ \text{nm}$. Os dados foram recolhidos com o programa Softmax Pro (Molecular Devices). Como controle negativo, usou-se somente tampão. A inibição foi testada utilizando quantidades veneno ($0,5\ \mu\text{g}$) incubado com soro (1:80 m/m), ou com as proteínas isoladas DM64-like ou DM43-like (1:2 m/m). Como controles de inibição, o veneno foi testado na presença de: 1) $10\ \text{mM}$ de p-BPB em 5%(v/v) de etanol; 2) 5% (v/v) de etanol.

2.7 Western blotting seguido de imunorrevelação

a) Gel unidimensional

O soro de *D. marsupialis* foi fracionado por SDS-PAGE a 12% T, preparado como descrito anteriormente, assim como o soro de *D. aurita* e as proteínas isoladas DM43 e DM64. As proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando um equipamento de transferência do tipo “semi-dry” (Amersham ECL semi-dry blotter-GE Healthcare Life Sciences), utilizando um tampão de transferência composto de tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), pH 8,3 a 4°C. A transferência foi feita por 1:30 h a 80 mA/gel. Após finalizada a transferência, se verificou a presença de proteínas na membrana através da revelação com vermelho de Ponceau [solução a 0,2% (p/v) em ácido acético 2% (v/v)], seguido de lavagem com água MilliQ e tampão TBS [tris 25mM, NaCl 140 mM, KCl 2 mM, Tween-20 0,05% (v/v)] pH 8,0, até a total descoloração da membrana. Para evitar a ligação inespecífica de anticorpos, a membrana foi inicialmente incubada com uma solução bloqueadora (leite desnatado em pó a 5% (p/v) em tampão TBS) a 4°C *overnight*, sob agitação contínua. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens à temperatura ambiente por 10 minutos, sob agitação contínua, seguido de incubação com antissoro completo policlonal anti-DM43 ou anti-DM64 diluído em tampão TBS [1:100 (v/v)], por 2 h, à temperatura ambiente, sob agitação contínua. Após 3 lavagens de 10 minutos, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, com tampão TBS, procedeu-se à incubação com anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich A0545 lote #17M485OV), diluído em tampão TBS (1:5000 (v/v)), por 2 h, à temperatura ambiente, sob agitação contínua. Em seguida, foram realizadas mais 3 lavagens (10 min cada) com tampão TBS, à temperatura ambiente, sob agitação contínua. Por fim, a membrana foi revelada na presença de peróxido de hidrogênio e do substrato cromogênico 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (1 pastilha de DAB dissolvida em 15 mL de água MilliQ). Para interromper a revelação, a membrana foi lavada com água MilliQ. Após secagem à temperatura ambiente, a imagem da membrana foi digitalizada no densitômetro ImageScanner III (GE healthcare).

b) Gel bidimensional:

Para a focalização isoeletrica, o soro de *D. marsupialis* foi precipitado usando etanol/acetona e ressolubilizado no tampão de reidratação [ureia 8 M, CHAPS 2% (p/v)], azul de bromofenol 0,002 % (v/v), DTT 1,5% (p/v), anfólito pH 3-10 1% (v/v)). A solução foi colocada no *strip holder*, onde o *strip* foi posicionado para reidratação, com o gel voltado para a solução. Após cobrir a solução com óleo mineral para evitar ressecar o *strip*, a focalização foi feita em um equipamento Ettan IPGPhor 3 (GE healthcare), seguindo-se 6 passos: 1) 30 volts por 12 horas (reidratação do gel); 2) 200 volts por 1 hora; 3) 500 volts por 1 hora; 4) 1.000 volts por 1 hora; 5) 1.000 a 3.500 volts em 30 min. 6) 3.500 volts por 18.000 vh. Após a focalização isoeletrica, o *strip* foi incubado em solução de DTT 0.1% (p/v) (redução das pontes dissulfeto), seguido de incubação em solução de iodoacetamida 0,4% (p/v) (alquilação das sulfidrilas livres), cada passo por 10 min, à temperatura ambiente, sob agitação contínua, em tampão de equilíbrio (tris-HCl 1,5 M pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2%, azul de bromofenol 0.002% (p/v)). Em seguida, o *strip* foi colocado em cima de um gel de SDS-PAGE 12 %T sem gel de empilhamento, selando-se com agarose 1% (p/v). As condições de corrida foram: 1) 3 mA/gel por 30 minutos para transferir as proteínas do *strip* para o gel; 2) 10 mA/gel por 1:30 h para realizar a corrida propriamente dita. Após o término da corrida eletroforética, as proteínas separadas no gel bidimensional foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para imunorrevelação, como descrito anteriormente.

2.8 Purificação da(s) proteína(s) antiofídica(s) do soro de *Didelphis marsupialis* colombiano

a) Diálise do soro de *D. marsupialis*

O soro resuspenso em tampão PBS (50 mL) foi colocado em uma membrana semi-permeável (Spectrum Labs) e incubado por 24 h em um béquer de 1000 mL contendo acetato de sódio 0,01 M pH 3,7, sob agitação constante, a 4°C, trocando-se a solução uma vez e deixando por outras 24 h sob agitação a 4°C.

b) Cromatografia de troca aniônica

A purificação das proteínas com atividade antiofídica foi feita no sistema cromatográfico AKTA Purifier 10 (GE Healthcare), utilizando inicialmente uma coluna de DEAE-Sepharcel (0,56 x 7,5 cm) equilibrada com tampão acetato de sódio 0,01 M pH 3,7. Amostras de soro foram injetadas no sistema e a corrida foi feita a um fluxo de 0,5 mL/min, com gradiente de eluição de NaCl de 0-0,5 M, durante 5 volumes de coluna (66.25 mL), coletando-se frações de 0,5 mL/tubo. Durante a cromatografia, a absorvância foi monitorada continuamente a 280 nm.

c) Purificação da(s) proteína(s) similar(es) a DM43

A fração soro que interagiu com a resina de DEAE foi dessalinizada em coluna PD10, seguida de nova cromatografia em coluna de afinidade HiTrap NHS (1 mL) contendo miotoxina II do veneno de *B. asper* imobilizada. Este passo foi necessário para depleção da fração DM43-like de contaminação por DM64-like, já que apenas esta última interage com miotoxina II. A coluna foi pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, contendo NaCl 0,1 M pH 7,5, por 10 volumes de coluna. A cromatografia foi feita com fluxo isocrático (1 mL/min) por 5 volumes de coluna em tampão Tris-HCl 0,02 M, contendo NaCl 0,1 M pH 7,5, seguido por um fluxo isocrático (1 mL/min) de 5 volumes de coluna de tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,7. Durante a cromatografia, a absorvância foi monitorada continuamente a 280 nm e foram coletadas frações de 0,5 mL/tubo. A amostra DM43-like utilizada nos ensaios desta dissertação corresponde à fração proteica que não interagiu com a coluna de afinidade de miotoxina II.

d) Purificação da(s) proteína(s) similar(es) a DM64

A fração do soro que não interagiu com a resina de DEAE foi dialisada em tampão tris-HCl 0,02 M contendo NaCl 0,1 M pH 7,5, sendo posteriormente submetida à coluna HiTrap HNS (1 ml) contendo miotoxina II de *B. asper* imobilizada como descrito anteriormente. A

amostra DM64-like utilizada nos ensaios desta dissertação corresponde à fração proteica que interagiu com a coluna de afinidade de miotoxina II.

e) Monitoramento do fracionamento cromatográfico

Cada uma das separações cromatográficas foi monitorada por SDS-PAGE a 12 %T em condições redutoras, como descrito anteriormente. Um *Western blotting* foi realizado como descrito anteriormente para confirmar a presença de proteínas similares a DM43 e DM64 nas frações cromatográficas.

2.9 Identificação da(s) proteína(s) antiofídica(s) do soro de *Didelphis marsupialis* colombiano

As principais bandas observadas no gel de eletroforese das frações cromatográficas do soro foram cortadas e processadas individualmente na seguinte sequência: a) descoloração com uma solução 1:1 (v/v) de acetonitrila / bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0; b) desidratação com acetonitrila 100% *overnight*; c) secagem por centrifugação a vácuo; d) redução em ditioneitol 65 mM, a 37°C, por 30 minutos; e) alquilação em iodoacetamida 200 mM, à temperatura ambiente, por 30 minutos; f) lavagem com bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente; g) reidratação com bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente; h) desidratação com acetonitrila 100%, secagem no *SpeedVac* e reidratação com 15 µL da solução de tripsina 20 ng/µL em ácido acético 50 mM por 45 minutos no gelo. Em seguida, as amostras foram incubadas por 24h a 37°C para digestão trípica. Os peptídeos trípticos foram extraídos dos pedaços de gel com uma solução de acetonitrila 50% (v/v) contendo ácido fórmico 5% (v/v), seguido de agitação no vórtex e incubação no banho de ultrassom por 10 min. Finalmente, os peptídeos foram secos por centrifugação a vácuo e ressolubilizados em ácido fórmico a 1% (v/v). Estes peptídeos foram analisados por nLC-nESI-MS/MS no espectrômetro de massas QExactive Plus (Thermo). Os peptídeos foram injetados em uma pré-coluna de 2 cm (100 µm de diâmetro interno, *frit* de Kasil de 1-2 mm) empacotada com resina Magic C18AQ (partículas de 5 µm e 200 Å, Michrom Bioresources, Inc.). Para o fracionamento, utilizou-se uma coluna de 26 cm (75 µm

de diâmetro interno) empacotada *in-house* com ReprosilPur C18 AQ (poro de 120 Å e diâmetro de partícula 1,9 µm). A eluição foi feita a 200 nL/min no sistema nUHPLC Dionex Ultimate 3000, com as seguintes condições: fase móvel A: 0,1% de ácido fórmico em água; fase móvel B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. Gradiente de eluição: 2-40% em 162 min; 40-80%B em 4 min; 80% B por 2 min. Os espectros de MS1 (300 - 1.500 *m/z*, modo *profile*) foram adquiridos com 70.000 de resolução (FWHM para *m/z* 400), *Automatic gain control* (AGC) 1E6 e tempo máximo de injeção (IT) de 100 ms. Para cada espectro de varredura, até 12 íons precursores mais intensos foram selecionados para fragmentação por HCD (*higher energy collision-induced dissociation*), com energia de colisão normalizada em 30%, janela de isolamento de 2,0 *m/z* (*offset* de 0,5 *m/z*) e exclusão dinâmica de 60 segundos. Os espectros de fragmentação foram adquiridos no modo centroide, com resolução de 17.500 (FWHM para *m/z* 400), AGC 5E4 e IT 50 ms. Precursores com carga +1 ou sem estado de carga definido foram ignorados. Os arquivos .RAW foram submetidos ao algoritmo Peaks X+, que fez a identificação por *peptide-spectrum matching* (PSM) contra um banco de dados composto de: 1) sequências obtidas do UniProtKB filtradas para “Didelphidae” (taxon ID # 9265: 100 sequências do SwissProt + 25.230 sequências do trEMBL, *download* em 01/04/2019); 2) Sequência da proteína DM64 madura; 3) Sequências de 115 contaminantes comuns obtidas de www.thegpm.org/crap. Todas as sequências *target* foram revertidas automaticamente pelo Peaks para permitir a validação das identificações com base no cálculo de FDR (*false discovery rate*). Os parâmetros de busca utilizados foram: a) enzima tripsina com especificidade *fully-tryptic*, máximo de 2 clivagens perdidas; b) modificação fixa em cisteína (+57,0215) e nenhuma modificação variável; c) tolerância de 10 ppm no MS1 e 0,02 Da no MS2. As identificações foram filtradas de modo a permitir, no máximo, 1% de FDR para PSM e peptídeos. No caso de proteínas, foi definido o máximo de 1% de FDR e pelo menos 2 peptídeos únicos identificados.

2.10 Determinação do ponto isoelétrico das proteínas DM64-like e DM43-like

As preparações de proteínas purificadas foram diluídas em água milliQ para 1 mg/mL de proteína e, posteriormente, 25 µL (25 µg) foram completados até 125 µL com tampão de reidratação e submetidos à focalização isoelétrica em *strip* de pH 3-10, seguido de

fracionamento por SDS-PAGE. Todo o procedimento foi feito como descrito anteriormente. O gel foi corado com Coomassie R-250 e a imagem foi digitalizada para posterior análise no programa ImageMaster 2D Elite.

2.11 Determinação da presença de glicosilação

a) Desglicosilação com PNGase

Amostras DM43-like e DM64-like (15 µg de cada) foram desnaturadas com SDS (0.5% (p/v) concentração final) e DTT (0.04 M concentração final) e incubadas a 100°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados NP-40 (concentração final 1% v/v), fosfato de sódio 0,5 M pH 7,5 e a enzima PNGase-F (750 UI³), incubando-se a 37°C, por 1 hora. Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise por SDS-PAGE a 12 %T. Como controle, utilizamos amostras submetidas aos mesmos procedimentos, sem adição de PNGase. O gel foi revelado com Coomassie R-250 e a imagem digitalizada foi analisada no programa ImageMaster 2D Elite para cálculo das massas moleculares relativas.

b) Revelação com a coloração de ácido periódico-Schiff

Um segundo gel igual ao revelado acima por Coomassie foi submetido à revelação específica para glicoproteínas usando o *Pierce Glycoprotein Staining Kit*. Após a corrida, o gel foi fixado por 30 minutos com metanol 50% (v/v), lavado três vezes com ácido acético 3% (v/v) por 10 minutos, incubado por 15 minutos com o agente oxidante (ácido periódico), lavado três vezes mais com ácido acético 3% (v/v) por minutos, incubado por 15 minutos com a solução corante (Fucsina, metabissulfito de sódio), incubado por 5 minutos com o agente redutor (metabissulfito de sódio) e finalmente lavado com ácido acético 3% (v/v) até o aparecimento de bandas de coloração rosa. Como controle positivo, aplicamos no gel a

³ Purificada de *Flavobacterium meningosepticum*. 500,000 U/µL. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima requerida para remover >95% do carboidrato de 10 µg da RNAase B em 1 hora em 37°C num volume de reação total de 10 µL.

peroxidase de raiz-forte (*Horseradish peroxidase*) e, como controle negativo, o inibidor trípico de soja (5 µg cada um).

2.12 Análise da formação de complexos

a) Interação entre DM64-like e miotoxina II

Foram testadas diferentes relações molares entre DM64-like:miotoxina II isolada do veneno de *Bothrops asper* (PLA₂-like K49, gentilmente doada pelo Dr. Bruno Lomonte, Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica). Em todos os casos, a quantidade de miotoxina foi mantida constante, variando-se a quantidade de DM64-like da seguinte forma: 1:0.5, 1:1 e 1:2 (mol/mol). Em cada relação molar testada, a toxina e o inibidor foram incubados a 27°C por 10 minutos no Turbomixer. Em seguida, a mistura foi adicionada ao tampão de amostra de eletroforese em condições nativas (*i.e.*, sem adição de SDS ou DTT). Amostras de DM64-like e miotoxina II foram usadas como controles. Um controle de especificidade também foi feito incubando-se DM64-like e a jararagina, metaloendopeptidase isolada do veneno de *B. jararaca* (1:1 mol/mol). A eventual interação entre inibidor e toxina foi analisada em gel de poliacrilamida a 12 %T em condições nativas, a 200 V constantes. Finalmente, o gel foi corado por impregnação com nitrato de prata como descrito a seguir (item c). Para identificação das proteínas no gel, fez-se uma digestão *in gel* de cada banda de interesse, seguido de análise por nLC-MS/MS, como descrito no item 2.9.

b) Interação entre DM43-like e jararagina

A fração DM43-like foi misturada em diferentes relações molares (tomando como base a massa molecular de DM43) com a toxina jararagina isolada do veneno de *B. jararaca*, exatamente como descrito no item anterior para DM64-like e miotoxina II. Um controle de especificidade também foi feito incubando-se DM43-like e miotoxina II (1:1 mol/mol).

c) Revelação por impregnação com nitrato de prata

Os géis foram fixados com 50 mL de uma solução de etanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) *overnight* e posteriormente sensibilizados com etanol 30% (v/v), glutaraldeído 0,5% (v/v), tiosulfato de sódio 0,2% (p/v) e acetato de sódio triidratado 12% (p/v). Foram feitas três lavagens de dois minutos com água MilliQ e, posteriormente, se adicionou a solução de nitrato de prata 0.25% (p/v) e formaldeído 0.04% (v/v) por 20 minutos sob agitação. Em seguida, foi feita uma lavagem com água MilliQ três vezes por 20 segundos para retirar o excesso de nitrato de prata, seguido de revelação com carbonato de sódio 2.5% (p/v), formaldeído 0.02% (v/v), tiosulfato de sódio 0.001% (p/v) em água, agitando-se bem até o aparecimento das bandas. A revelação foi interrompida incubando-se com solução de EDTA 1,5%. Finalmente, os géis foram digitalizados e as bandas selecionadas foram submetidas à digestão *in gel*.

2.13 Análise do veneno da serpente colombiana *Bothrops rhombeatus*

a) Digestão *in-gel* e análise por MALDI-TOF/TOF

O veneno de *B. rhombeatus* foi analisado inicialmente por SDS-PAGE em condições redutoras e não-redutoras. As condições usadas foram as mesmas descritas anteriormente para SDS-PAGE. Foram feitos dois géis iguais, para revelação de proteínas totais (azul de Coomassie) e glicoproteínas (PAS-Schiff). As bandas reveladas por azul de Coomassie foram cortadas e digeridas *in gel* com tripsina, como descrito no item 2.9. Os peptídeos trópticos dos digestos de gel foram analisados por MS/MS no MALDI-TOF/TOF 5800 (ABI Sciex), operando no modo refletor positivo. Os espectros foram adquiridos com *delayed extraction*, com cerca de 2.000 tiros de laser por *spot*. Os peptídeos trópticos dessalinizados em colunas de *zip-tip* C18 (0,3 µL) foram misturados com igual volume de uma solução saturada de matriz [10 mg/mL de ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila em 0.1% (v/v) TFA em água. Em seguida, a mistura foi depositada na placa metálica para cristalização. Cinco peptídeos foram utilizados para calibração externa no modo MS: des-Arg1-bradicinina (m/z 904,4680); angiotensina I (m/z 1296,6850); Glu1-fibrinopeptídeo B (m/z 1570,6770);

ACTH (1–17) (m/z 2093,0870) e ACTH (18–39) (m/z 2465,1990). Os 15 íons precursores mais abundantes foram selecionados para fragmentação por PSD (*post-source-decay*). Os espectros de fragmentação gerados pelo MALDI-TOF/TOF 5800 foram transformados em arquivos PKL utilizando um programa de conversão fornecido pela Bioinformatics Solutions (ABI 4700 Data Extractor). Estes arquivos foram então submetidos ao programa PeaksX+ para busca contra o banco de dados composto de: 1) sequências obtidas do UniProtKB usando “Serpentes” (taxon ID # 8570) como filtro taxonômico (2.626 sequências do SwissProt + 153.567 sequências do trEMBL, *download* em 13/02/2020); 2) Sequências de 115 contaminantes comuns obtidas de www.thegpm.org/crap. Os parâmetros de busca utilizados foram: a) enzima tripsina com especificidade *fully-tryptic*, máximo de 2 clivagens perdidas; b) modificação fixa em cisteína (+57,0215) e nenhuma modificação variável; c) tolerância de 50 ppm no MS1 e 0,3 Da no MS2. O *software* Scaffold (versão 4.5.3, Proteome Software) foi utilizado para validação das identificações de peptídeos e proteínas, aceitando-se probabilidades mínimas de 95% calculadas pelos algoritmos Peptide Prophet e Protein Prophet, respectivamente.

b) Proteômica *shotgun*

O veneno de *B. rhombeatus* (50 µg) foi solubilizado em solução de ureia 8 M em bicarbonato de amônio 0,4 M. Em seguida, foi reduzido por 3 horas a 37 °C em 10 mM de ditioneína e alquilado por 15 minutos em 25 mM de iodoacetamida, no escuro, à temperatura ambiente. Após diluição da ureia para 1 M, adicionou-se tripsina (1 enzima:50 veneno, m/m), por 18-24 h, a 37°C. A reação foi interrompida com ácido trifluoroacético 10% (v/v) (q.s.p. 1%) e os peptídeos tripticos foram dessalinizados em microcolunas de fase reversa R2, secos por centrifugação a vácuo e ressolubilizados em ácido fórmico a 1% (v/v). Estes peptídeos foram analisados por nLC-nESI-MS/MS no espectrômetro de massas QExactive HF-X (Thermo). Os peptídeos foram injetados em uma pré-coluna de 2 cm (100 µm de diâmetro interno, *frit* de Kasil de 1-2 mm) empacotada com resina Magic C18AQ (partículas de 5 µm e 200 Å, Michrom Bioresources, Inc.). Para o fracionamento, utilizou-se uma coluna de 29,5 cm (75 µm de diâmetro interno) empacotada *in-house* com ReprisilPur C18 AQ (poro de 120 Å e diâmetro de partícula 1,9 µm). A eluição foi feita a 200 nL/min no sistema nUHPLC EASY

1200, com as seguintes condições: fase móvel A: 0,1% de ácido fórmico em água; fase móvel B: 0,1% de ácido fórmico em 80% de acetonitrila. Gradiente de eluição: 2-50% em 153 min; 50-100%B em 4 min; 100% B por 2 min. Os espectros de MS1 (350 - 1.400 m/z , modo *profile*) foram adquiridos com 60.000 de resolução (FWHM para m/z 200), *Automatic gain control* (AGC) 3E6 e tempo máximo de injeção (IT) de 45 ms. Para cada espectro de varredura, até 20 íons precursores mais intensos foram selecionados para fragmentação por HCD (*higher energy collision-induced dissociation*), com energia de colisão normalizada em 28%, janela de isolamento de 1,3 m/z (*offset* de 0,5 m/z) e exclusão dinâmica de 30 segundos. Os espectros de fragmentação foram adquiridos no modo centroide, com resolução de 15.000 (FWHM para m/z 200), AGC 1E5 e IT 20 ms. Precursores com carga +1 ou sem estado de carga definido foram ignorados. Os arquivos .RAW foram submetidos ao algoritmo Peaks X+, que fez a identificação por *peptide-spectrum matching* (PSM) contra o mesmo banco de dados utilizado para os dados de MALDI-TOF/TOF. Todas as sequências *target* foram revertidas automaticamente pelo Peaks para permitir a validação das identificações com base no cálculo de FDR (*false discovery rates*). Os parâmetros de busca utilizados foram: a) enzima tripsina com especificidade *fully-tryptic*, máximo de 2 clivagens perdidas; b) modificação fixa em cisteína (+57,0215) e nenhuma modificação variável; c) tolerância de 10 ppm no MS1 e 0,02 Da no MS2. As identificações foram filtradas de modo a permitir, no máximo, 1% de FDR para PSM e peptídeos. No caso de proteínas, foi definido o máximo de 1% de FDR e pelo menos 2 peptídeos únicos identificados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho procurou isolar e caracterizar físico-quimicamente a(s) proteína(s) antiofídica(s) presentes no soro sanguíneo de *D. marsupialis* e caracterizar as principais atividades biológicas do veneno de *Bothrops rhombeatus*, analisando seu conteúdo proteico através da proteômica *shotgun*. A serpente *B. rhombeatus* e o gambá *D. marsupialis* habitam a mesma região geográfica colombiana (espécies simpátricas). Através de mecanismos de coevolução, o marsupial desenvolveu resistência aos efeitos tóxicos do veneno, que é muito pouco estudado pela comunidade científica. Neste contexto, esta dissertação foi dividida em três etapas, a saber: 1) Análise sistemática da atividade antiofídica do soro do *D. marsupialis* colombiano; 2) Purificação e caracterização bioquímica da(s) proteína(s) antiofídica(s) do soro do *D. marsupialis* colombiano; 3) Caracterização da composição proteica do veneno de *Bothrops rhombeatus* por técnicas proteômicas.

3.1 Análise da atividade neutralizante do soro do *D. marsupialis* colombiano sobre o veneno de *B. rhombeatus*

3.1.1 Dosagem de proteínas

A Tabela 3.1 mostra o conteúdo proteico (em mg/mL) dos soros de *D. marsupialis* (Colômbia) e *D. aurita* (Brasil). No caso dos venenos liofilizados de *B. rhombeatus* (Colômbia) e *B. jararaca* (Brasil), os conteúdos proteicos foram expressos em termos de percentual relativo ao peso seco. Nos dois casos, as dosagens foram feitas em três experimentos independentes, utilizando a técnica do ácido bicinchonínico e BSA como proteína padrão (Smith *et al.*, 1985).

BCA	Dosagem 1 (mg/mL)	Dosagem 2 (mg/mL)	Dosagem 3 (mg/mL)	Média (mg/mL)	SD (mg/mL)	CV%
Soro <i>D. aurita</i>	59,60	52,85	48,91	53,79	5,41	10,05
Soro <i>D. marsupialis</i>	63,17	63,00	60,09	62,09	1,73	2,79
BCA	Dosagem 1 (%)	Dosagem 2 (%)	Dosagem 3 (%)	Média (%)	Desvio	CV%
<i>B. rhombeatus</i>	75,39	79,85	75,29	76,85	2,60	3,39
<i>B. jararaca</i>	72,18	79,85	76,40	76,14	3,84	5,05

Tabela 3.1. Dosagem de proteínas do veneno de *B. rhombeatus* e *B. jararaca* e dos soros sanguíneos de *D. marsupialis* e *D. aurita*. Em cada um dos três experimentos independentes realizados, as concentrações proteicas das amostras e da curva padrão foram determinadas em duplicata técnica.

3.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras

A Figura 3.1 mostra o perfil de SDS-PAGE das amostras utilizadas neste trabalho. As proteínas DM43 e DM64 de *D. aurita* foram incluídas como referência, para ajudar na comparação dos soros de *D. marsupialis* e *D. aurita*. Os perfis eletroforéticos dos dois soros foram bastante similares, com uma pequena diferença no padrão de bandas na região de 45 kDa. Quanto aos venenos, foram incluídas mais duas espécies de serpentes colombianas (*B. ayerbei* e *B. asper*) que habitam a região do Departamento do Cauca apenas a título de comparação. Os venenos mostraram semelhanças principalmente na região de maior massa molecular, onde se observa uma banda comum às quatro espécies, com massa molecular pouco superior a 45 kDa, possivelmente correspondendo a metaloendopeptidases de classe PIII. Além do domínio catalítico, estas metaloendopeptidases contêm os domínios desintegrina-símile e rico em cisteína (Fox & Serrano, 2005). A região de 31 kDa, onde devem se localizar as metaloendopeptidases de classe PI (contendo apenas o domínio catalítico) e as serinoendopeptidases, apresenta uma diversidade maior no padrão de bandas eletroforéticas. Sabe-se que as fosfolipases A₂ miotóxicas têm massa molecular em torno 14 kDa (Gutiérrez & Lomonte, 2013). No perfil eletroforético da Figura 3.1, bandas de 14 kDa foram reveladas em todos os venenos testados, ainda que a abundância relativa no veneno de *B. ayerbei* pareça significativamente menor quando comparado aos demais, corroborando o achado por Mora-Obando *et al* (2014), indicando que as fosfolipases A₂ representam apenas 0.7% do veneno de *B. ayerbei*.

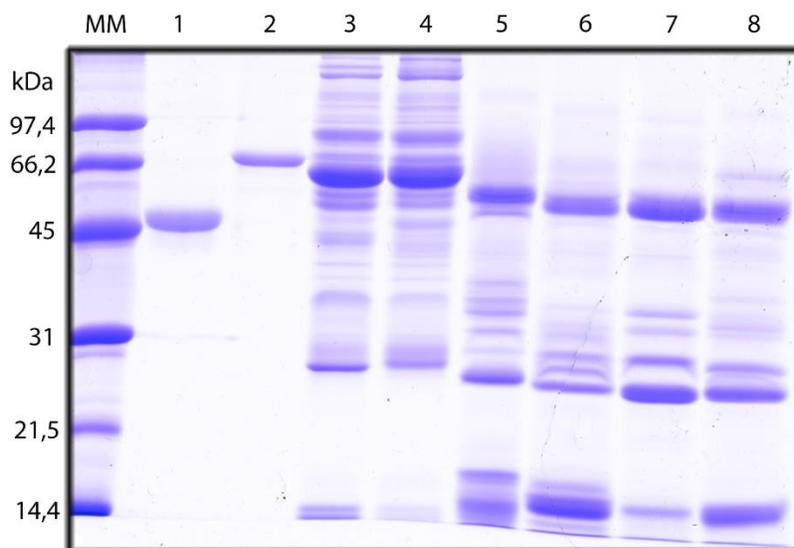


Figura 3.1. SDS-PAGE (12% T) em condições redutoras das amostras utilizadas neste projeto. 1) DM43 isolada do soro de *D. aurita*; 2) DM64 isolada do soro de *D. aurita*; 3) Soro de *D. marsupialis*; 4) Soro de *D. aurita*; 5) Veneno de *B. jararaca*; 6) Veneno de *B. asper*; 7) Veneno de *B. ayerbeii*; 8) Veneno de *B. rhombeatus*. Foram aplicados no gel 10 µg de soro, 10 µg de veneno e 5 µg de proteínas isoladas em cada raia. O gel foi revelado com azul de coomassie R250. A raia contendo padrão de massa molecular (MM) está indicada.

3.1.3 Atividade proteolítica do veneno de *B. rhombeatus* e testes de inibição pelo soro sanguíneo de *D. marsupialis* ou inibidores sintéticos

A atividade proteolítica do veneno de *B. rhombeatus* foi testada usando azocaseína como substrato, em condições de velocidade inicial. O veneno de *B. jararaca* foi utilizado a título de comparação. Para caracterizar a classe de proteases responsável pela atividade caseinolítica, o ensaio foi feito na ausência e na presença dos seguintes inibidores sintéticos: APMSF (inibidor de serinoendopeptidases) e 1,10-fenantrolina (inibidor de metaloendopeptidases). O soro de *D. marsupialis* também foi testado quando à capacidade de inibir a proteólise da caseína. Utilizando a mesma quantidade de veneno (*i.e.*, 10 µg de proteína), a atividade caseinolítica de *B. rhombeatus* foi 24.8% superior à de *B. jararaca*, percentual determinado com base nas diferenças de velocidade inicial calculadas pelas curvas de progresso de cada veneno. Em ambos os casos, a proteólise foi completamente inibida pela 1,10-fenantrolina. O soro de *D. marsupialis* (relação veneno: soro 1:20 m/m) inibiu quase que totalmente a atividade proteolítica dos venenos, enquanto o inibidor APMSF não

mostrou efeito significativo sobre a proteólise de caseína (Figura 3.2). Utilizando as mesmas condições experimentais, o APMSF inibiu 100% da atividade proteolítica da tripsina (10 µg) sobre caseína, um controle importante indicando que o inibidor estava funcional (dado não mostrado). Dados proteômicos indicam que venenos do gênero *Bothrops* possuem altos conteúdos de enzimas proteolíticas (metaloendopeptidases e serinoendopeptidases) (Tasoulis & Isbister, 2017), mas as serinoendopeptidases costumam ter maior especificidade de substrato, ou seja, clivam proteínas em sequências muito específicas (Serrano *et al.*, 2014), o que significa que a caseína pode não ser o substrato ideal para este tipo de enzimas, explicando a falta de inibição pelo APMSF. Desta forma, nossos resultados indicam que a atividade caseinolítica observada para ambos os venenos é explicada fundamentalmente por metaloendopeptidases, o que justifica a ausência de efeito do APMSF sobre a atividade caseinolítica.

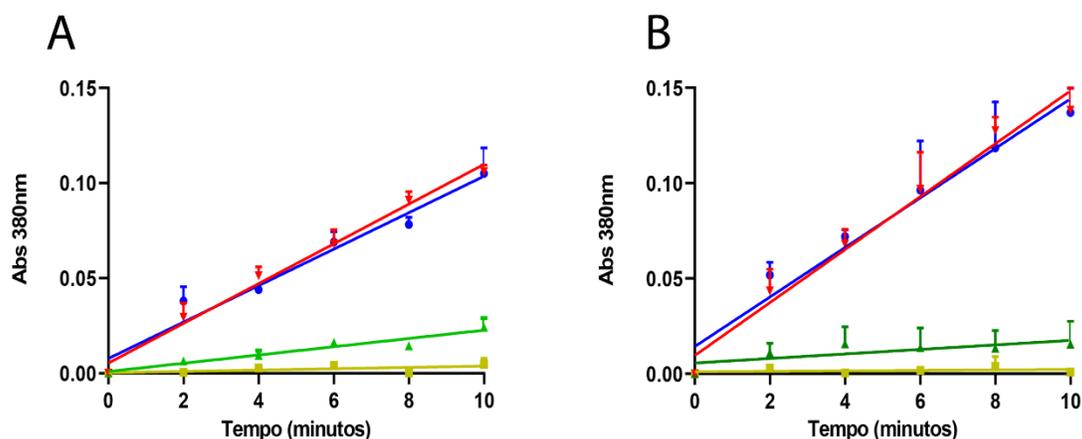


Figura 3.2. Análise da atividade proteolítica dos venenos de *B. jararaca* (A) e *B. rhombeatus* (B) utilizando azocaseína como substrato (n=2. Representação da média com desvio padrão). Linha vermelha: veneno (10 µg); linha azul: veneno (10 µg) + APMSF (q.s.p. 100 µM); Linha verde: veneno (10 µg) + soro *D. marsupialis* (1:20 m/m); Linha amarela: veneno (10 µg) + 1-10 fenantrolina (q.s.p. 10 mM). Em cada um dos dois experimentos independentes realizados, a atividade proteolítica nas diferentes condições experimentais foi determinada em duplicata técnica.

3.1.4 Atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* e testes de inibição pelo soro de *D. marsupialis* ou inibidores sintéticos

Dados preliminares do grupo da Colômbia indicam que o veneno de *B. rhombeatus* tem uma atividade pró-coagulante muito intensa. Em um trabalho publicado recentemente,

determinou-se uma dose coagulante mínima sobre plasma de 2 µg de peso seco de veneno/mL (Rengifo-Rios *et al.*, 2019). A DCM é definida como a dose de veneno que consegue induzir a formação de um coágulo em 60 segundos, podendo ser reportada em termos de concentração da solução teste (µg/mL) ou em massa de veneno utilizada (µg). Neste trabalho, decidimos aprofundar a caracterização da atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus*, determinando inicialmente sua dose coagulante mínima (DCM) em termos de concentração de proteína (Figura 3.3). Em nossos ensaios, a dose coagulante mínima determinada sobre plasma (DCM-P) foi de 0,68 µg/mL. Isto indica que 0,068 µg de proteína de veneno de *B. rhombeatus* diluídos em 100 µL induzem a coagulação de 200 µL de plasma humano citratado em 60 segundos, a 37°C. Em comparação com trabalhos da literatura que caracterizaram a atividade pró-coagulante de diversos venenos botrópicos utilizando a mesma metodologia (Theakston & Reid, 1983), a DCM-P de *B. rhombeatus* é a mais baixa reportada até o momento (Tabela 3.2). Venenos botrópicos podem conter metaloendopeptidases que ativam o fator X ou a protrombina (Fox & Serrano, 2005; Sajevic *et al.*, 2011) e/ou serinoendopeptidases que agem diretamente sobre o fibrinogênio (*thrombin-like enzymes*) ou ativam os fatores V, VIII ou XIII (Sajevic *et al.*, 2011; Serrano, 2013). No caso de *B. rhombeatus*, determinamos que a dose coagulante mínima sobre fibrinogênio bovino (DCM-F) é de 13,48 µg/mL, ou seja, quase 20 vezes maior do que a DCM-P. Assumindo que esta discrepância não é consequência de diferenças entre espécies (humano x bovino), o resultado pode indicar que a atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* se deve majoritariamente à atividade de metaloendopeptidases pró-coagulantes e/ou a presença de serinoendopeptidases sem atividade sobre o fibrinogênio.

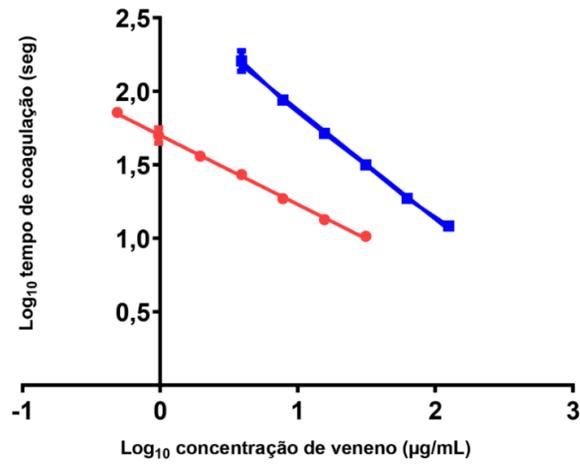


Figura 3.3. Doses coagulantes mínimas do veneno de *Bothrops rhombeatus* determinadas sobre plasma humano citratado (DCM-P) (linha vermelha) e fibrinogênio bovino (DCM-F) (linha azul) (n=2. Representação da média com desvio padrão). Em cada um dos dois experimentos independentes realizados, o tempo de coagulação nas diferentes condições experimentais foi determinado em triplicata técnica.

Espécie de <i>Bothrops</i>	DCM-P (μg)	Fonte
<i>B. alternatus</i> (Adulto)	>50	Furtado <i>et al.</i> , 1991*
<i>B. alternatus</i> (Juvenil)	2	
<i>B. cotiara</i> (Adulto)	2,6	
<i>B. cotiara</i> (Juvenil)	0,7	
<i>B. erythromelas</i> (Adulto)	0,225	
<i>B. erythromelas</i> (Juvenil)	0,1	
<i>B. jararaca</i> (Adulto)	4,8	
<i>B. jararaca</i> (Juvenil)	0,4	
<i>B. jararacussu</i> (Adulto)	5,75	
<i>B. jararacussu</i> (Juvenil)	0,28	
<i>B. mooojeni</i> (Adulto)	3,1	
<i>B. mooojeni</i> (Juvenil)	0,165	
<i>B. newiedi paranaensis</i> (Adulto)	7	
<i>B. newiedi paranaensis</i> (Juvenil)	0,675	
<i>B. newiedi pauloensis</i> (Adulto)	18	
<i>B. newiedi pauloensis</i> (Juvenil)	1,3	
<i>B. newiedi urutu</i> (Adulto)	3,6	
<i>B. newiedi urutu</i> (Juvenil)	0,18	
<i>Bothrops asper</i> (Pacífico, Costa Rica-Adulto)	0,07	Theakston & Reid, 1983*
<i>Bothrops ayerbeii</i> (Adulto)	0,96	Mora-Obando <i>et al.</i> , 2014*
<i>Bothrops asper</i> (Pacífico, Colombia-Adulto)	0,37	Mora-Obando <i>et al.</i> , 2014*
<i>B. rhombeatus</i> (Adulto)	0,206	Rengifo-Rios <i>et al.</i> , 2019*
<i>B. rhombeatus</i> (Adulto)	0,068	Este trabalho

Tabela 3.2. DCM-P determinadas para o veneno de várias espécies do gênero *Bothrops*. *: peso seco. A DCM-P de Furtado *et al.* (1991) e Theakston e Reid, (1983) foram calculadas testando-se 50 μL de várias concentrações de veneno em 200 μL de plasma humano citratado e foram reportadas em unidades de concentração (μg de peso seco/mL). Nos casos de Mora-Obando *et al.*, (2014) e Rengifo-Rios *et al.* (2019), foram utilizados 100 μL de solução de veneno sobre 200 μL de plasma humano citratado, sendo que as doses calculadas foram reportadas em unidades de massa (μg de peso seco). Devido a estas diferenças metodológicas, na tabela acima, todas as doses calculadas foram transformadas para microgramas de veneno efetivamente utilizado sobre 200 μL de plasma. Em nosso trabalho, a dose reportada refere-se à quantidade dosada de proteína e não ao peso seco de veneno liofilizado.

Para verificar a veracidade destas hipóteses, fizemos experimentos de inibição da coagulação em plasma (Tabela 3.3) ou fibrinogênio (Tabela 3.4) utilizando os inibidores sintéticos APMSF e 1-10 fenantrolina. Os resultados em plasma mostraram que a 1-10 fenantrolina inibiu totalmente a atividade pró-coagulante do veneno, enquanto que o APMSF não teve efeito detectável, confirmando que a atividade pró-coagulante do veneno decorre principalmente da atividade de metaloendopeptidases. Sobre fibrinogênio, a atividade pró-coagulante foi inibida pelo APMSF, enquanto 1-10 fenantrolina não mostrou efeito detectável. Isto significa que o efeito pro-coagulante sobre fibrinogênio é causado por serinoendopeptidases *thrombin-like*. Desta forma, ainda que existam serinoendopeptidases com efeito pró-coagulante susceptível à inibição por APMSF neste veneno, quando testado sobre o plasma, seu efeito é mascarado pela intensa atividade pró-coagulante decorrente da presença de metaloendopeptidases.

Como perspectiva deste trabalho, pretendemos testar o veneno utilizando substratos sintéticos que nos permitam determinar se a atividade pró-coagulante observada sobre plasma é consequência de metaloendopeptidases ativando Fator X [ex.: teste com veneno + fator X + S-2222 (substrato cromogênico para fator Xa)] e/ou protrombina [ex.: teste com veneno + protrombina + S-2238 (substrato cromogênico para trombina)].

Dose Veneno	Solução teste	Tempo Médio (segundos)	Desvio padrão (segundos)	# experimentos independentes
2 DCM-P	Tris-HCl 50 mM pH 7,4	35,25	0,73	5
2 DCM-P	Tris-HCl 50 mM pH 7,4 em 5% de etanol	38,88	0,32	2
2 DCM-P	Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + APMSF (100 µM)	36,23	0,73	2
2 DCM-P	Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo 1-10 fenantrolina (10 mM) em 5% de etanol	>180	0,00	2
-	Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + trombina (2.5 U/mL)	27,89	0,23	2
-	Tris-HCl 50 mM pH 7.4 + trombina (2.5 U/mL) + APMSF (100 µM)	>180	0	2

Tabela 3.3. Inibição da atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* sobre plasma humano citratado por inibidores sintéticos. Foram utilizadas 2 doses coagulantes mínimas do veneno sobre 200 µL de plasma humano citratado, na ausência ou presença dos inibidores. A trombina

foi utilizada como controle positivo da inibição por APMSF. Em cada experimento realizado, o tempo de coagulação nas diferentes condições experimentais foi determinado em triplicata técnica.

Dose Veneno	Solução teste	Tempo Médio (segundos)	Desvio padrão (segundos)	# experimentos independentes
2 DCM-F	Tris-HCl 50 mM pH 7.4	36,21	2,84	4
2 DCM-F	Tris-HCl 50 mM pH 7.4 em 5% de etanol	38,75	2,65	2
2 DCM-F	Tris-HCl 50 mM pH 7.4 + APMSF (100 µM)	57,02	0,85	2
2 DCM-F	Tris-HCl 50 mM pH 7.4 contendo 1-10 fenantrolina (10 mM) em 5% de etanol	37,57	0,97	2

Tabela 3.4. Inibição da atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* sobre fibrinogênio bovino por inibidores sintéticos. Foram utilizadas 2 doses coagulantes mínimas do veneno sobre uma solução de fibrinogênio a 0.3%, na ausência ou presença dos inibidores. Em cada experimento realizado, o tempo de coagulação nas diferentes condições experimentais foi determinado em triplicata técnica.

Como demonstrado por Furtado *et al.* (1991), os venenos de *Bothrops* parecem sofrer alterações ontogenéticas em sua atividade pró-coagulante, sendo os venenos dos filhotes mais potentes do que os venenos dos adultos, em todos os casos estudados. Saldarriaga *et al.* (2003) confirmaram esta informação estudando a *B. asper* do Departamento de Antioquia (norte da Colômbia) e a *B. atrox* de Villavicencio, Departamento de Meta, Colômbia (Leste colombiano). Em ambos os casos, a DCM-P aumenta conforme o avançar da idade dos indivíduos estudados. O perfil proteômico destes venenos em indivíduos juvenis e adultos indica que, no veneno dos filhotes, há uma maior abundância de metaloendopeptidases do tipo PIII e serinoendopeptidases, que se correlacionam com as coagulopatias mais severas nos casos clínicos (Guércio *et al.*, 2006; Alape-Girón *et al.*, 2008). O veneno de *B. rhombeatus* pode representar um caso de pedomorfismo parecido com o de *B. ayerbeii*, pois conserva características da fase juvenil no veneno. No caso do veneno de *B. ayerbeii*, porém, isto se traduz em uma alta proporção de SVMP hemorrágicas, justificando sua forte característica hemorrágica, enquanto que a DCM-P é menor do que a de *B. rhombeatus* (Mora-Obando *et al.*, 2014).

Testamos o soro sanguíneo de *D. marsupialis* quanto à capacidade de inibição da atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus*. Em plasma, a inibição começa a ser visível na presença de excesso de 40 vezes de soro em relação à quantidade de veneno (m/m, em proteína). Na relação 1:320 (veneno:soro m/m), há aumento de cerca de 3 vezes no tempo de coagulação em relação ao controle de 2 DCM-P sem inibidor (Figura 3.4). O resultado do teste Kruskal-Wallis mostrou uma diferença significativa ($p=0.0259$) entre o controle positivo (1:0) e a proporção veneno:soro 1:320. Isto nos sugere que estatisticamente é significativa a inibição causada pelo soro, indicando a presença de moléculas no soro que inibe(m) o efeito pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus*, que é induzido majoritariamente por metaloendopeptidases.

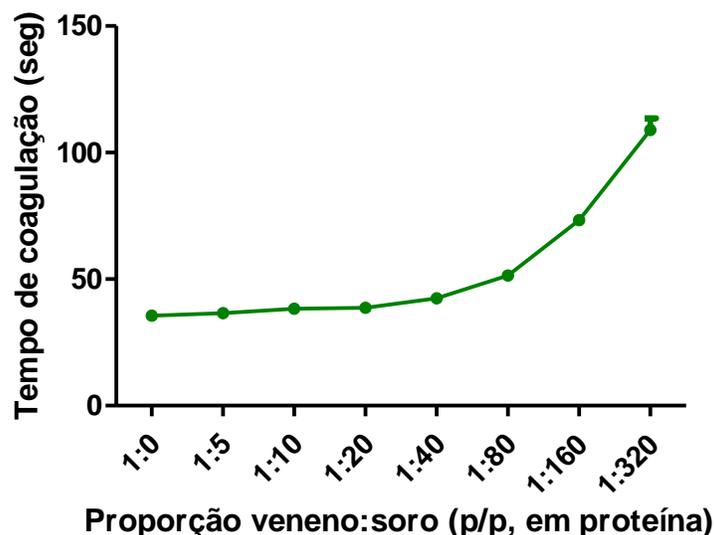


Figura 3.4. Inibição da atividade pró-coagulante em plasma do veneno de *B. rhombeatus* pelo soro de *D. marsupialis* (n=2. Representação da média com desvio padrão). Foram utilizadas 2 doses coagulantes mínimas do veneno sobre o plasma humano citratado, na ausência ou presença de quantidades crescentes de soro de *D. marsupialis*. Em cada um dos dois experimentos independentes realizados, o tempo de coagulação nas diferentes condições experimentais foi determinado em triplicata técnica. 1:0 = Controle de veneno sem soro. No controle do soro sem veneno, não houve coagulação.

O efeito pró-coagulante que o veneno de *B. rhombeatus* exerce sobre o fibrinogênio não foi inibido pelo soro de *D. marsupialis*, indicando a ausência componentes séricos capazes de inibir a ação de serinoendopeptidases, enzimas responsáveis por esta atividade. Atualmente,

não existe reportado na literatura nenhum inibidor natural deste tipo de enzimas que tenha sido descrito em animais naturalmente resistentes ao envenenamento.

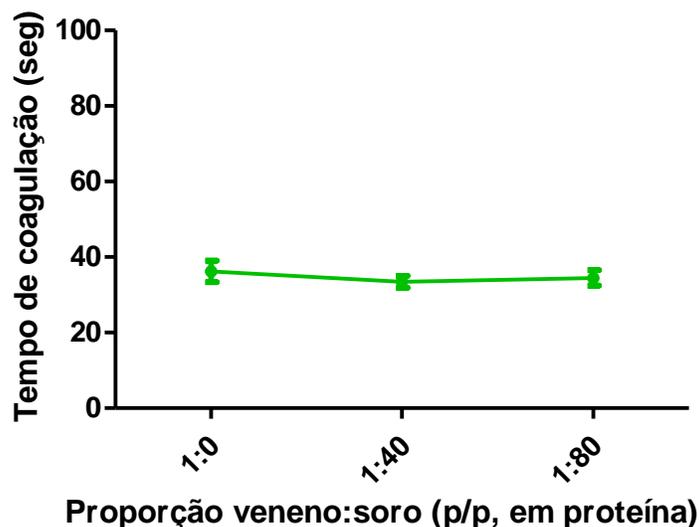


Figura 3.5 Atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* sobre fibrinogênio na presença de quantidade crescentes do soro de *D. marsupialis* (n=2. Representação da média com desvio padrão). Foram utilizadas 2 doses coagulantes mínimas do veneno sobre solução de fibrinogênio a 0.3 %, na ausência ou presença de quantidades crescentes de soro de *D. marsupialis*. Em cada um dos dois experimentos independentes realizados, o tempo de coagulação nas diferentes condições experimentais foi determinado em triplicata técnica. 1:0 = Controle de veneno sem soro. No controle do soro sem veneno, não houve coagulação.

3.1.5 Atividade fosfolipásica do veneno de *B. asper* e testes de inibição pelo soro sanguíneo de *D. marsupialis* ou pelo inibidor sintético p-BPB

Para testar a presença de inibidores de miotoxina no soro de *D. marsupialis*, utilizamos o veneno de *B. asper*, que produz efeitos miotóxicos bastante bem caracterizados, resultantes da presença abundante de fosfolipases A₂ (PLA₂, K49 e D49)(Gutiérrez *et al.*, 1980, 2009; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Saravia *et al.*, 2001). A atividade fosfolipásica do veneno foi testada utilizando o kit EnzChek PLA₂ (Thermo), que permite o monitoramento contínuo da fluorescência liberada do substrato tipo FRET Red/Green BODIPY® PC-A2 (um glicerofosfolípido marcado) incorporado em lipossomas contendo DOPC e DOPG. Além disto, testamos também o efeito do inibidor sintético de PLA₂ p-BPB (brometo de p-bromofenacil) e do soro de *D. marsupialis* (Figura 3.6).

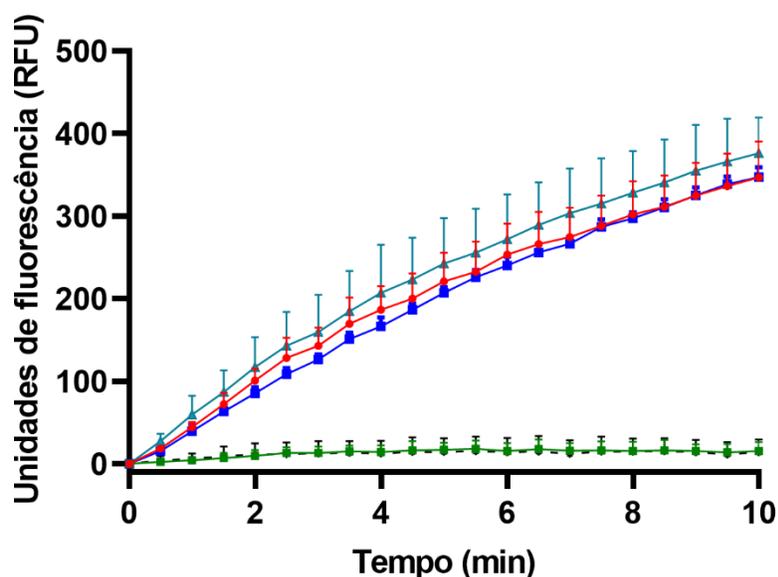


Figura 3.6. Análise da atividade fosfolipásica do veneno de *B. asper* utilizando o kit Enzchek PLA₂ na presença ou ausência do inibidor de PLA₂ p-BPB ou do soro de *D. marsupialis* (n=2. Representação da média com desvio padrão). Em cada um dos dois experimentos independentes realizados, a atividade fosfolipásica nas diferentes condições experimentais foi determinada em duplicata técnica. Veneno controle (0,5 µg): linha vermelha; Veneno + p-BPB (linha verde); Veneno + soro *D. marsupialis* (1:40 m/m): Linha azul/quadrados; Veneno + soro *D. marsupialis* (1:80 m/m): Linha azul/triângulos; Soro controle de *D. marsupialis* (correspondente a 1:80 m/m) (linha preta).

Como esperado, o veneno de *B. asper* mostrou uma intensa atividade fosfolipásica na quantidade testada (0,5 µg). Nenhuma das concentrações testadas do soro foi capaz de inibir a atividade enzimática das PLA₂ deste, enquanto que o p-BPB aboliu completamente esta atividade. Este resultado está de acordo com o reportado na literatura a respeito do gambá *D. aurita*. Do soro deste último, foi isolada uma proteína antimiotóxica que forma complexo inativos com as fosfolipases A₂ de *B. asper*, mas não inibe a atividade catalítica das enzimas D49 (Rocha *et al.*, 2002). Portanto, é possível que, também no caso do *D. marsupialis* da Colômbia, haja proteína(s) sérica(s) com atividade antimiotóxica, ainda que não se observe inibição de atividade fosfolipásica.

3.2 Purificação e caracterização da(s) proteína(s) antiofídica(s) do soro de *D. marsupialis* colombiano

Uma vez confirmada a capacidade neutralizante do soro do gambá colombiano *Didelphis marsupialis*, partimos para a caracterização das proteínas antiofídicas possivelmente responsáveis por esta atividade. Esta informação é importante para definirmos as estratégias de purificação a serem utilizadas posteriormente.

3.2.1 Análise da presença de proteínas similares a DM43 ou DM64 no soro de *Didelphis marsupialis*

Para verificar a presença de antitoxinas similares a DM43 e DM64 de *Didelphis aurita* no soro do gambá colombiano, empregamos a técnica de *Western-blotting* seguido de imunorrevelação, utilizando eletroforeses uni- (Figura 3.7) e bidimensionais (Figura 3.8).

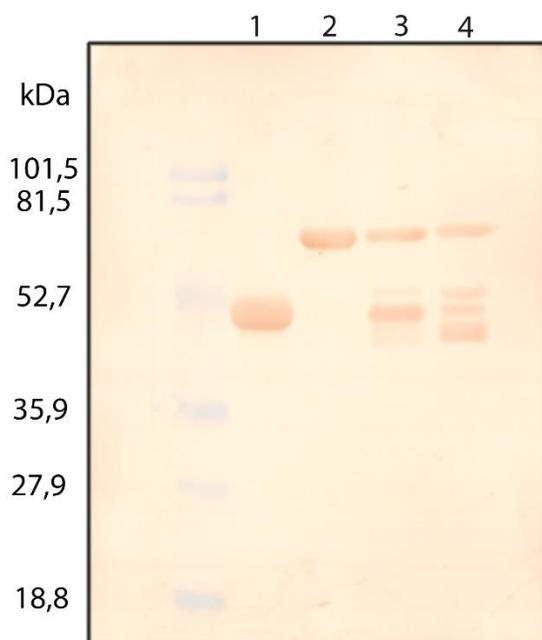


Figura 3.7. *Western-blotting* unidimensional (SDS-PAGE 12% T em condições redutoras) revelado com anticorpo policlonal anti-DM43. 1) DM43. 2) DM64. 3) Soro de *D. aurita*. 4) Soro de *D. marsupialis*. Em cada raia dos soros, foram aplicados 10 μ g de proteína e 5 μ g das DMs isoladas. Após as etapas de bloqueio de ligações inespecíficas (leite desnatado) e incubação com antissoro de coelho anti-DM43, a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, seguido de revelação na presença de peróxido de hidrogênio e do substrato cromogênico 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A raia contendo padrão pré-corado de massa molecular (MM) está indicada.

Inicialmente, revelamos os *Western blottings* com antissoros preparados em coelhos contra as proteínas isoladas de *D. aurita* DM43 (Figura 3.7) ou DM64 (não mostrado). O padrão de revelação foi muito semelhante com os dois anticorpos, diferindo apenas na intensidade relativa das bandas reveladas. Desta forma, passamos a utilizar apenas o antissoro anti-DM43. O padrão de revelação do soro de *D. marsupialis* foi similar ao padrão de *D. aurita*, ainda que as intensidades relativas das bandas correspondentes a DM43 sejam diferentes. Na amostra colombiana, a banda que correspondente a DM43 aparece acompanhada de pelo menos outras duas bastante intensas (regiões imediatamente acima e abaixo da banda de DM43). No caso da banda de DM64, uma única banda bem nítida foi revelada nos dois soros. Conseguimos revelar as bandas correspondentes a DM43 e DM64 com ambas as preparações de anticorpos policlonais (anti-DM43 ou anti-DM64). Isto deve-se ao fato de que ambas proteínas possuem alta de similaridade de sequência (Rocha *et al.*, 2002) e, portanto, devem compartilhar epítomos idênticos/muito similares, justificando a revelação cruzada entre estas proteínas. Estes resultados indicam que a diversidade de antitoxinas não é igual nos soros dos dois marsupiais analisados. É possível que a diversidade não seja apenas quantitativa, mas inclua também diferenças qualitativas (*i.e.*, existência de inibidores com diferentes estruturas e especificidades inibitórias).

Para melhor caracterizar as proteínas reveladas acima, submetemos as amostras dos dois soros a eletroforeses bidimensionais, usando gradientes imobilizados de pH na faixa de pH 3-10 (Figura 3.8), seguido de *Western-blotting* e imunorrevelação das membranas, como descrito acima. Observamos revelação das proteínas correspondentes a DM43 e DM64 em ambos soros, sendo bastante evidente a presença das três proteínas com massas moleculares semelhantes a DM43 no soro de *D. marsupialis*, como observado anteriormente no gel unidimensional (Figura 3.7). As proteínas reveladas mostraram uma ampla diversidade de pontos isoelétricos, sempre na região mais ácida do gel, possivelmente consequência de heterogeneidades em seus padrões de glicosilação (Figura 3.8). Os pontos isoelétricos calculados para as duas proteínas foram bastante próximos, com a DM43-like mostrando caráter mais ácido ($pI < 3,5$) e a DM64-like com características um pouco menos ácidas ($4,1 < pI < 4,5$). Estas diferenças podem ser resultado da presença de diferentes alelos dentro da mesma população de *D. marsupialis*, assim como também é possível que a estabilidade das

proteínas tenha variações entre amostras, após os diferentes tratamentos para a obtenção do soro. Isto poderá ser verificado estudando soro de diferentes indivíduos da mesma população, em vez de um pool, que permita estabelecer a existência de alelos diferentes para estes genes, assim como para verificar a estabilidade das proteínas. Podemos concluir também que os anticorpos produzidos contra a DM43 de *D. aurita* são excelentes ferramentas analíticas que podem ser empregados para detecção de proteínas homólogas presentes no soro sanguíneo de outras espécies.

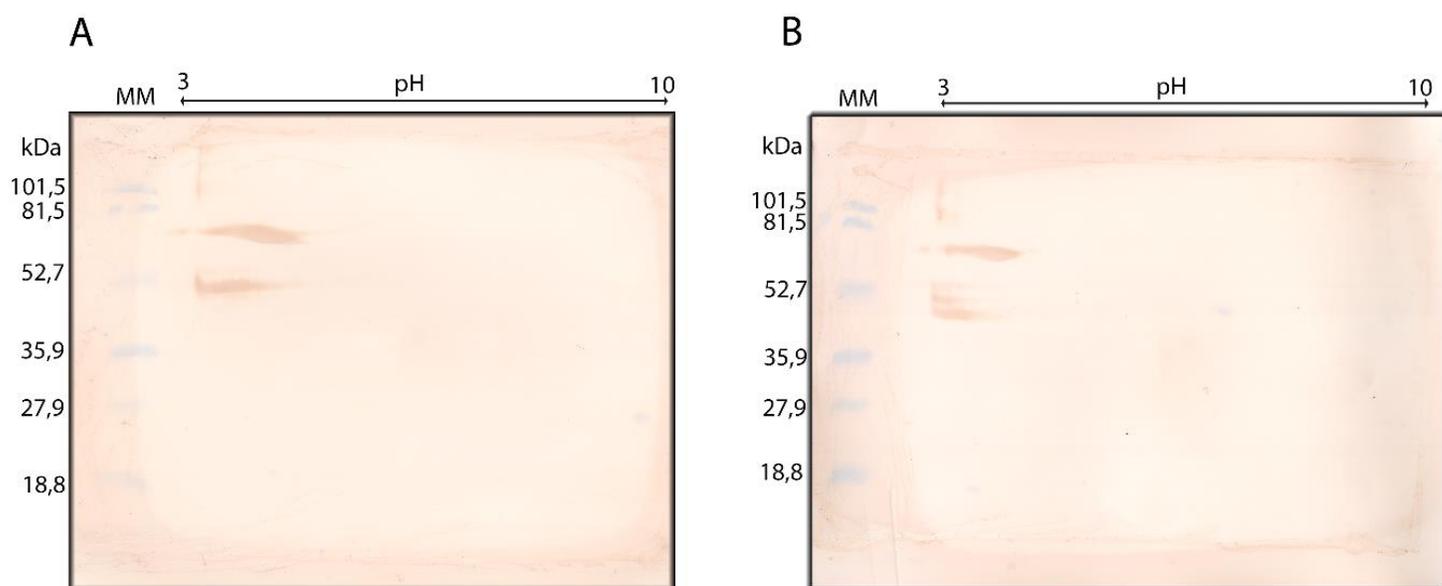


Figura 3.8. *Western-blotting* bidimensional (pH 3-10, SDS-PAGE 12% T em condições redutoras) do soro de *Didelphis aurita* (A) e *Didelphis marsupialis* (B) revelado com anticorpo policlonal anti-DM43. Em cada gel, foram aplicados 100 µg de proteína. Após as etapas de bloqueio de ligações inespecíficas (leite desnatado) e incubação com antissoro de coelho anti-DM43, a membrana de PVDF foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, seguido de revelação na presença de peróxido de hidrogênio e do substrato cromogênico 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A raia contendo padrão pré-corado de massa molecular (MM) está indicada.

3.2.2 Isolamento das proteínas antiofídicas similares a DM43 ou DM64 a partir do soro de *D. marsupialis*

Uma amostra de soro liofilizado de *D. marsupialis* foi dialisada extensivamente contra acetato de sódio 0,01 M pH 3,7, sendo posteriormente submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-Sephacel, equilibrada no mesmo tampão, conforme descrito originalmente para purificação de DM43 e DM64 (Neves-Ferreira *et al.*, 2002; Rocha *et al.*,

2002). O perfil cromatográfico obtido pode ser visto na Figura 3.9. O primeiro pico corresponde às proteínas carregadas positivamente no pH utilizado ($pI > 3,7$) e que, portanto, não interagiram com a fase estacionária da coluna, carregada positivamente. O segundo pico corresponde às proteínas carregadas negativamente, que interagiram com o trocador aniônico e que só foram eluídas com um gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M. Trata-se, portanto, de proteínas extremamente ácidas ($pI < 3,7$), assim como as antitoxinas de *D. aurita* descritas na literatura. Os perfis eletroforéticos das frações coletadas nesta cromatografia estão mostrados na Figura 3.10.

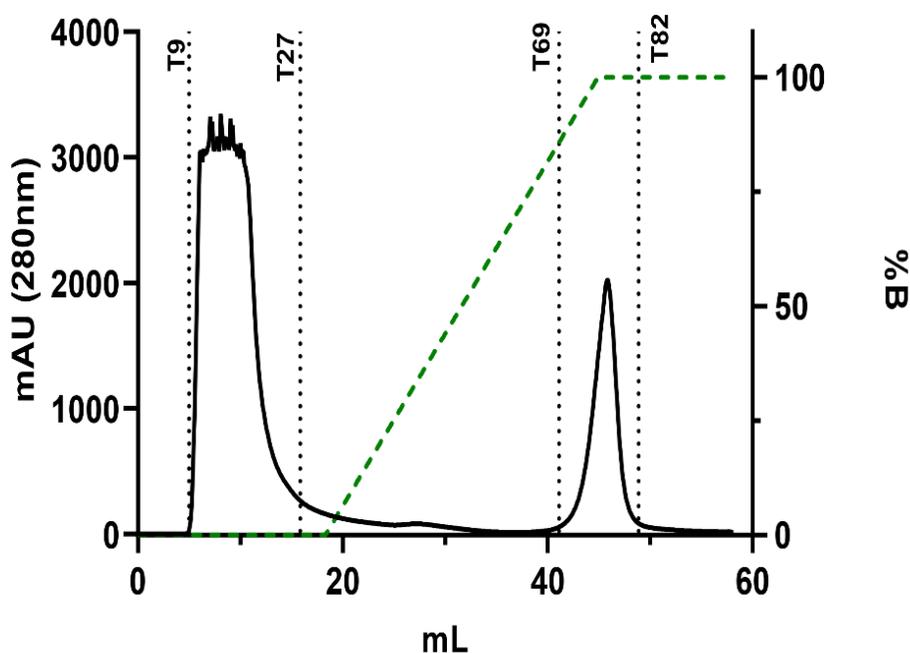


Figura 3.9. Cromatografia de troca iônica do soro de *D. marsupialis* em coluna de troca iônica em DEAE-Sephacel. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,01 M pH 3,7 e as proteínas que interagiram com a coluna foram eluídas com um gradiente linear de NaCl (0 – 0,5 M, linha tracejada verde) neste mesmo tampão. A corrida cromatográfica foi monitorada por absorvância a 280 nm e as frações coletadas (0,5 mL/tubo) foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras. As linhas tracejadas verticais indicam a numeração (inicial/final) dos tubos onde foram coletadas as frações eluídas.

Os perfis eletroforéticos seguintes mostram que as frações que se ligam à coluna são compostas por 3 bandas principais mais intensas, que migram na região entre 45 e 66,2 kDa, além de duas bandas menos abundantes e de maior massa molecular relativa. Estas proteínas

têm mobilidades eletroforéticas semelhantes às que foram reveladas pelo antissoro anti-DM43 nos *Western-blot*s descritos anteriormente.

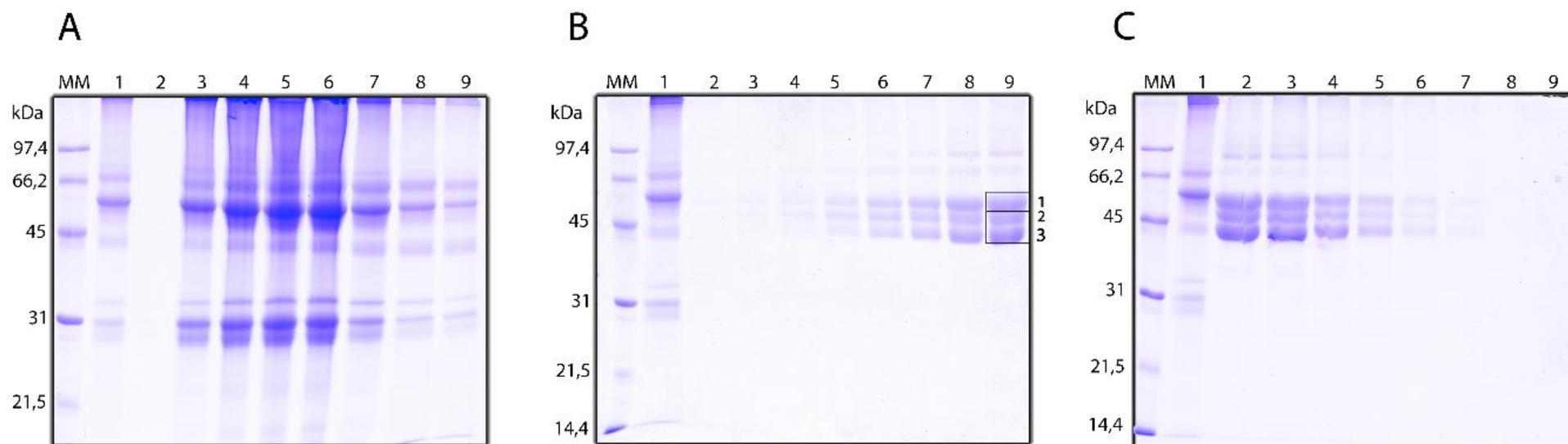


Figura 3.10. SDS-PAGE (12% T) das frações do soro de *Didelphis marsupialis* obtidas por cromatografia em coluna de DEAE-Sephacel em pH 3,7. A) Frações contendo as proteínas que não interagiram com a coluna (pico 1, tubos 9-27 da figura 3.9); 2: Tubo 8; 3: Tubo 10; 4: Tubo 12; 5: Tubo 14; 6: Tubo 16; 7: Tubo 23; 8: Tubo 25; 9: Tubo 27. B) Frações que eluíram na porção ascendente do pico 2 (tubos 69-76 da Figura 3.9); C) Frações que eluíram na porção descendente do pico 2 (2-7: Tubos 77-82; 8-9: Tubos 82-84 da Figura 3.9). Em todos os géis, a raia 1 corresponde ao soro total de *D. marsupialis* e a raia contendo padrão de massa molecular (MM) está indicada. Foram aplicados 20 μ L de cada fração cromatográfica em cada raia do gel, que foi revelado com azul de Coomassie R250. As três bandas principais eluídas no pico 2, submetidas à digestão *in gel* e identificadas por MS/MS estão numeradas (1-3).

Para confirmar a identidade das proteínas purificadas, as três bandas principais foram recortadas no gel, submetidas à digestão com tripsina e os peptídeos obtidos foram analisados por nLC-nESI-MS/MS utilizando o Orbitrap QExactive Plus. Os espectros de fragmentação obtidos foram confrontados com sequências de proteínas de Didelphidae depositadas no UniProt (taxon ID # 9265: 100 sequências do SwissProt + 25.230 sequências do trEMBL, *download* em 01/04/2019), utilizando inicialmente com o algoritmo Peaks X+. Para as três bandas, foram obtidos PSM (*Peptide-Spectrum Matches*) identificando as proteínas DM43, DM43b e α 1B-glicoproteína humana, em diferentes proporções relativas. A Tabela 3.5 mostra o número de contagens espectrais (*spectral counts*) correspondentes aos peptídeos únicos das diferentes proteínas identificadas em cada uma das três bandas numeradas na Figura 3.10. As proteínas similares à DM43 de *D. aurita* que foram purificadas do soro de *D. marsupialis* foram denominadas DM43-like 1 (banda 1), DM43-like 2 (banda 2), DM43-like 3 (banda 3).

Tabela 3.5. Identificações por nLC-MS/MS das proteínas purificadas do soro de *Didelphis marsupialis* da Colômbia. As amostras identificadas estão indicadas nos géis SDS-PAGE 12% contendo a fração ligada à coluna de DEAE-Sephacel (Figura 3.10) e a fração ligada à coluna de afinidade NHS-miotoxina II (Figura 3.12). Os brancos representam corridas de nLC-MS/MS realizadas entre amostras, injetando-se apenas fase móvel, de forma a reduzir a contaminação cruzada entre amostras (*carry-over*).

Amostra	Código Acesso	-10lgP	Cobertura (%)	#Peptídeos	Spectral counts	#Pep. únicos	SC únicos	Área Pep. únicos	Massa (Da)	Descrição
Banda 1 DEAE	tr Q8HZ74 Q8HZ74_DIDVI	189.12	18	5	122	3	51	2.90E+09	32,509	Alpha 1B glycoprotein DVOP114 (Fragment) OS= <i>Didelphis virginiana</i> OX=9267 PE=2 SV=1
	tr Q8HYX5 Q8HYX5_DIDMR	228.25	20	7	124	3	49	1.14E+10	34,604	Venom metalloproteinase inhibitor DM43b OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=2 SV=1
	DM64	229.11	20	7	17	7	17	2.10E+08	53,303	DM64
	tr Q8MIS3 Q8MIS3_DIDMR	229.11	19	7	17	7	17	2.10E+08	55,976	Venom myotoxin inhibitor DM64 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=2 SV=1
	P82957 DM43_DIDMR	186.46	26	6	80	4	9	5.86E+08	32,390	Venom metalloproteinase inhibitor DM43 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=1 SV=2
Branco_1	tr Q8HYX5 Q8HYX5_DIDMR	120.77	9	3	25	2	2	7.90E+06	34,604	Venom metalloproteinase inhibitor DM43b OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=2 SV=1
Banda 2 DEAE	P82957 DM43_DIDMR	251.79	41	8	108	6	58	5.72E+09	32,390	Venom metalloproteinase inhibitor DM43 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=1 SV=2
	tr F7BJP5 F7BJP5_MONDO	142.34	4	2	2	2	2	8.73E+06	68,092	Albumin OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=ALB PE=4 SV=1
Branco_2	P82957 DM43_DIDMR	202.55	34	7	35	5	13	4.67E+07	32,390	Venom metalloproteinase inhibitor DM43 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=1 SV=2

Continuação da tabela 3.5

Amostra	Código Acesso	-10lgP	Cobertura (%)	#Peptídeos	Spectral counts	#Pep. únicos	SC únicos	Área Pep. únicos	Massa (Da)	Descrição
Branco 2	tr Q8HZ74 Q8HZ74_DIDVI	125.05	14	3	30	2	10	2.59E+07	32,509	Alpha 1B glycoprotein DVOP114 (Fragment) OS= <i>Didelphis virginiana</i> OX=9267 PE=2 SV=1
Banda 3 DEAE	DM64	220.27	20	7	10	7	10	1.83E+08	53,303	DM64
	tr Q8MIS3 Q8MIS3_DIDMR	220.27	19	7	10	7	10	1.83E+08	55,976	Venom myotoxin inhibitor DM64 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=2 SV=1
	P82957 DM43_DIDMR	214.65	36	6	13	4	7	1.96E+08	32,390	Venom metalloproteinase inhibitor DM43 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=1 SV=2
Branco 3	tr Q8HZ73 Q8HZ73_DIDVI	184.45	20	5	42	3	37	7.45E+07	31,758	Alpha 1B glycoprotein DVOP53-1 (Fragment) OS= <i>Didelphis virginiana</i> OX=9267 PE=2 SV=1
	P82957 DM43_DIDMR	145.36	16	4	8	2	3	2.90E+06	32,390	Venom metalloproteinase inhibitor DM43 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=1 SV=2

Continuação da tabela 3.5

Amostra	Código Acesso	-10lgP	Cobertura (%)	#Peptídeos	Spectral counts	#Pep. únicos	SC únicos	Área Pep. únicos	Massa (Da)	Descrição
Banda NHS (Afinidade)	DM64	264.28	28	11	49	11	49	1.44E+09	53,303	DM64
	tr Q8MIS3 Q8MIS3_DIDMR	264.28	27	11	49	11	49	1.44E+09	55,976	Venom myotoxin inhibitor DM64 OS=Didelphis marsupialis OX=9268 PE=2 SV=1
	tr F7EH65 F7EH65_MONDO	116.9	3	2	8	2	8	9.66E+07	47,365	Uncharacterized protein OS=Monodelphis domestica OX=13616 GN=SERPINA6 PE=3 SV=2
	tr F7BJP5 F7BJP5_MONDO	166.11	11	6	6	5	5	5.85E+07	68,092	Albumin OS=Monodelphis domestica OX=13616 GN=ALB PE=4 SV=1
	tr F6XR98 F6XR98_MONDO	146.53	10	5	5	5	5	8.16E+07	53,219	Serpin family C member 1 OS=Monodelphis domestica OX=13616 GN=SERPINC1 PE=3 SV=1

Continuação da tabela 3.5

Amostra	Código Acesso	-10lgP	Cobertura (%)	#Peptídeos	Spectral counts	#Pep. únicos	SC únicos	Área Pep. únicos	Massa (Da)	Descrição
Branco 4 Afinidade	DM64	79.06	6	3	6	3	6	3.69E+06	53,30 3	DM64
	tr Q8MIS3 Q8MIS3_DIDMR	79.06	6	3	6	3	6	3.69E+06	55,97 6	Venom myotoxin inhibitor DM64 OS=Didelphis marsupialis OX=9268 PE=2 SV=1
	tr F7BJP5 F7BJP5_MONDO	84.19	4	2	3	2	3	9.34E+05	68,09 2	Albumin OS=Monodelphis domestica OX=13616 GN=ALB PE=4 SV=1
DM43 <i>D. aurita</i>	P82957 DM43_DIDMR	321.5	68	21	249	18	188	7.78E+09	32,390	Venom metalloproteinase inhibitor DM43 OS=Didelphis marsupialis OX=9268 PE=1 SV=2
	tr F7DIB7 F7DIB7_MONDO	181.19	22	5	11	5	11	2.29E+07	41,793	Actin gamma 1 OS=Monodelphis domestica OX=13616 GN=ACTG1 PE=3 SV=1

Continuação da tabela 3.5

Amostra	Código Acesso	-10lgP	Cobertura (%)	#Peptídeos	Spectral counts	#Pep. únicos	SC únicos	Área Pep. únicos	Massa (Da)	Descrição
DM43 <i>D. aurita</i>	tr F6RFW8 F6RFW8_MONDO	181.19	22	5	11	5	11	2.29E+07	41,721	Uncharacterized protein OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=LOC100024060 PE=3 SV=1
Branco DM43 <i>D. aurita</i>	P82957 DM43_DIDMR	248.73	54	13	27	11	22	7.74E+07	32,390	Venom metalloproteinase inhibitor DM43 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=1 SV=2
	tr F6RFW8 F6RFW8_MONDO	189.96	34	9	13	9	13	2.00E+07	41,721	Uncharacterized protein OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=LOC100024060 PE=3 SV=1
	tr F7DIB7 F7DIB7_MONDO	189.96	34	9	13	9	13	2.00E+07	41,793	Actin gamma 1 OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=ACTG1 PE=3 SV=1
	tr F7A7I3 F7A7I3_MONDO	189.96	34	9	13	9	13	2.00E+07	41,854	Uncharacterized protein OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=LOC100029767 PE=3 SV=1

Continuação da tabela 3.5

Amostra	Código Acesso	-10lgP	Cobertura (%)	#Peptídeos	Spectral counts	#Pep. únicos	SC únicos	Área Pep. únicos	Massa (Da)	Descrição
Branco DM43 <i>D. aurita</i>	tr F7DC98 F7DC98_MONDO	160.46	13	5	7	5	7	6.90E+06	70,785	Uncharacterized protein OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=HSPA8 PE=3 SV=1
DM64 <i>D. aurita</i>	DM64	436.79	72	35	869	35	869	8.29E+10	53,303	DM64
	P82957 DM43_DIDMR	163.22	37	5	6	4	5	1.37E+07	32,390	Venom metalloproteinase inhibitor DM43 OS= <i>Didelphis marsupialis</i> OX=9268 PE=1 SV=2
	tr F7DIB7 F7DIB7_MONDO	152.25	16	4	5	4	5	9.62E+06	41,793	Actin gamma 1 OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=ACTG1 PE=3 SV=1
	tr F6RFW8 F6RFW8_MONDO	152.25	16	4	5	4	5	9.62E+06	41,721	Uncharacterized protein OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=LOC100024060 PE=3 SV=1
	tr F7A7I3 F7A7I3_MONDO	152.25	16	4	5	4	5	9.62E+06	41,854	Uncharacterized protein OS= <i>Monodelphis domestica</i> OX=13616 GN=LOC100029767 PE=3 SV=1

Como descrito anteriormente por Rocha *et al* (2002), o isolamento de DM64, proteína antimiotóxica isolada do soro de *D. aurita*, foi feito em coluna de afinidade HiTrap NHS acoplada com a miotoxina II isolada do veneno de *Bothrops asper*. Diferentemente do observado para *D. marsupialis*, a DM64 de *D. aurita* interage com a coluna de DEAE-Sephacel em pH 3,7, sendo eluída na porção ascendente do pico cromatográfico. No caso de *D. marsupialis*, não detectamos a proteína DM64-like na fração que interagiu com a coluna. Desta forma, submetemos a fração do soro de *D. marsupialis* não-ligada ao DEAE à coluna de afinidade NHS-miotoxina II equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 7,5, contendo 0,1 M de NaCl. Originalmente, Rocha *et al.* (2002) isolaram a DM64 de *D. aurita* utilizando a coluna de afinidade em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,0 sem adição de sal. Ao tentarmos isolar a DM64-like com tampão tris-HCL sem sal, observamos que, além da proteína de interesse, uma quantidade equivalente de albumina (identificação confirmada por MS/MS, não mostrado) também interagiu com a coluna de afinidade. Este problema de ligação inespecífica de albumina foi resolvido com a introdução de 0,1 M de NaCl no tampão de equilíbrio cromatográfico.

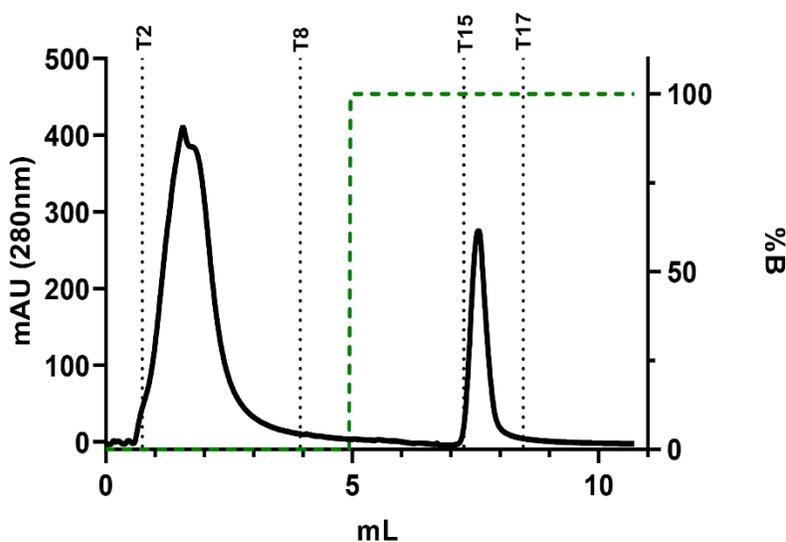


Figura 3.11. Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap NHS (acoplada com miotoxina II de *B. asper*) da fração do soro de *D. marsupialis* que não interagiu com a coluna de troca iônica DEAE-Sephacel. A linha tracejada verde indica a troca para o tampão de eluição glicina-HCl 0,1 M pH 2,7. A corrida cromatográfica foi monitorada por absorvância a 280 nm. As linhas tracejadas verticais indicam a numeração (inicial/final) dos tubos onde foram coletadas as frações eluídas.

As frações cromatográficas obtidas na cromatografia de afinidade em coluna NHS-miotoxina II foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras. Na Figura 3.12, pode-se observar que a fração que interagiu com a miotoxina II imobilizada na coluna é bastante homogênea, sendo constituída por uma banda majoritária na região de 66,2 kDa. Assim como feito para as frações de DEAE, esta banda foi digerida *in gel* e submetida à análise por nLC-nESI-MS/MS no Orbitrap QExactive Plus, identificando-se a proteína DM64 de *D. aurita* (Tabela 3.5). As frações mostradas nas raías 6 e 7 da Figura 3.12 foram unidas em um *pool* e, após diálise e liofilização, passou a constituir a preparação de proteína DM64-like de *D. marsupialis*.

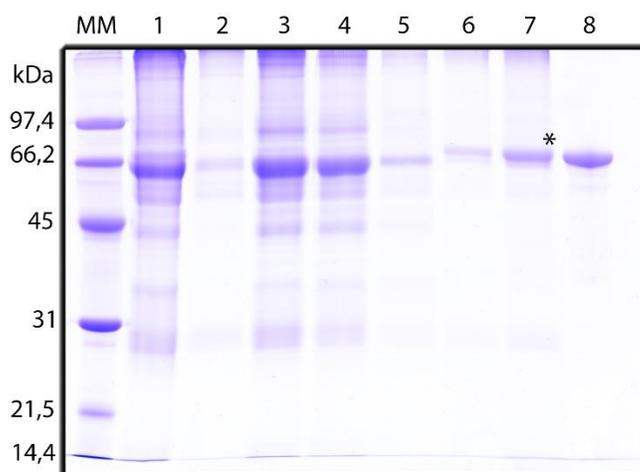


Figura 3.12. SDS-PAGE (12% T) da fração do soro de *D. marsupialis* não-ligada à coluna de DEAE-Sephacel e que foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna NHS-HiTrap-miotoxina II de *B. asper*. 1) Soro de *D. marsupialis*; 2-4) Fração de DEAE não-ligada à coluna de afinidade (tubos 2-5-7 da Figura 3.11); 5-7) Fração ligada à coluna de afinidade (tubos 15-17 da Figura 3.11); 8) DM64 isolada do soro de *D. aurita*. Foram aplicados 20 μ L das frações cromatográficas em cada raia do gel, que foi revelado com azul de Coomassie R250. A banda principal eluída no pico 2, a raia 7, que foi submetida à digestão *in gel* e identificada por MS/MS está marcada com um asterisco. A raia contendo padrão de massa molecular (MM) está indicada.

3.2.3 Monitoramento da imunorreatividade das proteínas antiofídicas isoladas do soro de *D. marsupialis*

A imunorreatividade das proteínas DM43-like e DM64-like purificadas do soro de *D. marsupialis* foi avaliada por *Western-blotting*, seguido de imunorrevelação usando o

antissoro anti-DM43, como descrito anteriormente. Como mostrado na Figura 3.13, as proteínas isoladas foram reconhecidas pelo anticorpo anti-DM43, corroborando os resultados de identificação por espectrometria de massas (Tabela 3.5).

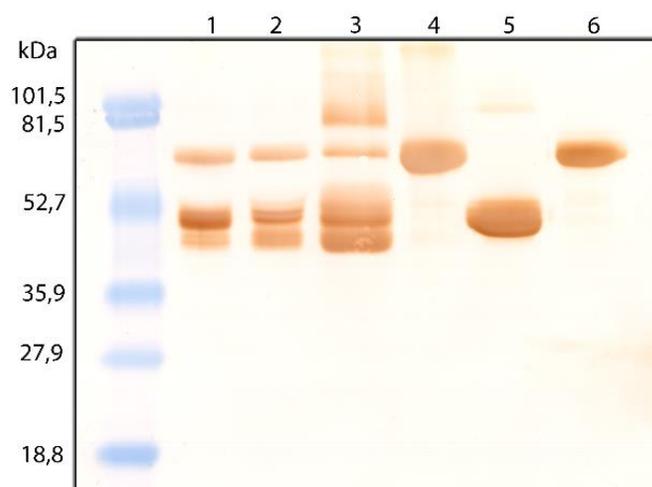


Figura 3.13. Western-blotting unidimensional (SDS-PAGE 12% T em condições redutoras) revelado com antissoro anti-DM43. 1) Soro de *D. aurita*; 2) Soro de *D. marsupialis*; 3) Fração cromatográfica do soro de *D. marsupialis* ligada à coluna de DEAE; 4) Fração cromatográfica do soro de *D. marsupialis* não-ligada à coluna de DEAE e ligada à coluna de NHS-HiTrap-miotoxina II; 5) DM43 isolada do soro de *D. aurita*; 6) DM64 isolada do soro de *D. aurita*. Na raia dos soros foram aplicados 10 µg de proteína, enquanto que na raia das proteínas isoladas foram aplicados 5 µg. Após as etapas de bloqueio de ligações inespecíficas (leite desnatado) e incubação com antissoro de coelho anti-DM43, a membrana de PVDF foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, seguido de revelação na presença de peróxido de hidrogênio e do substrato cromogênico 3,3'-diaminobenzidina (DAB). A raia contendo padrão pré-corado de massa molecular (MM) está indicada.

A fração DM43-like (raia 3 da Figura 3.13), no entanto, mostrou a presença de uma banda imunorreativa na região de DM64, além de uma banda mais difusa de menor mobilidade eletroforética. Esta última pode representar uma forma agregada das proteínas DM43-like, hipótese que ainda precisará ser comprovada através da identificação por espectrometria de massas. Para reduzir a contaminação por DM64-like, a fração mostrada na raia 3 da Figura 3.13 foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna NHS-HiTrap-miotoxina II. Desta forma, a contaminação de DM64-like foi bastante reduzida. Com exceção do ensaio de desglicosilação (Figura 3.16), todos os experimentos a seguir foram realizados com esta

preparação final de DM43-like. Os perfis eletroforéticos das proteínas DM43-like e DM64-like de *D. marsupialis*, tratados com e sem DTT, estão mostrados na Figura 3.14.

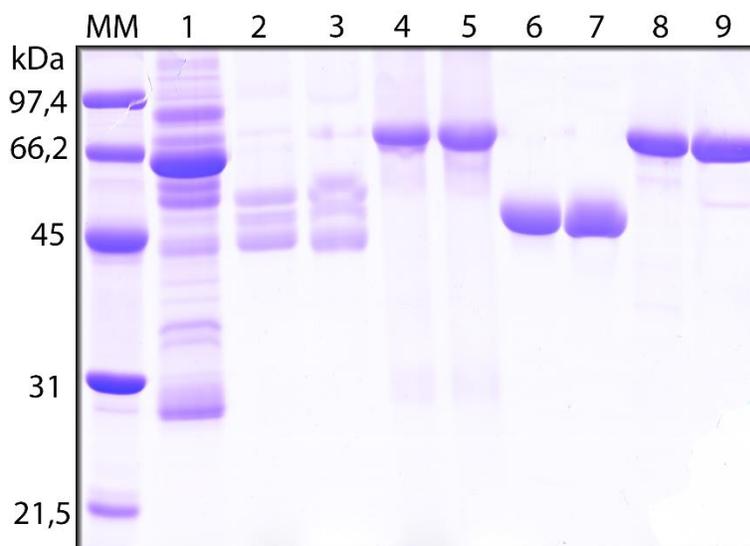


Figura 3.14. SDS-PAGE (12% T) do soro de *D. marsupialis* e de suas frações antiofídicas purificadas. 1. Soro de *D. marsupialis*; 2: Fração ligada à coluna de DEAE-Sephacel (+ DTT); 3: Fração ligada à coluna de DEAE-Sephacel (- DTT); 4: Fração de DEAE ligada à coluna de afinidade (tubos 15-17 da Figura 3.11) (+ DTT); 5: Fração de DEAE ligada à coluna de afinidade (tubos 15-17 da Figura 3.11) (- DTT); 6: DM43 isolada do soro de *D. aurita* (+ DTT); 7: DM43 isolada do soro de *D. aurita* (- DTT); 8. DM64 isolada do soro de *D. aurita* (+ DTT); 9: DM64 isolada do soro de *D. aurita* (- DTT). Foram aplicados 5 μ L das frações cromatográficas em cada raia do gel, que foi revelado com azul de Coomassie R250.

3.2.4 Caracterização das propriedades físico-químicas das proteínas DM43-like e DM64-like

As proteínas antiofídicas purificadas do soro de *D. marsupialis* da Colômbia foram submetidas à eletroforese bidimensional em *strips* de pH 3-10, como mostrado na Figura 3.15 abaixo. Apesar da pouca quantidade de proteína aplicada no gel, é possível notar que as bandas ficaram arrastadas, o que indica uma grande diversidade de proteoformas nestas amostras. É possível que esta diversidade seja explicada por diferenças nos padrões de glicosilação, como já reportado para DM43 de *D. aurita* (Neves-Ferreira *et al.*, 2002). O pI e a massa molecular de cada uma das proteínas foi calculado pelo programa ImageMaster 2D Elite e os valores correspondentes aos pontos com maior intensidade de *pixels* estão mostrados na Tabela 3.6.

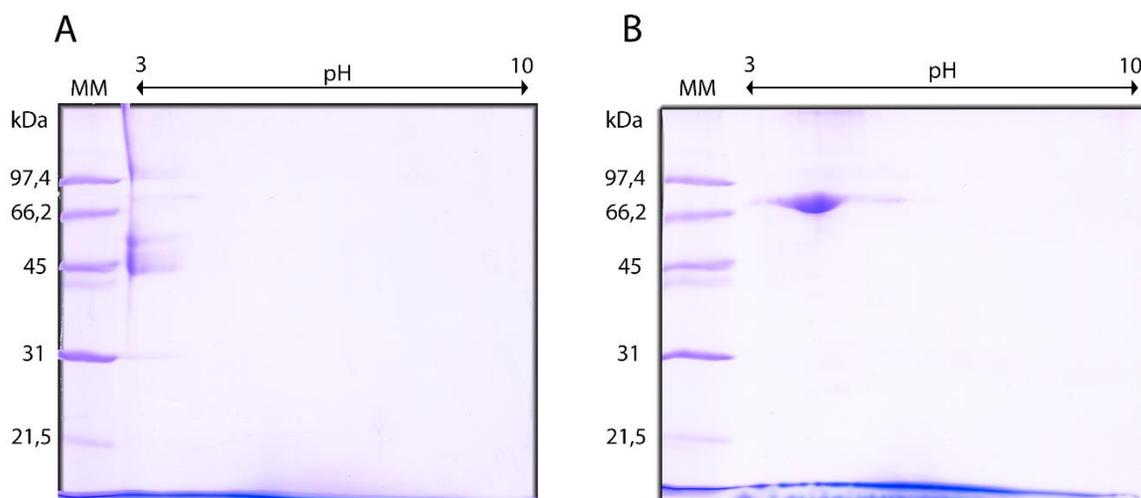


Figura 3.15. Eletroforese bidimensional (pH 3-10, SDS-PAGE 12% T em condições redutoras) das proteínas DM43-like e DM64-like isoladas do soro de *D. marsupialis* da Colômbia. Foram aplicados 25 µg de proteína em cada gel, que foi revelado com azul de Coomassie R250. A raia contendo padrão de massa molecular (MM) está indicada.

Proteína	Ponto isoelétrico (calculado pelo ponto com maior intensidade de <i>pixels</i>)	Massa molecular
DM64-like	4,2	76,2 kDa
DM43-like 1	3,2	54,9 kDa
DM43-like 2	3,3	48,2 kDa
DM43-like 3	3,4	43,8 kDa

Tabela 3.6. Valores de ponto isoelétrico e massa molecular das proteínas isoladas do soro de *D. marsupialis*.

Os resultados acima confirmam que as proteínas isoladas são bastante ácidas, sendo a DM64-like um pouco menos ácida, e as DM43-like mostrando valores muito parecidos entre elas. Os pontos isoelétricos estimados estão muito próximos do limite mínimo da curva de calibração, sendo difícil de determinar com acurácia. O ponto isoelétrico da DM64-like é ligeiramente inferior ao de DM64 de *D. aurita* (pI 4,5) (Rocha *et al.*, 2002). Desta forma, no pH 3.7 do tampão Tris 0,01M da cromatografia de troca iônica, espera-se que a DM64-like esteja pouco carregada, o que explicaria o porquê de ela ter interagido muito fracamente com a coluna (apenas uma pequena porção de DM64-like coeluiu com a fração DM43-like). Estes

pontos isoelétricos estão de acordo com os encontrados para as DM40 (< 3,5), DM43 (< 3,5) (Neves-Ferreira *et al.*, 2000) e DM64 (4,5) (Rocha *et al.*, 2002) de *D. aurita* e para a oprin (< 3,5)(Catanese & Kress, 1992) de *D. virginiana*. As massas moleculares dessas proteínas medidas por eletroforese em gel de poliacrilamida são superestimadas em função da presença de glicosilação, artefato previamente reportado para DM43 e DM64 (Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2002). Portanto, os valores estimados por SDS-PAGE deverão ser retificados utilizando espectrometria de massas com as proteínas intactas.

Para confirmar a presença de glicosilação, as proteínas DM43-*like* e DM64-*like* foram incubadas com a enzima PNGase F, que cliva a N-acetilglucosamina ligada covalentemente a um resíduo de asparagina (Tarentino & Plummer, 1994). O produto da reação de desglicosilação foi analisado em dois géis idênticos (SDS-PAGE 12% T em condições redutoras), posteriormente revelados por azul de Coomassie ou por ácido periódico-Schiff (Figura 3.16).

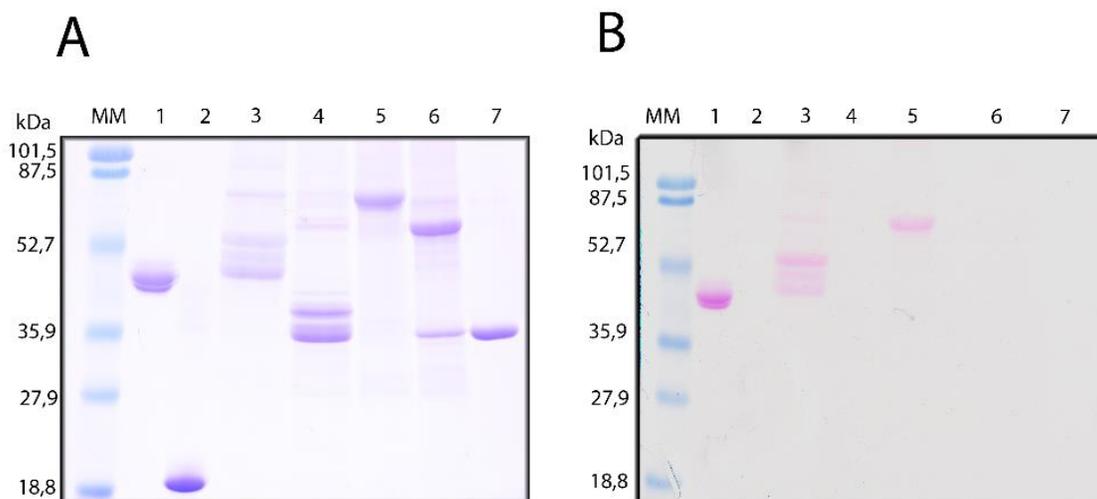


Figura 3.16. SDS-PAGE (12% T) em condições redutoras das proteínas DM43-*like* e DM64-*like* de *D. marsupialis* tratadas com PNGase F. A) Gel revelado com azul de Coomassie R250; B) Gel revelado com ácido periódico-Schiff. 1) Controle positivo de glicosilação (peroxidase de raiz forte, 5 µg); 2) Controle negativo de glicosilação (inibidor tróptico de soja, 5 µg); 3) Fração DM43-*like*; 4) Fração DM43-*like* desglicosilada 5) Proteína DM64-*like*; 6) Proteína DM64-*like* desglicosilada; 7) PNGase F. A raia contendo padrão pré-corado de massa molecular (MM) está indicada.

Podemos observar que, após tratamento com PNGase F, houve redução da massa molecular de todas as bandas correspondentes às proteínas DM-like. Estas bandas desglicosiladas não foram reveladas pela coloração com ácido periódico-Schiff específica para proteínas glicosiladas. Este resultado confirma que todas as 4 proteínas são glicoproteínas, da mesma forma que todas as demais proteínas inibidoras de toxinas isoladas até o presente momento (Bastos *et al.*, 2016; Campos *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2002). As diferenças de massa molecular entre as proteínas nativas e as desglicosiladas foram calculadas pelo programa ImageMaster 2D Elite, assumindo que a ordem das massas moleculares desglicosiladas é a mesma das proteínas glicosiladas (Tabela 3.7).

Proteína	Glicosilada (kDa)	Desglicosilada (kDa)	Diferença (kDa)	% Carboidratos
DM64-like	72,6	60,9	11,7	16,1
DM43-like 1	56,5	41,8	14,7	26,0
DM43-like 2	51,4	37,7	13,7	26,6
DM43-like 3	47,1	34,8	12,3	26,1

Tabela 3.7. Massa molecular relativa das proteínas isoladas do soro de *D. marsupialis* da Colômbia antes e após desglicosilação com PNGase F.

Mais uma vez, os resultados indicam similaridade com DM40, DM43 e DM64 de *D. aurita* e com oprina de *D. virginiana*, cujos níveis de glicosilação foram estimados por SDS-PAGE em 20,9%, 25,9-26,7%, 15% e 26% respectivamente (Catanese & Kress, 1992; Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2002). É interessante notar que os inibidores de metaloendopeptidases mostram um conteúdo relativo de glicanos superior aos inibidores de fosfolipases A₂ miotóxicas. A porção de glicanos da DM43 possui N-acetilglicosamina, manose, galactose e ácido siálico em proporções molares de 4:3:2:2, representando 21% de sua massa molecular total (medida por espectrometria de massas) (Neves-Ferreira *et al.*, 2002). Assumindo que a proporção de glicanos nas proteínas antiofídicas de Didelphídeos é conservada, poderíamos esperar encontrar composições e abundâncias similares em DM43-like e DM64-like.

Rodriguez León *et al.*, (2012) mostraram anteriormente que a DM43 e DM64 de *D. aurita* apresentam 4 sítios de N-glicosilação, caracterizados por espectrometria de massas. Adicionalmente, a DM43 parcialmente desglicosilada com PNGase-F, em condições não

desnaturantes, mantém apenas 50% de sua atividade inibitória sobre a atividade proteolítica da jararagina, o que pode indicar que a glicosilação influencia na atividade inibitória das DMs. Rodriguez León *et al.* (2012) também demonstraram que os tratamentos de DM43 e DM64 com neuranimidase e com β -galactosidase não afetaram a interação entre DM43 ou DM64 com a jararagina e miotoxina II de *B. asper*, respectivamente, assim como não influenciaram a atividade inibitória da DM43 sobre a atividade proteolítica da jararagina. Estes resultados indicam que tanto o ácido siálico quanto a β -galactose dos glicanos complexos das DMs não interferem com a interação destas proteínas com suas toxinas-alvo. A determinação da importância da porção de glicanos destas proteínas sobre sua função será crucial para avaliar a viabilidade da produção destas proteínas em sistemas heterólogos. A DM64 de *D. aurita* foi expressa de forma recombinante em *Pichia pastoris*, cujo padrão de glicosilação é predominantemente manose (Cereghino & Cregg, 2000), porém, isto não afetou a inibição do efeito citotóxico da miotoxina II (Vieira *et al.*, 2017).

3.2.5 Caracterização das atividades biológicas das proteínas antiofídicas DM43-like e DM64-like

Nos ensaios de coagulação utilizando plasma humano citratado, a proteína DM43-like inibiu a atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus*, enquanto a DM64-like não mostrou qualquer efeito (Figura 3.17). Como mencionado anteriormente, o teste de Shapiro-Wilks evidenciou que a amostra apresenta uma distribuição que não é normal ($p=6.209 \cdot 10^{-06}$) e por tanto se utilizaram testes não paramétricos para a análise. No teste de Kruskal-Wallis, a DM43-like mostrou uma diferença significativa ($p=0.0149$) mas a DM64-like não ($p=0.0538$), mostrando que a proporção veneno:DM43 1:8 é quem é estatisticamente diferente do controle. A correlação de Spearman entre a atividade do soro e da DM43-like deu um valor de 0.94, o que sugere que a atividade neutralizante da DM43-like se relaciona fortemente com a atividade do soro, em quanto a correlação do soro com a DM64-like é de -0.67 o que indica uma baixa correlação negativa. Esta correlação com a DM43-like é esperada, pois como determinado anteriormente, a atividade pro-coagulante deste veneno deve se fundamentalmente a ação de SVMPs, grupo enzimático que a DM43 de *D. aurita* inibe, sugerindo assim que são as DM43-like as majormente responsáveis pela inibição desta

atividade no soro sanguíneo de *D. marsupialis*. Da mesma forma, a DM64 de *D. aurita* inibe miotoxinas PLA₂, por tanto não se esperava encontrar correlação nesta atividade.

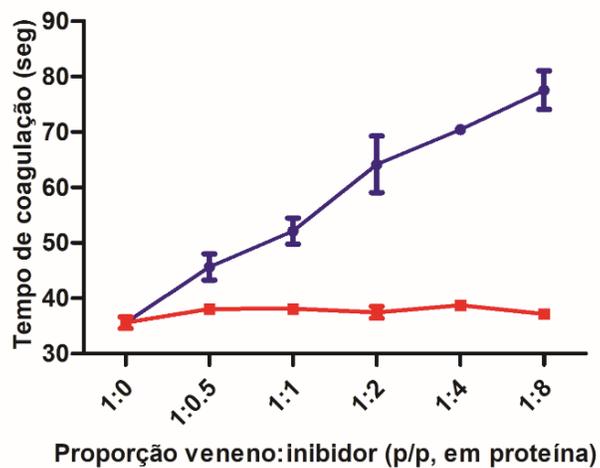


Figura 3.17. Inibição da atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* em plasma humano citratado pelas proteínas antiofídicas DM43-like ou DM64-like (n=2. Representação da média com desvio padrão). Foram utilizadas 2 doses coagulantes mínimas do veneno sobre o plasma humano citratado, na ausência ou presença de quantidades crescentes dos inibidores. Em cada um dos dois experimentos independentes realizados, o tempo de coagulação nas diferentes condições experimentais foi determinado em triplicata técnica. Linha azul: DM43-like; Linha vermelha: DM64-like. 1:0 = Controle de veneno sem inibidor. No controle do inibidor sem veneno, não houve coagulação.

Por outro lado, ao serem utilizadas as proteínas DM43-like e DM64-like no teste usando fibrinogênio como substrato (Figura 3.18), se demonstrou que nenhuma das duas proteínas têm efeito sobre a atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus*. Desta maneira, confirmamos que nenhuma das proteínas apresenta inibição de serinoendopeptidases *thrombin-like* pois, como demonstrado anteriormente, esta classe de enzimas é a responsável por induzir a coagulante do fibrinogênio diretamente.

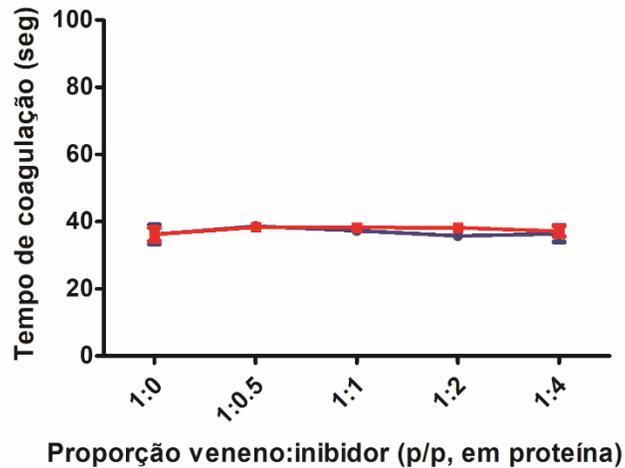


Figura 3.18. Atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* sobre solução de fibrinogênio a 0.3% na ausência e presença das proteínas antifibrinolíticas DM43-like ou DM64-like (n=2. Representação da média com desvio padrão). Foram utilizadas 2 doses coagulantes mínimas do veneno sobre solução de fibrinogênio a 0.3 %, na ausência ou presença de quantidades crescentes dos inibidores. Em cada um dos dois experimentos independentes realizados, o tempo de coagulação nas diferentes condições experimentais foi determinado em triplicata técnica. Linha azul: DM43-like; Linha vermelha: DM64-like; 1:0 = Controle de veneno sem inibidor. No controle do inibidor sem veneno, não houve coagulação.

Como caracterizado anteriormente, a atividade pró-coagulante do veneno de *B. rhombeatus* se deve fundamentalmente à ação de metaloendopeptidases. A proteína DM43 foi caracterizada originalmente como um inibidor de metaloendopeptidases hemorrágicas (Neves-Ferreira *et al.*, 2000), principal componente tóxico do veneno de *B. jararaca*, espécie que habita os mesmos ambientes que o *D. aurita*. Desta forma, nossos resultados até aqui indicam que seus homólogos em *D. marsupialis* inibem a(s) metaloendopeptidase(s) pró-coagulante(s) presentes no veneno da espécie simpátrica *B. rhombeatus*, provavelmente formando complexos não-covalentes inativos, da mesma forma que já reportado para DM43. As metaloendopeptidases pró-coagulantes podem ser ativadores de fator X (Tans & Rosing, 2002), de fator V (Nicolaes & Rosing, 2006) e/ou de protrombina (Kini, 2005). Como perspectiva deste trabalho, pretendemos isolar a(s) enzima(s) pró-coagulante(s) do veneno de *B. rhombeatus*, que possuem esta atividade específica. Planejamos também isolar e caracterizar cada uma das três proteínas presentes na fração DM43-like, para aprofundar nossa compreensão acerca da relação estrutura-função destas proteínas.

Seguindo com a caracterização das possíveis atividades antiveneno, testamos se as proteínas DM43-like e DM64-like eram capazes de inibir a atividade fosfolipásica do veneno de *B. asper*, inibição que não foi evidenciada quando utilizamos soro total de *D. marsupialis*. Como esperado, nenhuma das proteínas conseguiu inibir a atividade enzimática das fosfolipases A₂ do veneno de *B. asper* do Pacífico da Costa Rica (Figura 3.19). Estes dados estão em concordância com os resultados obtidos por Rocha *et al.* (2002), que mostraram que a proteína antimiotóxica DM64 isolada do soro de *D. aurita* não foi capaz de inibir a atividade enzimática da miotoxina I isolada de *B. asper*. Esta atividade enzimática não está necessariamente relacionada com a miotoxicidade das PLA₂, pois vários homólogos destas enzimas, com substituições do ácido aspártico #49 por resíduos de lisina, serina, arginina, aspartato ou glutamato, que inibe a atividade catalítica, ainda conseguem manter a atividade miotóxica. Isto se deve provavelmente a um agrupamento de resíduos catiônicos e hidrofóbicos/aromáticos na região C-terminal destes homólogos de PLA₂, que interage com as cargas negativas dos fosfolídeos da membrana celular (Lomonte & Rangel, 2012).

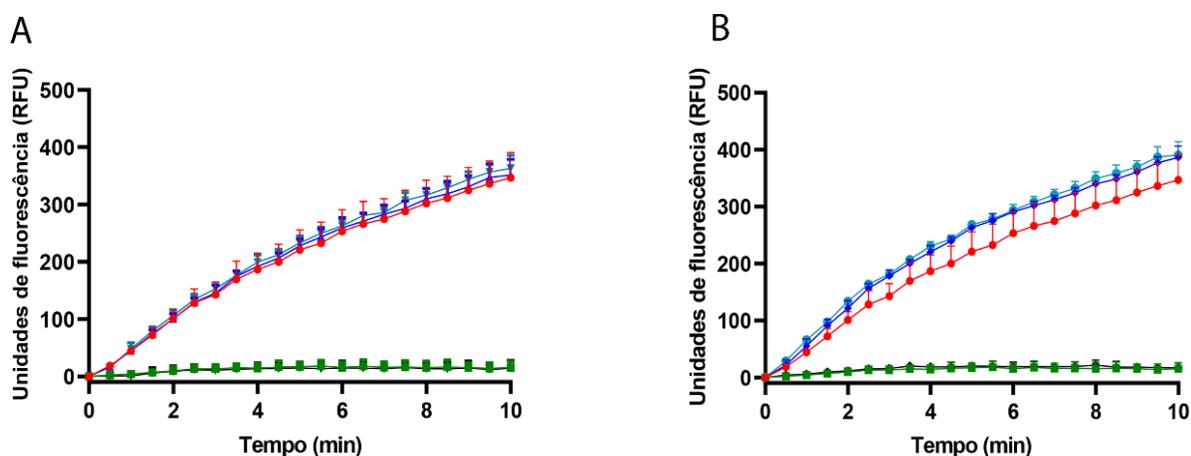


Figura 3.19. Ensaio de inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *B. asper* pelas proteínas antiofídicas de *D. marsupialis* DM43-like (A) ou DM64-like (B) (n=2. Representação da média com desvio padrão). Em cada um dos dois experimentos independentes realizados, a atividade fosfolipásica nas diferentes condições experimentais foi determinada em duplicata técnica, utilizando o kit Enzchek. Veneno controle (0,5 µg): linha vermelha; Veneno + p-BPB (linha verde); Veneno + DM-like (1:2 m/m): Linha azul/quadrados; Veneno + DM-like (1:4 m/m): Linha azul/triângulos; DM-like controle (correspondente a 1:4 m/m) (linha preta).

3.2.6 Formação de complexo entre as proteínas antiofídicas DM43-like ou DM64-like e suas toxinas-alvo

Para avaliar a possível formação de complexos não-covalentes entre as proteínas antiofídicas de *D. marsupialis* e suas toxinas-alvo, utilizamos eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas. DM64-like foi incubada com a miotoxina II isolada do veneno de *B. asper* e a mistura foi submetida à análise eletroforética (Figura 3.20). Esta miotoxina é uma fosfolipase A₂ que não apresenta atividade catalítica, mas que mesmo assim mantém a atividade miotóxica característica do veneno de *B. asper* (Lomonte & Gutiérrez, 1989). Esta ausência de atividade enzimática é consequência de uma substituição de um ácido aspártico por uma lisina na posição 49, o que impede a coordenação do íon Ca⁺² fundamental para a atividade catalítica (Francis *et al.*, 1991).

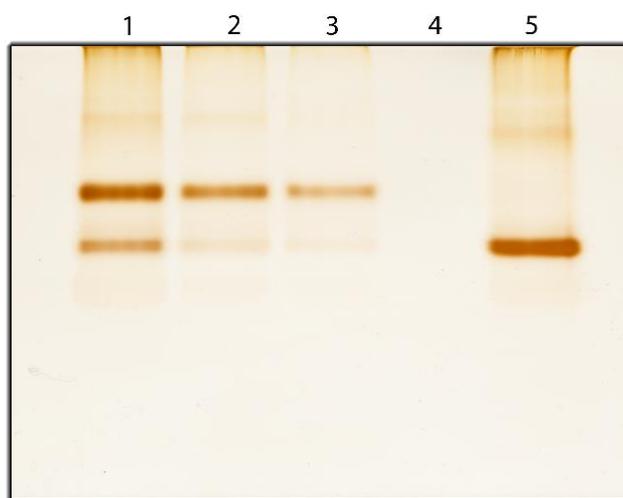


Figura 3.20. Eletroforese em gel nativo (12% T) para caracterizar a formação de complexo entre a miotoxina II de *B. asper* e a proteína DM64-like. 1) Miotoxina II:DM64-like (1:2 mol:mol); 2) Miotoxina II:DM64-like (1:1 mol:mol); 3) Miotoxina II:DM64-like (1:0,5 mol:mol); 4) Miotoxina II; 5) DM64-like (equivalente ao excesso molar de 2x). Gel revelado por impregnação com nitrato de prata.

Na figura 3.20, podemos observar o surgimento de uma banda de menor mobilidade eletroforética que não é visível nas raias equivalentes aos controles de DM64-like e miotoxina II. Esta banda foi submetida à digestão *in gel* e identificação por nLC-nESI-MS/MS, mostrando tratar-se de um complexo formado pela miotoxina e pela proteína DM64-like (não mostrado). Quando testamos excesso molar de 2x do inibidor, observamos uma banda bastante intensa de DM64 livre, indicando sobra de inibidor. Na relação molar 0,5:1

(inibidor:toxina), a banda do complexo não parece ter atingido saturação. Quando usamos quantidades equimolares de inibidor e toxina, não evidenciamos quantidade significativa de inibidor livre, indicando tratar-se da relação estequiométrica mais correta. A banda de miotoxina livre não pode ser visualizada no gel em função de seu caráter extremamente básico ($pI > 9$), que impede sua entrada no gel quando utilizamos o sistema de tampões descrito por Laemmli (1970). Este resultado é equivalente ao descrito anteriormente para DM64 de *D. aurita*, que se mostrou capaz de inibir a atividade miotóxica de miotoxina II (Rocha *et al.*, 2002). Neste trabalho, mostrou-se também que DM64 forma complexo com a miotoxina I de *B. asper*, inibindo a atividade miotóxica desta PLA₂ canônica, sem interferir com a atividade catalítica desta, diferentemente dos PLIs isolados do soro de serpentes, que conseguem inibir esta atividade enzimática, assim como o efeito neurotóxico das PLA₂ (Dunn & Broady, 2001). Com base na similaridade de sequência observada entre as proteínas DM64 de *D. aurita* e *D. marsupialis*, esperamos que também a DM64-like seja capaz de formar complexo e inibir a atividade miotóxica das PLA₂ D49.

Para verificar se a fração DM43-like forma complexo com metaloendopeptidases hemorrágicas, testou-se a jararagina, principal toxina desta classe isolada do veneno de *B. jararaca* (Paine *et al.*, 1992)(Figura 3.21A). Assim como mostrado anteriormente para DM64-like, utilizamos a eletroforese em gel nativo como metodologia de análise.

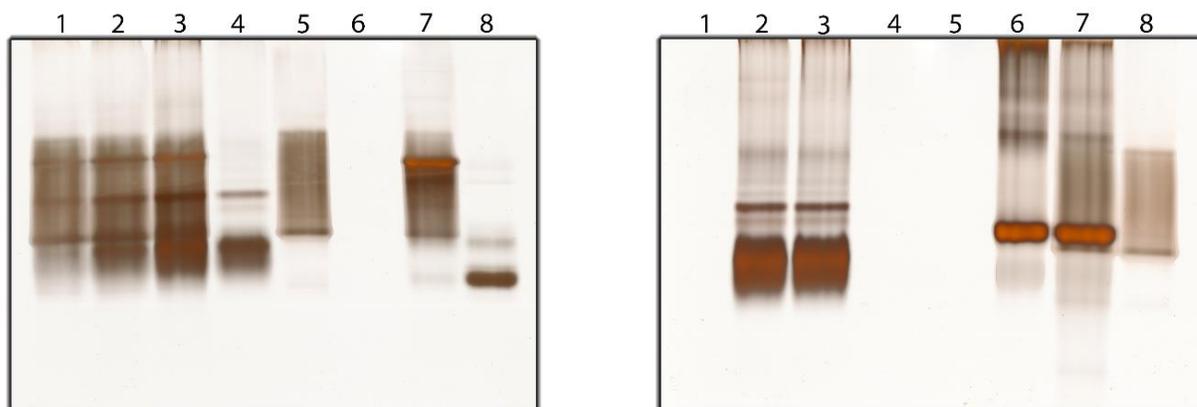


Figura 3.21. A) Eletroforese em gel nativo (12% T) para analisar a formação de complexo entre a jararagina de *B. jararaca* e a proteína DM43-like. 1) Jararagina:DM43-like (1:0,5 mol:mol); 2) Jararagina:DM43-like (1:1 mol:mol); 3) Jararagina:DM43-like (1:2 mol:mol); 4) DM43-like; 5) Jararagina 6) - ; 7) Jararagina+DM43 de *D. aurita* (1:1 mol:mol); 8) DM43 de *D. aurita*. **B) Eletroforese em gel nativo (12% T) dos controles negativos de interação.** 1) - ; 2) DM43-like; 3)

Miotoxina II+DM43-like (1:1 mol:mol); 4) Miotoxina II; 5) -; 6) DM64-like; 7) Jararagina+DM64-like (1:1 mol:mol); 8) Jararagina. Géis revelados por impregnação com nitrato de prata.

A primeira observação que pode ser feita é que o padrão de três bandas da fração DM43-like que aparece no SDS-PAGE em condições redutoras aparece como duas bandas apenas em gel nativo: uma banda superior estreita, além de outra banda inferior bastante mais intensa e larga. É possível que esta última corresponda à mistura das três proteínas que, como mostrado por eletroforese bidimensional (Figura 3.15), são extremamente ácidas, com valores de pI muito parecidos e, portanto, devem ter mobilidades eletroforéticas muito similares em gel nativo. Este mesmo padrão de bandas pode ser observado para DM43 (Figura 3.21A, raia 8). Em ambos os casos, a banda superior menos intensa pode corresponder a uma forma oligomérica da proteína e que, aparentemente, não forma complexo com a jararagina (*i.e.*, se mantém com mobilidade inalterada nas diferentes razões molares utilizadas). Por outro lado, a banda mais difusa é completamente consumida quando utilizamos excesso de jararagina (jararagina:DM43-like 1:0,5 mol:mol), ao mesmo tempo em que aparece uma nova banda de menor mobilidade eletroforética (similar à banda do complexo formado entre jararagina e DM43), indicando a formação de complexo entre a toxina e o inibidor. Isto indica que a DM43-like possivelmente possua atividade anti-hemorrágica, sendo capaz de inibir SVMPs PIII, como é o caso de DM43 de *D. aurita* (Neves-Ferreira *et al.*, 2000). Utilizando a fração DM43-like, que contém 3 proteoformas similares do inibidor de metaloendopeptidase de *D. marsupialis*, não foi possível estabelecer a estequiometria da interação com a jararagina. No futuro, pretendemos analisar a interação destas proteínas com metaloendopeptidases pró-coagulantes.

Na Figura 3.21B, mostramos dois controles negativos importantes para a caracterização das proteínas antiofídicas de *D. marsupialis*. Como esperado, segundo os dados da literatura para DM43 e DM64 de *D. aurita*, DM43-like não forma complexo com a miotoxina II de *B. asper*, nem DM64-like interage com a jararagina de *B. jararaca*. Este resultado mostra que, ainda que estas duas proteínas sejam homólogas e mostrem alta similaridade de sequência, existem especificidades não-compartilhadas no que diz respeito à inibição das toxinas-alvo.

Vale ressaltar que a preparação de jararagina utilizada neste trabalho apresenta uma única banda principal em SDS-PAGE em condições redutoras (Bastos *et al.*, 2020). O arraste visualizado no gel nativo analisado é um comportamento típico desta enzima em condições não-desnaturantes, fato que foi observado no laboratório anteriormente, sem que se conheça a explicação para o fenômeno.

3.3 Caracterização preliminar da composição proteica do veneno de *Bothrops rhombeatus*

A serpente *Bothrops rhombetus* habita desde a região norte do departamento do Cauca até o departamento de Antioquia. Apenas recentemente esta espécie foi reconhecida como independente de *Bothrops asper*, que se localiza no litoral pacífico e na região do Caribe da Colômbia, e de *Bothrops ayerbeii*, que se localiza unicamente na região subxerófitica do Patia, entre os departamentos de Cauca e Nariño (Folleco-fernández, 2010; Wallach *et al.*, 2014). Este reconhecimento não foi unânime e ainda existem discussões sobre esta classificação, já que alguns autores não a aceitam (Liévano-Bonilla, 2016; Ramírez-Chaves & Solari, 2014). Devido à constante problemática do conflito armado que se vivencia no departamento do Cauca, entre a guerrilha e o governo central, poucos pesquisadores conhecem esta espécie e seu veneno, fazendo com que a epidemiologia e os aspectos clínicos sejam praticamente desconhecidos. Mais de 4.000 casos de ofidismo são reportados anualmente na Colômbia, sendo cerca de 90% destes causados pela *B. asper* (Otero-Patiño, 2009; Rojas Bárcenas, 2018). Infelizmente, ainda não conseguimos distinguir qual percentagem destes acidentes é causado por *B. rhombeatus*, pois os trabalhadores da saúde não são devidamente formados para reconhecer estas espécies. Sabe-se que o envenenamento por *B. rhombeatus* requer um quantitativo menor de frascos de antiveneno comercial quando comparado com os envenenamentos por *B. ayerbeii* e *B. asper*, os quais precisam de maior quantidade (Comunicação pessoal, MD. Santiago Ayerbe, Toxinologista, Universidad del Cauca, Popayán, Colômbia). A dose hemorrágica mínima determinada para *B. rhombeatus* é maior do que aquelas calculadas para outras espécies de *Bothrops*, enquanto sua dose coagulante mínima é muito menor do que as reportadas na literatura. Este resultado indica que, nesta espécie, há maior produção de metaloendopeptidases pró-coagulantes, em detrimento das metaloendopeptidases hemorrágicas (Rengifo-Rios *et al.*, 2019; este

trabalho). Por outro lado, o antiveneno comercial consegue neutralizar os efeitos hemorrágicos, pró-coagulantes e inflamatórios deste veneno (Rengifo-Rios, *et al.*, 2019), o que indica que os anticorpos gerados a partir do veneno de *B. asper*, *Crotalus durissus* e *Lachesis muta* conseguem reconhecer as metaloendopeptidases que causam estes efeitos e, portanto, estas proteínas devem possuir epítomos similares. Devido ao desconhecimento geral sobre esta espécie e sobre os efeitos que o veneno causa, decidimos caracterizar por técnicas proteômicas o veneno, de forma a contribuir para a compreensão do seu conteúdo proteico. Outrossim, o conhecimento da proteômica deste veneno é importante para o melhor entendimento do fenômeno de resistência do *D. marsupialis*, com quem ele estabeleceu uma relação coevolutiva de *arms race* na região onde as duas espécies são encontradas (Popayán, Colômbia). Inicialmente, fizemos uma análise eletroforética em gel unidimensional do veneno de *Bothrops rhombeatus*. Foram utilizadas condições redutoras e não redutoras e a revelação foi feita tanto por azul de Coomassie (Figura 3.22A) como por ácido periódico-Schiff (Figura 3.22B).

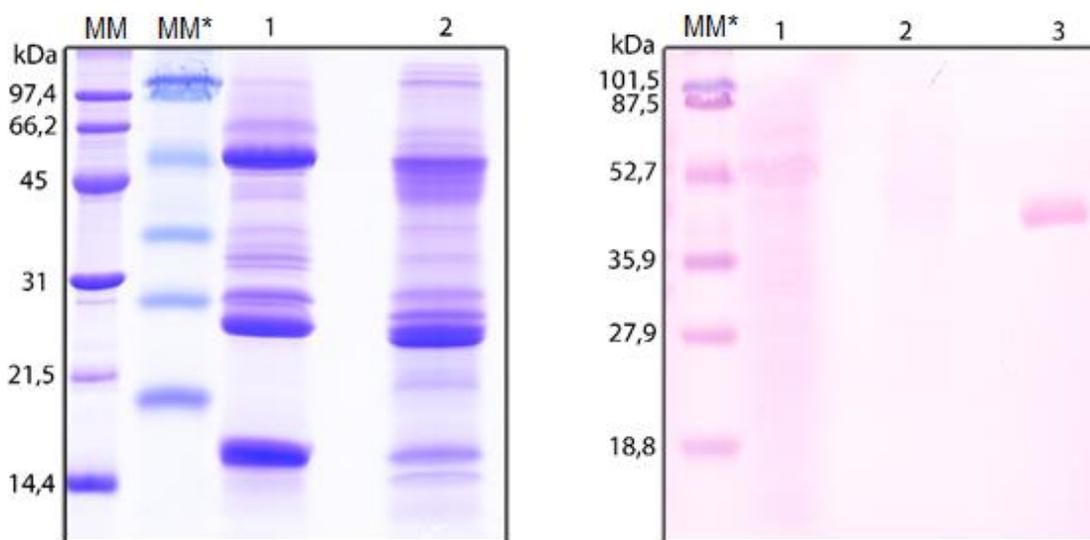


Figura 3.22. SDS-PAGE do veneno de *B. rhombeatus* em condições redutoras (raia 1) ou não-redutoras (raia 2). A) Gel revelado com azul brilhante de Coomassie R250. B) Gel revelado com ácido periódico-Schiff. 3) controle positivo de glicosilação (peroxidase de raiz-forte). As raia contendo padrão (MM) e padrão pré-corado (MM*) de massa molecular estão indicadas. Ambos géis contêm 10 µg de proteína por raia.

O perfil de Coomassie revelou a presença de proteínas com massas moleculares bastante diversas, principalmente na faixa entre 14,4 e 66,2 kDa. Os padrões proteicos do veneno com

e sem redução não mostraram diferenças muito significativas. As 20 bandas mais intensamente coradas com Coomassie foram excisadas como mostrado na figura 3.23, determinadas visualmente, seguido de digestão *in-gel* e análise por MS/MS no MALDI-TOF/TOF 5800. As proteínas identificadas estão mostradas na Tabela 3.8 e indicam predominância de proteínas das famílias de metaloendopeptidases e PLA₂. A análise pelo ácido periódico-Schiff indica que a presença de glicosilação é mais significativa na região de 50 kDa, provavelmente correspondendo a metaloendopeptidases de classe PIII, que frequentemente são glicosiladas (Fox & Serrano, 2005).

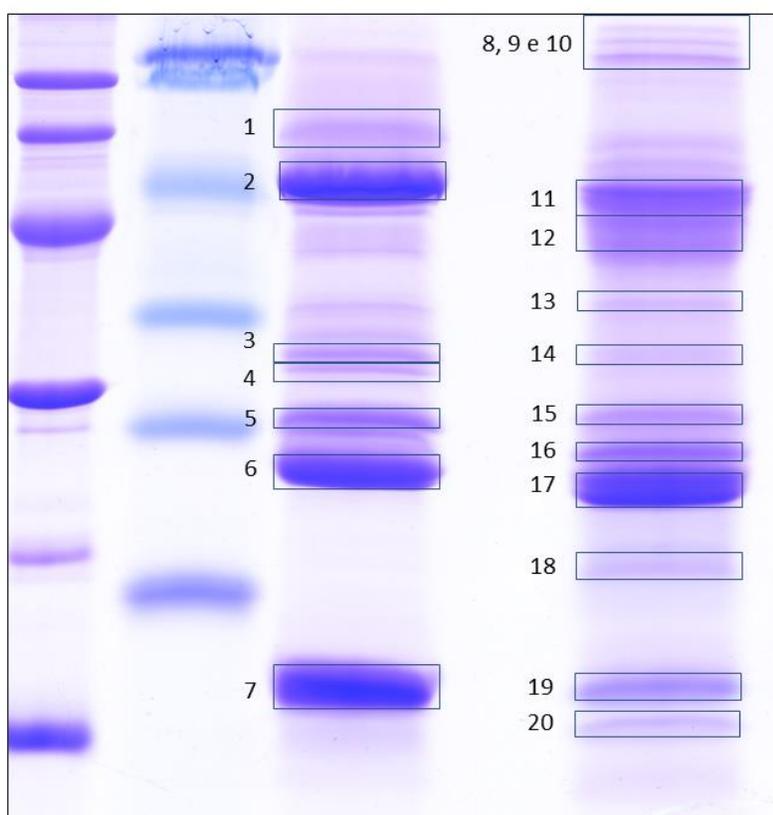


Figura 3.23. Padrão de bandas excisadas que foram analisadas por MALDI-TOF/TOF.
Bandas 1-7: Veneno tratado com DTT. Bandas 8-20: Veneno sem DTT.

Tabela 3.8. Lista de peptídeos gerados por espectrometria de Massas (MALDI-TOF/TOF). Cada amostra corresponde a banda do gel (figura 3.23) do mesmo número.

Amostra	Nome proteína	Código acesso	Massa (Da)	Probabilidade identificação	#Peptídeos únicos	#Spectral counts únicos	#Spectral counts	% Espectros totais	Cobertura sequência
1	Sem identificação								
2	Metalloprotease P-II (Fragment) OS= <i>Protobothrops elegans</i> OX=88086 PE=2 SV=1	A0A077L7G8	13,374.50	99.60%	1	1	1	20.00%	11.30%
	Atroxlysin-III OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	A0A0K2JNB8, A0A1S6K7T1, O93523, P30431, Q8QG88	68,283.70	100.00%	2	2	2	40.00%	4.26%
3	Sem identificação								
4	Snake venom serine protease LmrSP-4 (Fragment) OS= <i>Lachesis muta rhombeata</i> OX=60219 PE=1 SV=1	C0HLA3, Q27J47, Q91516	28,334.60	99.50%	1	1	1	14.30%	24.50%
	Serine endopeptidase OS= <i>Crotalus scutulatus</i> OX=8737 PE=2 SV=1	A0A2I7YS81, E5L0E5	28,078.00	97.90%	1	1	1	14.30%	15.40%
	Snake venom serine proteinase 12 OS= <i>Crotalus adamanteus</i> OX=8729 PE=1 SV=1	J3RY93, Q91053	28,908.90	100.00%	2	2	2	28.60%	15.80%

Continuação da tabela 3.8

Amostra	Nome proteína	Código acesso	Massa (Da)	Probabilidade identificação	#Peptídeos únicos	#Spectral counts únicos	#Spectral counts	% Espectros totais	Cobertura sequência
5	Snake venom metalloproteinase bothrojaractivase (Fragments) OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=1	P0C7A9	7,166.40	99.70%	1	1	1	33.30%	15.00%
6	Sem identificação								
7	Basic phospholipase A2 homolog 2 OS= <i>Bothrops asper</i> OX=8722 PE=1 SV=3	P24605,P58399,P82114,P82287,Q90249,Q9IAT9,Q9PVE3	15,559.60	99.70%	1	1	1	10.00%	10.20%
	BATXPLA3 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	A0A1L8D611	15,749.10	99.70%	1	1	1	10.00%	10.10%
	C-type lectin isoform 2 (Fragment) OS= <i>Bothrops moojeni</i> OX=98334 PE=2 SV=1	A0A2H4N3D1	19,188.70	99.70%	1	1	1	10.00%	7.78%
8	Sem identificação								

Continuação da tabela 3.8

Amostra	Nome proteína	Código acesso	Massa (Da)	Probabilidade identificação	#Peptídeos únicos	#Spectral counts únicos	#Spectral counts	% Espectros totais	Cobertura sequência
9	Metalloprotease P-II (Fragment) OS= <i>Protobothrops elegans</i> OX=88086 PE=2 SV=1	A0A077L7G8	13,374.50	99.70%	1	1	1	25.00%	11.30%
	BATXSVMPIII1 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	A0A1L8D5X9	68,046.80	100.00%	2	2	2	50.00%	4.91%
10	Snake venom metalloproteinase J (Fragment) OS= <i>Echis coloratus</i> OX=64175 PE=2 SV=1	A0A0A1WCK4,A0A0A1WD06,A0A194AMC0,A0A194APE3,A0A194ARL7,A0A194ATS5,A0A346CLS7,A0A346CLU6,A0A346CLV4,A0A346CM27,A0A346CM32,A0A346CM41,A0A346CM44,A8QL48,A8QL49,B0VXU9,C5H5D1,E9JGA2,F8S108,Q9DGB9	67,959.90	99.70%	1	1	1	25.00%	3.50%
	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like lachestatin-2 OS= <i>Lachesis muta rhombeata</i> OX=60219 PE=2 SV=1	C5H5D6	46,708.30	99.70%	1	1	1	25.00%	4.28%

Continuação da tabela 3.8

Amostra	Nome proteína	Código acesso	Massa (Da)	Probabilidade identificação	#Peptídeos únicos	#Spectral counts únicos	#Spectral counts	% Espectros totais	Cobertura sequência
11	BATXCTL33 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	A0A1L8D697	17,339.30	99.70%	1	1	1	10.00%	9.68%
12	Sem identificação								
13	Snake venom serine proteinase 12 OS= <i>Crotalus adamanteus</i> OX=8729 PE=1 SV=1	A0A1I9KNL5,A0 A1I9KNR8,A0A2I 7YS74,A0A2I7YS 79,A0A2I7YS83,A 0A2I7YS84,A7LA C6,B0FXM3,E0Y 420,E5L0E6,F8S1 14,J3RY93,J3S3W 5,K0IV83,O13058, O73800,P09872,P 0DJF6,P0DJG5,P0 DJG6,P20005,P81 882,Q6T5L0,Q71 QH6,Q71QI1,Q71 QI2,Q71QI4,Q8A Y81,Q91053,Q9P RW2,Q9PTL3,Q9 YGJ2,U5YCR8	27,783.30	99.70%	1	1	1	16.70%	5.00%
14	Sem identificação								
15	C-type lectin LmsL OS= <i>Lachesis stenophrys</i> OX=88085 PE=1 SV=1	Q9PSM4	16,223.40	100.00%	5	5	5	55.60%	44.40%

Continuação da tabela 3.8

Amostra	Nome proteína	Código acesso	Massa (Da)	Probabilidade identificação	#Peptídeos únicos	#Spectral counts únicos	#Spectral counts	% Espectros totais	Cobertura sequência
16	Cysteine-rich secretory protein OS= <i>Crotalus horridus</i> OX=35024 PE=3 SV=1	A0A0K8S072,A0A1L8D673,A0A223PK22,A0A2H4N3D5,F2Q6E3,F2Q6E4,F2Q6E5,F2Q6E6,F2Q6E7,F2Q6E8,F2Q6E9,F2Q6F4,F2Q6G0,F2Q6G1,Q8JI40,T2HPR8	26,937.70	100.00%	2	2	2	18.20%	12.10%
	BATXSVMPI5 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	A0A1L8D5Y9,A0A1L8D655,A0A1L8D683,A0A1L8D6A8,P85420,P86976	22,921.10	99.70%	1	1	1	9.09%	4.89%
	BATXSVMPI6 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	A0A1L8D5Y8,A0A2H4N390,P85314,Q1PHZ4,Q7T1T4	41,956.60	99.70%	1	1	1	9.09%	4.90%
17	Basic phospholipase A2 homolog 2 OS= <i>Bothrops asper</i> OX=8722 PE=1 SV=3	P24605, P58399, P82114, P82287,Q90249,Q9IAT9,Q9PVE3	15,559.60	99.80%	1	1	1	10.00%	10.20%
	BATXSVMPI5 OS= <i>Bothrops atrox</i> OX=8725 PE=2 SV=1	A0A1L8D5Y9,A0A1L8D655,A0A1L8D683,A0A1L8D6A8,P85420,P86976	22,921.10	100.00%	2	2	2	20.00%	8.80%
	MP_I2 SVMP (Fragment) OS= <i>Bothrops neuwiedi</i> OX=95648 PE=2 SV=1	E3UJL4, Q072L5	53,564.10	99.20%	1	1	1	10.00%	3.70%

Continuação da tabela 3.8

Amostra	Nome proteína	Código acesso	Massa (Da)	Probabilidade identificação	#Peptídeos únicos	#Spectral counts únicos	#Spectral counts	% Espectros totais	Cobertura sequência
18	BomoTx OS= <i>Bothrops moojeni</i> OX=98334 PE=2 SV=1	A0A1S5XW05, I6L8L6, P24605, Q9PVE3	15,559.60	100.00%	2	2	2	18.20%	18.80%
	Snake venom metalloproteinase bothrojaractivase (Fragments) OS= <i>Bothrops jararaca</i> OX=8724 PE=1 SV=1	A0A1L8D5Z6,A0A1L8D600, A0A1L8D641,A0A1L8D6A9, A0A2D4H732,A0A2H6N2D3, C0HJU2,E3UJL3,E3UJL4, E3UJM0,P0C6S0,P0C6S1, P0C7A9,P0DJJ6,P84907,Q072L5, Q5XUW8,Q9I9R4	22,524.90	99.30%	1	1	1	9.09%	15.00%
19	Basic phospholipase A2 bothropstoxin-2 OS= <i>Bothrops jararacussu</i> OX=8726 PE=1 SV=1	P45881, P86974	13,932.80	100.00%	2	2	2	20.00%	23.90%
20	Secretory phospholipase A2 OS= <i>Crotalus lepidus</i> OX=44709 PE=2 SV=1	A0A2I7YRZ4, Q7ZTA7	15,548.20	98.30%	1	1	1	20.00%	7.97%
Controle + (OVA)	sp #CONTAM#OVAL_CHICK	#CONTAM#OVAL_CHICK	42,881.70	100.00%	4	4	4	50.00%	15.30%

Para complementar os resultados proteômicos preliminares obtidos após digestão *in-gel* e identificação por MALDI-TOF/TOF, digerimos o veneno de *B. rhombeatus* em solução (2 experimentos independentes) e fizemos a identificação de seus peptídeos trípticos por nLC-MS/MS de alta resolução no QExactive HF-X. Os resultados de identificação estão mostrados na Tabela 3.9 e na Figura 3.24 e todos os detalhes estão descritos nas planilhas do material suplementar. Os números de espectros de peptídeos únicos (*unique spectral counts*) foram utilizados como estimativas grosseiras da abundância relativa das diferentes famílias de proteínas. É importante mencionar que, ainda que válido como indicador aproximado, o método de *spectral counting* não permite a quantificação relativa acurada de proteínas diferentes em uma mesma amostra. Esta limitação deve-se, fundamentalmente, a que proteínas têm tamanhos diferentes e geram peptídeos com eficiências de ionização diferentes (Nicolau et al., 2017). A abordagem *shotgun* empregada nesta dissertação difere da estratégia venômica clássica descrita por Calvete (2017), que emprega uma combinação de cromatografia de fase reversa seguida de SDS-PAGE e nLC-MS/MS ou MALDI-TOF MS/MS. Neste caso, há possibilidade de se estimar o conteúdo relativo de cada família de toxinas, ainda que o método não seja tão sensível para detectar proteínas pouco abundantes (Nicolau et al., 2017).

Usando a abordagem *shotgun*, confirmamos que as duas principais famílias no veneno de *B. rhombeatus* são metaloendopeptidases e as fosfolipases A₂. Esta característica também foi descrita para *B. asper* da Costa Rica, tanto do Pacífico quanto do Caribe (Alape-girón *et al.*, 2008). O veneno de *B. asper* do pacífico da Colômbia mostrou um perfil parecido com a do pacífico da Costa Rica, enquanto que a *B. ayerbeii* demonstrou ter um veneno com uma menor quantidade de PLA₂, compatível com sua baixa miotoxicidade, além de ter uma alta quantidade de metaloendopeptidases (53,7%), o que explicaria as importantes atividades hemorrágica e letal deste veneno (Mora-Obando et al., 2014). Entre outros componentes, também encontramos serinoendopeptidases no veneno de *B. rhombeatus*, enzimas que contribuem para o efeito pró-coagulante observado, especialmente com ação direta sobre o fibrinogênio. Outros venenos, como o de *B. jararaca*, possuem maior presença destas enzimas, já que mostram uma atividade pró-coagulante mais dependente de enzimas *thrombin-like* (Nicolau *et al.*, 2017). Na maior parte dos venenos de viperídeos, as

metaloendopeptidases representam a maior parte do conteúdo proteico do veneno (32%)(Fox & Serrano, 2009, 2008; Tasoulis & Isbister, 2017). Normalmente, estas enzimas exercem um potente efeito hemorrágico, sem muito efeito pró-coagulante. No caso de *B. rhombeatus*, a ação hemorrágica é menos importante, já que a dose hemorrágica mínima calculada foi 15 vezes maior do que aquela determinada para *B. ayerbeii* e 2,5 vezes maior do que a de *B. asper* (Rengifo-Rios *et al.*, 2019). Por outro lado, como discutido anteriormente, a dose coagulante mínima do veneno de *B. rhombeatus* é a menor já reportada na literatura. Resulta interessante notar que a *B. asper* é a única das três espécies separada por uma barreira geográfica (cordilheira ocidental), enquanto que as *B. ayerbeii* e *rhombeatus* não estão separadas, pois há registros de indivíduos com características morfológicas de *B. rhombeatus* numa região ao sul do rio Cauca, que segundo Folleco-Hernandez (2010) seria a barreira geográfica que as separa (Liévano-Bonilla, 2016; Ramírez-Chaves & Solari, 2014). Ambas espécies habitam em ecossistemas muito diferentes, onde a *B. ayerbeii* se encontra de ecossistemas de bosque seco, com baixas precipitações, baixa altitude, média de temperatura de 30-35°C e fauna adaptada a estas condições enquanto que a *B. rhombeatus* habita ecossistemas de maior elevação, com maiores precipitações, umidade, temperaturas amenas (15-25°C) e com um tipo de fauna diferente. É possível que estas mudanças nos ecossistemas levasse as espécies a selecionar a atividade toxica que pudesse lhe ser mais conveniente, mas a falta de informação sobre a história natural destas espécies dificulta poder chegar a conclusões contundentes. De qualquer forma, a controversia quanto à validade destas espécies persiste. Folleco-Hernandez (2010) revalidou o epíteto específico *B. rhombeatus* (Garcia, 1896) e propôs a nova espécie *B. ayerbeii*, baseado na lepidose (contagem de escamas), na coloração e no padrão dos desenhos formados. Ramírez-Chavez & Solari (2014) argumentaram que *B. rhombeatus* é uma forma ilegítima do nome *rhomboatus*, que de qualquer forma não conta com um holótipo que respalde esta revalidação, pelo qual classifica este epíteto como *nomem dubium* e a *B. ayerbeii* como nome não disponível. Isto devido a que esta última foi publicada na versão eletrônica da revista *Novedades Colombianas* no ano 2010, enquanto que o código de nomenclatura zoológica admite espécies publicadas em versões eletrônicas desde 2011. Liévano-Bonilla (2016) argumenta a falta de estatísticas sobre estes caracteres no trabalho de Folleco-Hernandez (2010) e consegue mostrar a que não existem diferenças significativas nos caracteres analisados, argumentando além, que os

caracteres morfométricos e de lepidose em *Bothrops* são altamente variáveis e finalmente sugere que estas espécies sejam tratadas como populações de *B. asper*, correspondentes as bacias hidrográficas onde habitam (ex. bacia do pácifico (*B. asper*), bacia do Patia (*B. ayerbei*) e bacia do Cauca (*B. rhomboatus*).

Ainda que esta controvérsia ainda precise ser resolvida por um estudo filogenético com marcadores moleculares, a divergência nas atividades biológicas e composição dos venenos é evidente. Liévano-Bonilla (2016) indica que a formação da cordilheira ocidental separou a população do pacífico das outras duas, as quais foram ainda separadas pela intensa atividade vulcânica que apresentou o sul da cordilheira central durante o Plioceno e o Holoceno (Irving, 1975). A grande quantidade de escombros gerados teria ajudado na formação do altiplano de Popayán, que se localizava entre a bacia alta do rio Patia até o departamento do Quindío, conectando a cume de ambas cordilheiras (Alvarado and Hubach, 1932; Torres, 1997). Isto possivelmente possibilitou a separação das populações do Patia e do Cauca. Posteriormente, este altiplano perdeu sua atitude, devido a processos erosivos por partes dos rios Cauca e Patia, permitindo assim a reunificação de ambas populações. A separação ocorrida explicaria que estas espécies tenham contado com tempo suficiente para que o veneno pudesse mutar, mostrando a atual diversidade de atividades e composições.

Finalmente, um estudo caracterizando as principais toxinas (SVMP e PLA₂) que estas serpentes possuem poderiam ajudar a definir a classificação destas espécies ou populações.

#	Famílias de proteínas identificadas	Código	# contagens espectrais únicas (RepBio_01)	# contagens espectrais únicas (RepBio_02)
1	Metaloenodopeptidase de veneno	SVMP	1.757	1.609
2	Fosfolipase A ₂	PLA2	1.067	1.052
3	L-aminoácido oxidase	LAAO	476	448
4	Serinoendopeptidase de veneno	SVSP	341	401
5	Proteína secretada rica em cisteína	CRISP	94	94
6	Lectina tipo-C	LECT_C	92	85
7	Fosfodiesterase de veneno	SVPD	83	69
8	Glutaminil-peptídeo ciclotransferase	GLUCT	66	65
9	5`-nucleotidase	5`NUCL	38	25
10	Neurotoxina	NEUR	22	25
11	Glutationa peroxidase	GLUPER	16	22

12	Dipeptidase	DIPEP	10	11
13	Amino peptidase de veneno	SVAP	9	6
14	Fator de crescimento endotelial vascular	VEGF	7	6
15	Proteína similar à catepsina B	CATHB	4	0
16	Hialuronidase	HYAL	4	4
17	Peroxiredoxina	PEROX	4	5
18	Serino carboxipeptidase de veneno	SVSCP	3	4
19	Endonuclease	ENDONU	0	3
20	Hemoglobina	HEMO	0	6
21	Proteína similar à saposina	SAPO	0	5

Tabela 3.9. Proteínas identificadas utilizando a técnica *shotgun* de proteômica do veneno de *B. rhombeatus*, contando os *spectral counts* dos peptídeos únicos de cada família de proteínas.

Em conclusão, os resultados da proteômica *shotgun* corroboram os encontrados por SDS-PAGE/MALDI-TOF/TOF, que apontam para uma predominância de metaloendopeptidases e PLA₂ no veneno de *B. rhombeatus*.

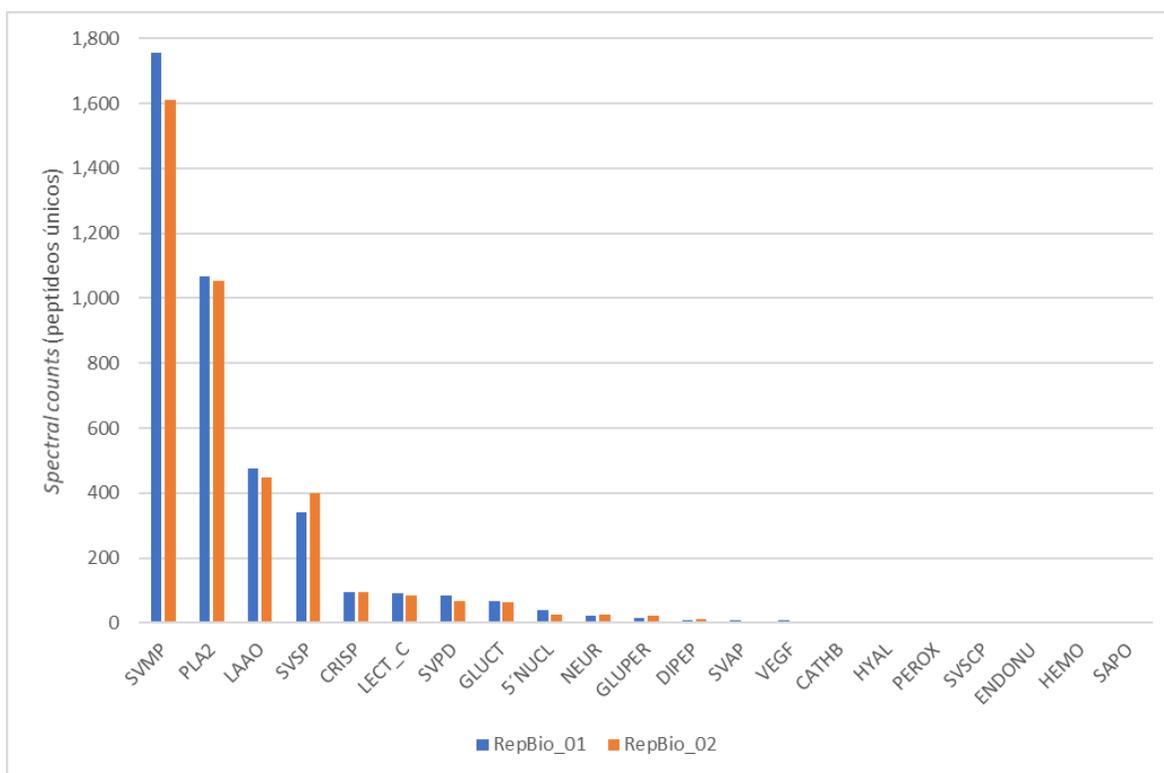


Figura 3.24. *Spectral counts* de peptídeos únicos do veneno de *B. rhombeatus*. RepBio_01 e 02 são as duas replicatas biológicas analisadas.

4. CONCLUSÕES

- O soro do marsupial colombiano *Didelphis marsupialis* inibiu as atividades pró-coagulante e proteolítica de venenos botrópicos (ambas dependentes de metaloendopeptidases), mas não interferiu com as atividades de serinoendopeptidases (*thrombin-like*) e fosfolipases A₂. Suas propriedades antiofídicas estão associadas à presença de proteínas similares aos inibidores de metaloendopeptidases e miotoxinas previamente isolados do soro de *D. aurita* brasileiro, respectivamente DM43 e DM64.
- As glicoproteínas DM43-like (MM 43, 48 e 54 kDa, pI < 3,5) inibem a atividade pró-coagulante do veneno de *Bothrops rhombeatus* sobre plasma e sua atividade proteolítica sobre azocaseína. Ambas atividades são dependentes de metaloendopeptidases. Elas formam complexo com a jararagina, principal metaloendopeptidase do tipo P-III hemorrágica isolada do veneno de *B. jararaca*.
- A glicoproteína DM64-like (MM 74 kDa, pI 4,2) não inibe a atividade pró-coagulante ou proteolítica de venenos botrópicos, mas forma complexo com miotoxina-II (PLA₂ K49) de *B. asper*, indicando sua possível atividade anti-miotóxica. Assim como já descrito para DM64, a atividade anti-miotóxica independe da inibição da atividade fosfolipásica do veneno.
- O veneno de *B. rhombeatus* é composto principalmente por metaloendopeptidases e fosfolipases A₂ e, em menor medida, por L-aminoácido oxidases e serinoendopeptidases, entre outras proteínas minoritárias, as quais são pouco/não glicosiladas. Esta composição permite explicar as atividades observadas neste trabalho, notadamente intensas atividades proteolíticas e pró-coagulante dependentes de metaloendopeptidases.
- A coevolução do *D. marsupialis* colombiano com a serpente simpátrica *Bothrops rhombeatus* parece ter moldado a seleção de proteínas antiofídicas com características similares, mas não idênticas, aos inibidores canônicos DM43 e DM64. Os novos

arcabouços moleculares antiveneno representados pelas proteínas *DM43-like* e *DM64-like* poderão contribuir para o desenvolvimento de tratamentos alternativos otimizados para o envenenamento ofídico causado por serpentes da Colômbia.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alape-girón, A., Sanz, L., Flores-díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J., 2008. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556–3571.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Flores-dí, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J., Rica, C., 2008. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *J. proteome* 7, 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
- Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., Abousalham, A., 2018. Phospholipases: An Overview, in: Sandoval, G. (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. Springer Protocols, Guadalajara, pp. 69–105. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9>
- Alvarado, B., Hubach, E., 1932. *Estudios Geológicos Alrededor de Popayán*. Servicio Geologico Nacional, Bogotá.
- Ariaratnam, C.A., Meyer, W.P., Perera, G., Eddleston, M., Kuleratne, S.A.M., Attapattu, W., Sheriff, R., Richards, A.M., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 1999. A new monospecific ovine Fab fragment antivenom for treatment of envenoming by the Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelii russelii*): A preliminary dose-finding and pharmacokinetic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 259–265. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.259>
- Arias, A.S., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., 2017. Peptidomimetic hydroxamate metalloproteinase inhibitors abrogate local and systemic toxicity induced by *Echis ocellatus* (saw-scaled) snake venom. *Toxicon* 132, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.04.001>
- Asega, A.F., Oliveira, A.K., Menezes, M.C., Neves-Ferreira, A.G.C., Serrano, S.M.T., 2014. Interaction of *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases with protein inhibitors. *Toxicon* 80, 1–8.
- Assafim, M., Frattani, F.S., Ferreira, M.S., Silva, D.M., Monteiro, R.Q., Zingali, R.B., 2016. Exploiting the antithrombotic effect of the (pro)thrombin inhibitor bothrojaracin. *Toxicon* 119, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.007>
- Ayerbe-González, S., 2009. Ofidismo en Colombia, Enfoque, Diagnostico y Tratamiento, in: Ordóñez, C.A., Ferrada, R., Buitrafo, R. (Eds.), *Cuidado Intensivo y Trauma*. Editorial Médica, Bogotá, p. 1304.
- Bastos, V., Gomes-Neto, F., Perales, J., Neves-Ferreira, A., Valente, R., 2016. Natural Inhibitors of Snake Venom Metalloendopeptidases: History and Current Challenges. *Toxins (Basel)*. 8, 250. <https://doi.org/10.3390/toxins8090250>
- Bastos, V.A., Gomes-Neto, F., Rocha, S.L.G., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Neves-Ferreira, A.G.C., Valente, R.H., 2020. The interaction between the natural metalloendopeptidase inhibitor BJ46a and its target toxin jararhagin analyzed by

- structural mass spectrometry and molecular modeling. *J. Proteomics* 221, 103761. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103761>
- Biardi, J.E., Coss, R.G., Smith, D.G., 2000. California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) blood sera inhibits crotalid venom proteolytic activity. *Toxicon* 38, 713–721. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00179-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00179-8)
- Biardi, J.E., Ho, C.Y.L., Marcinczyk, J., Nambiar, K.P., 2011. Isolation and identification of a snake venom metalloproteinase inhibitor from California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) blood sera. *Toxicon* 58, 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.009>
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1995. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. *Methods Enzymol.* 248, 345–368. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)48023-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)48023-4)
- Bjarnason, J.B., Tu, A., 1978. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. *Biochemistry* 17, 3395–3404.
- Borkow, G., Gutiérrez, J.M., Ovadia, M., 1997. Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. *Toxicon* 35, 865–877. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00193-6)
- Brand, G.D., Salbo, R., Jørgensen, T.J.D., Bloch, C., Erba, E.B., Robinson, C. V., Tanjoni, I., Moura-da-Silva, A.M., Roepstorff, P., Domont, G.B., Perales, J., Valente, R.H., Neves-Ferreira, A.G.C., 2012. The Interaction of the Antitoxin DM43 with a Snake Venom Metalloproteinase Analyzed by Mass Spectrometry and Surface Plasmon Resonance. *J. Mass Spectrometry* 60, 208–209.
- Brown, N., Landon, J., 2010. Antivenom: The most cost-effective treatment in the world? *Toxicon* 55, 1405–1407. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.012>
- Calmette, A., 1895. Contribution a l'étude des venins, des toxines et des sérums antitoxiques. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 4, 225–251.
- Calmette, A., 1894. L'immunisation artificielle des animaux contre le venin des serpents, et la thérapeutique expérimentale des morsures venimeuses. *Comptes rendus des séances la Société Biol. ses Fil.* 46, 120–124.
- Calvete, J.J., 2017. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochem. J.* 474, 611–634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160577>
- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*, 1st ed. Cornell University Press, New York.
- Campos, P.C., de Melo, L.A., Dias, G.L.F., Fortes-Dias, C.L., 2016. Endogenous phospholipase A2 inhibitors in snakes: A brief overview. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 22, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0092-5>
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Wuüster, W., Cook, D.A.N., Bolton, F.M.S., King, S.I., Pla, D., Sanz, L., Calvete, J.J., Harrison, R.A., 2014. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 9205–9210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>
- Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G., 2013. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* 28, 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>
- Catanese, J.J., Kress, L.F., 1992. Isolation from Opossum Serum of a Metalloproteinase Inhibitor Homologous to Human Alfa1B-Glycoprotein. *Biochemistry* 31, 410–418.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00029-7)
- Chacón, F., Oviedo, A., Escalante, T., Solano, G., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., 2015. The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against *Bothrops asper* snake venom: Pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate in vitro assay. *Toxicon* 93, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.223>
- Chakrabarty, D., Chanda, C., 2017. Snake Venom Disintegrins, in: Gopalakrishnakone, P. (Ed.), *Snake Venoms*. Springer Science+Business Media, pp. 437–449.
- Charney, J., Tomarelli, R., 1947. A colorimetric Method for the Determination of the Proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* 171, 501.
- Chippaux, J.P., 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23, 1–2. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>
- Chippaux, J.P., 1998. Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bull. World Health Organ.* 76, 515–524.
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake Venom Variability : Methods of Study , Results and Interpretation. *Toxicon* 29, 1279–1303.
- Clemetson, K.J., 2010. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon* 56, 1236–1246. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.011>
- Clemetson, K.J., Morita, T., Manjunatha Kini, R., 2009. Scientific and standardization committee communications: Classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. *J. Thromb. Haemost.* 7, 360. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03233.x>
- Covell, D.G., Barbet, J., Holton, O.D., Black, C.D., Parker, R.J., Weinstein, J.N., 1986. Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1, F(ab')₂, and Fab' in mice. *Cancer Res.* 46, 3969–78.
- Cummings, R.D., McEver, R.P., 2009. Chapter 31: C-type Lectins, *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Davidson, F.F., Dennis, E.A., 1990. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J. Mol.*

Evol. 31, 228–238. <https://doi.org/10.1007/BF02109500>

- De Azara, F., 1802. Apuntamientos para la Historia Natural de Los Quadrúpedos del Paraguay y Rio de la Plata. Madrid.
- de la Rosa, G., Pastor, N., Alagón, A., Corzo, G., 2017. Synthetic peptide antigens derived from long-chain alpha-neurotoxins: Immunogenicity effect against elapid venoms. *Peptides* 88, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.12.006>
- De Roodt, A.R., Litwin, S., Vidal, J.C., 2003. Hemorrhagic activity of Bothrops venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. *Toxicon* 41, 949–958. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00392-6)
- De Silva, H.A., Ryan, N.M., De Silva, H.J., 2016. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81, 446–452. <https://doi.org/10.1111/bcp.12739>
- de Wit, C.A., Weström, B.R., 1987. Purification and characterization of α 2-, α 2- β - and β -macroglobulin inhibitors in the hedgehog, *Erinaceus europaeus*: β -macroglobulin identified as the plasma antihemorrhagic factor. *Toxicon* 25, 1209–1219. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90139-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90139-5)
- De Wit, C.A., Weström, B.R., 1987. Venom resistance in the Hedgehog, *Erinaceus europaeus*: Purification and identification of macroglobulin inhibitors as plasma antihemorrhagic factors. *Toxicon* 25, 315–323.
- Dennis, E.A., 1994. Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269, 13057–13060.
- Dennis, E.A., 1983. Phospholipases, in: Boyer, P.D. (Ed.), *The Enzymes*. Academic Press, pp. 307–353. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111, 6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>
- Devi, A., 1968. The Protein and Nonprotein Constituents of Snake Venoms, in: *Venomous Animals and Their Venoms*. ACADEMIC PRESS INC., pp. 119–165. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4832-2949-2.50014-x>
- Domont, G., Perales, J., Moussatché, H., 1991. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon* 29, 1183–1194.
- Donne-Op den Kelder, G.M., Hille, J.D.R., Dijkman, R., de Haas, G.H., Egmond, M.R., 1981. Binding of Porcine Pancreatic Phospholipase A2 to Various Micellar Substrate Analogues. Involvement of Histidine-48 and Aspartic Acid-49 in the Binding Process. *Biochemistry* 20, 4074–4078. <https://doi.org/10.1021/bi00517a020>
- Du, X.-Y., Clemetson, K.J., 2002. Snake venom l-amino acid oxidases. *Toxicon* 40, 659–665. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00102-2)

- Dunn, R.D., Broady, K.W., 2001. Snake inhibitors of phospholipase A2 enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1533, 29–37. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(01\)00138-X](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00138-X)
- Duque Osorio, J.F., Sánchez, A., Fierro, L., Garzón, S., Castaño, R.S., 2007. Venenos de Serpientes y Moléculas Antiveneno. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Fis. y Nat.* 31, 109–137.
- Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E.F., Richardson, M., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: Exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028017>
- Folleco-fernández, A.J., 2010. Taxonomía Del Complejo *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDÆ) En El Sudoeste de Colombia. Revalidación de la Especie *Bothrops rhombeatus* (Garcia 1896) Y Descripción de Una Nueva Especie. *Rev. Noved. Colomb.* 10, 1–34.
- Fontana, F., 1787. *Treatise on the venom of the viper; On the american poisons; and on the Cherry Laurel, and some other vegetable poisons.*
- Fortes-Dias, C.L., 2002. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A2 in the blood plasma of snakes. *Toxicon* 40, 481–484. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00274-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00274-4)
- Fortes-dias, C.L., Lin, Y., Ewell, J., Dinizs, C.R., Liu, T., 1994. A Phospholipase A2 Inhibitor from the Plasma of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *J. Biol. Chem.* 269, 15646–15651.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2009. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J. Proteomics* 72, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.015>
- 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 venom complexity. *FEBS J.* 275, 3016–3030. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>
- Francis, B., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Kaiser, I.I., 1991. Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. *Arch. Biochem. Biophys.* 284, 352–359. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90307-5)
- Fukuda, K., Doggett, T.A., Bankston, L.A., Cruz, M.A., Diacovo, T.G., Liddington, R.C., 2002. Structural Basis of von Willebrand Factor Activation by the Snake Toxin Botrocetin. *Structure* 10, 943–950. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00787-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00787-6)
- Furtado, M.F.D., Maruyama, M., Kamiguti, A.S., Antonio, L.C., 1991. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*

- 29, 219–226. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90106-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90106-2)
- García, E., 1896. *Los Ofidios Venenosos del Cauca. Métodos empíricos y racionales empleados contra los accidentes producidos por la mordedura de esos reptiles.* Librería Colombiana, Cali.
- Gardner, A. L., 2007. *Mammals of South America, Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats.* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gardner, Alfred L., 2007. *Mammals of South America, 1st ed.* The University of Chicago, Chicago-London. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gloyd, H.K., 1933. On The Effect of Moccasin Venom Upon a Rattlesnake, *Science*.
- Gould, R.J., Polokoff, M.A., Friedman, P.A., Huang, T., Holt, J.C., Cook, J.J., Niewiarowski, S., 1990. Disintegrins : A Family of Integrin Inhibitory. *Exp. Biol. Med.* 195, 3–6. <https://doi.org/10.3181/00379727-195-43129B>
- Guércio, R.A.P., Shevchenko, Anna, Shevchenko, Andrej, López-Lozano, J.L., Paba, J., Sousa, M. V., Ricart, C.A.O., 2006. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-4-11>
- Gutiérrez, J., Arroyo, O., Bolaños, R., 1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18, 603–610. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(80\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(80)90087-2)
- Gutiérrez, J.M., 2011. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe. *Boletín Mariología y Salud Ambient.* LI, 1–16.
- Gutiérrez, J.M., 1995. Clinical Toxicology of Snake Bite in Central America, in: Meier, J., White, J. (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons.* CRC Press, Florida, pp. 645–665.
- Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., 2016. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. *Toxins (Basel)*. 8, 93. <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>
- Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B., 2003. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 721–741.
- Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B., Angulo, Y., 2011. Antivenoms for Snakebite Envenomings. *Inflammation and Allergy* 10, 369–380.
- Gutiérrez, J.M., León, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A., Chaves, F., 1998. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 36, 1529–1538. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00145-7)

- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A2 Myotoxins from *Bothrops asper* venoms. *Toxicon* 33, 1405–1424.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.005>
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., Escalante, T., 2009. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54, 958–975. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.038>
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>
- Habib, A.G., Brown, N.I., 2018. The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon* 150, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.009>
- Hains, P.G., Nield, B., Sekuloski, S., Dunn, R., Broady, K., 2001. Sequencing and two-dimensional structure prediction of a phospholipase a2 inhibitor from the serum of the common tiger snake (*notechis scutatus*). *J. Mol. Biol.* 312, 875–884. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4972>
- Harris, J.B., Cullen, M.J., 1990. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc. Rev.* 3, 183–211. [https://doi.org/10.1016/0892-0354\(90\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0892-0354(90)90001-9)
- Harrison, R.A., Hargreaves, A., Wagstaff, S.C., Faragher, B., Lalloo, D.G., 2009. Snake envenoming: A disease of poverty. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000569>
- Hawgood, B.J., 1992. Pioneers of Anti-Venomous Serotherapy: Dr Vital Brazil. *Toxicon* 30, 573–579.
- Heinrikson, R.L., Krueger, E.T., Keim, P.S., 1977. Amino acid sequence of phospholipase A2- α from the venom of *Crotalus adamanteus*. *J. Biol. Chem.* 252, 4913–4921.
- Heybone, W.H., Mackessy, S.P., 2016. Cysteine-Rich Secretory Proteins in Reptile Venoms, in: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, pp. 325–335.
- Hill, R.E., Mackessy, S.P., 2000. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. *Toxicon* 38, 1663–1687. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00091-X)
- Ho, M., Silamut, K., White, N.J., Karbwang, J., Looareesuwan, S., Phillips, R.E., Warrell, D.A., 1990. Pharmacokinetics of three commercial antivenoms in patients envenomed by the Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*, in Thailand. *Am. J. Trop. Med.*

- Hyg. 42, 260–266. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.260>
- Holding, M.L., Drabeck, D.H., Jansa, S.A., Gibbs, H.L., 2016. Venom Resistance as a Model for Understanding the Molecular Basis of Complex Coevolutionary Adaptations. *Integr. Comp. Biol.* 56, 1032–1043. <https://doi.org/10.1093/icb/icw082>
- Irving, E.M., 1975. Structural Evolution of the Northern Andes, Colombia. *Geol. Surv. Prof. Pap.* 846 746.
- Jansa, S. a, Voss, R.S., 2011. Adaptive evolution of the venom-targeted vWF protein in opossums that eat pitvipers. *PLoS One* 6, e20997.
- Jiménez-Porras, J., 1964. Venom Proteins Of The FER-DE-LANCE, Bothrops atrox, From Costa Rica. *Toxicon* 2, 155–166.
- Jurgilas, P.B., Neves-Ferreira, A.G.C., Domont, G.B., Perales, J., 2003. PO41, a snake venom metalloproteinase inhibitor isolated from Philander opossum serum. *Toxicon* 42, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.08.006>
- Karain, B.D., Lee, M.K.H., Hayes, W.K., 2016. C60 fullerenes as a novel treatment for poisoning and envenomation: A proof-of-concept study for snakebite. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16, 7764–7771. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12851>
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., De Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., De Silva, H.J., 2008. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 5, 1591–1604. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
- Kini, R.M., 2005. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon* 45, 1133–1145. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.019>
- Knudsen, C., Laustsen, A.H., 2018. Recent Advances in Next Generation Snakebite Antivenoms. *Trop. Med. Infect. Dis.* 3, 1–11. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020000>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 227–231.
- Lalloo, D.G., Theakston, R.D.G., 2003. Snake antivenoms. *J. Toxicol. - Clin. Toxicol.* 41, 277–290. <https://doi.org/10.1081/CLT-120021113>
- Laustsen, A.H., 2018. Toxin-centric development approach for next-generation antivenoms. *Toxicon* 150, 195–197. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.021>
- Laustsen, A.H., Johansen, K.H., Engmark, M., Andersen, M.R., 2017. Recombinant snakebite antivenoms: A cost-competitive solution to a neglected tropical disease? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005361>
- León, G., Monge, M., Rojas, E., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2001. Comparison between IgG and F(ab')₂ polyvalent antivenoms: Neutralization of systemic effects induced by Bothrops asper venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potential for induction of adverse reactions. *Toxicon* 39, 793–801. [118](https://doi.org/10.1016/S0041-</p></div><div data-bbox=)

- Lewin, M., Samuel, S., Merkel, J., Bickler, P., 2016. Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. *Toxins (Basel)*. 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8090248>
- Li, R., Zhu, S., Wu, J., Wang, W., Lu, Q., Clemetson, K.J., 2008. L-amino acid oxidase from *Naja atra* venom activates and binds to human platelets. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 40, 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00372.x>
- Liévano-Bonilla, A.F., 2016. Comparación morfológica de tres poblaciones de serpientes del complejo *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE) del suroccidente colombiano. Universidad del Cauca.
- Lindahl, M., de Wit, C.A., Weström, B.R., Von Schenck, H., Tagesson, C., 1991. Demonstration of a Phospholipase A2 Inhibitor in Human Plasma and From the European Hedgehog. *Int. J. Biochem.* 23, 287–292.
- Lizano, S., Domont, G., Perales, J., 2003. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon* 42, 963–77.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.008>
- Lomonte, B., Cerdas, L., Gené, J.A.A., Gutiérrez, J.M.M., 1982. Neutralization of local effects of the terciopelo (*Bothrops asper*) venom by blood serum of the colubrid snake *Clelia clelia*. *Toxicon* 20, 571–579. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90051-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90051-4)
- Lomonte, B., Gutiérrez, J., 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27, 725–733. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90039-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90039-1)
- Lomonte, B., Rangel, J., 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007>
- Lovo Farah, M.D.F., One, M., Novello, J.C., Toyama, M.H., Perales, J., Moussatché, H., Domont, G.B., Oliveira, B., Marangoni, S., 1996. Isolation of Protein Factors From Opossum (*Didelphis albiventris*) Serum Which Protect Against *Bothrops jararaca* Venom. *Toxicon* 34, 1067–1071.
- Maraganore, J.M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kézdy, F.J., Heinrikson, R.L., 1984. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 259, 13839–13843.
- Mebs, D., Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y., Nagaoka, Y., 1996. Erinacin, an antihemorrhagic factor from the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *Toxicon* 34, 1313–1316. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00104-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00104-3)

- Melo, P. a, Suarez-Kurtz, G., 1988. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. *Toxicon* 26, 87–95.
- Mizuno, H., Fujimoto, Z., Atoda, H., Morita, T., 2001. Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7230–7234. <https://doi.org/10.1073/pnas.131179698>
- Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897–2912. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3>
- Mora-Obando, D., Guerrero-Vargas, J.A., Prieto-Sánchez, R., Beltrán, J., Rucavado, A., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., Ayerbe, S., Lomonte, B., 2014. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *J. Proteomics* 96, 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.005>
- Moustafa, I.M., Foster, S., Lyubimov, A.Y., Vrieling, A., 2006. Crystal Structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-Phenylalanine Substrate: Insights into Structure and Mechanism. *J. Mol. Biol.* 364, 991–1002. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.032>
- Naumann, G.B., Silva, L.F., Silva, L., Faria, G., Richardson, M., Evangelista, K., Kohlhoff, M., Gontijo, C.M.F., Navdaev, A., De Rezende, F.F., Eble, J.A., Sanchez, E.F., 2011. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1810, 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.04.003>
- Neves-Ferreira, A.G., Cardinale, N., Rocha, S.L., Perales, J., Domont, G.B., 2000. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochim. Biophys. Acta* 1474, 309–320.
- Neves-Ferreira, A.G. da C., Perales, J., Ovadia, M., Moussatché, H., Domont, G.B., 1997. Inhibitory properties of the antithrombotic complex from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Toxicon* 35, 849–863.
- Neves-Ferreira, A.G. da C., Valente, R.H., Perales, J., Domont, G.B., 2010. Natural Inhibitors: Innate Immunity to Snake Venoms, in: Mackessy, S.P. (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp. 259–284.
- Neves-Ferreira, A.G.C., Perales, J., Fox, J.W., Shannon, J.D., Makino, D.L., Garratt, R.C., Domont, G.B., 2002. Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. *J. Biol. Chem.* 277, 13129–37.
- Nicolaes, G.A.F., Rosing, J., 2006. Activation of factor V by venom proteases. *Toxin Rev.* 25, 217–234. <https://doi.org/10.1080/15569540600567289>

- Nicolau, C.A., Carvalho, P.C., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Teixeira-Ferreira, A., Junqueira, M., Perales, J., Neves-Ferreira, A.G.C., Valente, R.H., 2017. An in-depth snake venom proteopectidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. *J. Proteomics* 151, 214–231. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.029>
- Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1994a. Isolation and characterization of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the Thailand cobra *Naja naja kaouthia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 784–8.
- Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1994b. The two subunits of a phospholipase A2 inhibitor from the plasma of Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator receptor and LY-6 related proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 1212–8.
- Ohkura, N., Kitahara, Y., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1999. Isolation and Amino Acid Sequence of a Phospholipase A2 Inhibitor from the Blood Plasma of the Sea Krait, *Laticauda semifasciata*. *J. Biochem.* 125, 375–382.
- Ohkura, N., Ohuhara, H., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1997. Purification and Characterization of Three Distinct Types of Phospholipase A2 Inhibitors From the Blood Plasma of The Chinese Mamushi, *Agkistrodon Blomhoffii siniticus*. *Biochem. J.* 325, 527–531.
- Ohkura, Naoki, Okuhara, H., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1997. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *Biochem. J.* 325, 527–531. <https://doi.org/10.1042/bj3250527>
- Okumura, K., Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K., 1998. A Novel Phospholipase A 2 Inhibitor with Leucine-rich Repeats from the Blood Plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *J. Biol. Chem.* 273, 19469–19475.
- Omori-Satoh, T., 1977. Antihemorrhagic factor as a proteinase inhibitor isolated from the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. *BBA - Protein Struct.* 495, 93–98. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(77\)90243-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90243-4)
- Omori-Satoh, T., Sadahiro, S., Ohsaka, A., Murata, R., 1972. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*, a crotalid. *Biochim. Biophys. Acta* 285, 414–26.
- Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y., Mebs, D., 2000. The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. *Toxicon* 38, 1561–1580. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00090-8)
- Osipov, A. V., Levashov, M.Y., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N., 2005. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.154>
- Otero-Patiño, R., 2009. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon* 54, 998–1011.

- Otero, R., Gutiérrez, J., Beatriz Mesa, M., Duque, E., Rodríguez, O., Luis Arango, J., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., María Rodríguez, L., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Mariano Gómez, L., Luis Uribe, F., Cárdenas, S., Núñez, V., Díaz, A., 2002. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40, 1107–1114. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00104-6)
- Otero, R., Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Núñez, V., Díaz, A., Miranda, E., Uribe, a F., Silva, J.F., Ospina, J.G., Medina, Y., Toro, M.F., García, M.E., León, G., García, M., Lizano, S., De La Torre, J., Márquez, J., Mena, Y., González, N., Arenas, L.C., Puzón, A., Blanco, N., Sierra, A., Espinal, M.E., Lozano, R., 1999. A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in Bothrops and Porthidium snake bites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. *Toxicon* 37, 895–908.
- Ovadia, M., 1978. Purification and Characterization of an Antihemorrhagic Factor From the Serum of the Snake *Vipera palestinae*. *Toxicon* 16, 661–672.
- Ovadia, M., Moav, B., Kochva, E., 1975. Factors in the blood serum of *Vipera Palaestinae* neutralizing fractions of its venom. *Toxicon* 13, 113.
- Page, M.J., Di Cera, E., 2008. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1220–1236. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7565-9>
- Paine, M.J.I., Desmond, H.P., David, R., Theakstons, G., Crampton, J.M., 1992. Purification, Cloning, and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* Venom. *J Biol Chem* 267, 22869–22876.
- Perales, J., Amorim, C.Z., Rocha, S.L., Domont, G.B., Moussatché, H., 1992. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antithrotoppic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Agents Actions* 37, 250–9.
- Perales, J., Moussatché, H., Marangoni, S., Oliveira, B., Domont, G.B., 1994. Isolation and partial characterization of an anti-bothropic complex from the serum of South American *Didelphidae*. *Toxicon* 32, 1237–49.
- Perales, J., Muñoz, R., Graterol, S., Oviedo, O., Moussatché, H., 1989. New findings on the purification and characterization of an anti-bothropic factor from *Didelphis marsupialis* (opossum) serum. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 22, 25–28.
- Perales, J., Neves-Ferreira, A.G.C., Valente, R.H., Domont, G.B., 2005. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1013–20.
- Phisalix, C., Bertrand, G., 1895. Recherches sur l'immunité du Hérisson contre le venin du vipère. *Comptes rendus des séances la Société Biol. ses Fil.* 47, 639–641.
- Phisalix, C., Bertrand, G., 1894. Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère. *Comptes rendus des séances la Société Biol. ses Fil.* 46, 111–113.

- Pope, C.G., 1939a. The Action Of Proteolytic Enzymes On The Antitoxins And Proteins In Immune Sera. II.-Heat Denaturation After Partial Enzyme Action. *Br. Jourlan Exp. Pathol.* 20, 201–212.
- Pope, C.G., 1939b. The Action of Proteolytic Enzymes on the Antitoxins and Proteins in Immune Sera: I. True Digestion of the Proteins. *Br. J. Exp. Pathol.* 20, 132–139.
- Qi, Z.Q., Yonaha, K., Tomihara, Y., Toyama, S., 1994. Characterization of the antihemorrhagic factors of mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon* 32, 1459–1469. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90417-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90417-0)
- Rahman, R., Faiz, M.A., Selim, S., Rahman, B., Basher, A., Jones, A., d’Este, C., Hossain, M., Islam, Z., Ahmed, H., Milton, A.H., 2010. Annual incidence of snake bite in rural Bangladesh. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000860>
- Ramírez-Chaves, H.E., Solari, S., 2014. *Bothrops ayerbeii* folleco-fernández, 2010 y *Bothrops rhomboatus* García, 1896 (serpentes: Viperidae) son un nombre no disponible y un Nomen Dubium, respectivamente. *Bol. Cient. del Cent. Museos* 18, 138–141.
- Rao, B., 2005. Recent Developments in the Design of Specific Matrix Metalloproteinase Inhibitors aided by Structural and Computational Studies. *Curr. Pharm. Des.* 11, 295–322. <https://doi.org/10.2174/1381612053382115>
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., Finn, R.D., 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46, D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Rengifo-Rios, A.M., Muñoz-Gómez, L.M., Cabezas-Fajardo, F.A., Guerrero-Vargas, J.A., 2019. Edematic and coagulant effects caused by the venom of *Bothrops rhombeatus* neutralized by the ethanolic extract of *Piper auritum*. *J. Ethnopharmacol.* 242, 112046. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112046>
- Rocha, S.L.G., Frutuoso, V.S., Domont, G.B., Martins, M. a, Moussatche, H., Perales, J., 2000. Inhibition of the hyperalgesic activity of *Bothrops jararaca* venom by an antithrombotic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Toxicon* 38, 875–880.
- Rocha, S.L.G., Lomonte, B., Neves-Ferreira, A.G.C., Trugilho, M.R.O., Junqueira-de-Azevedo, I.D.L.M., Ho, P.L., Domont, G.B., Gutiérrez, J.M., Perales, J., 2002. Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. *Eur. J. Biochem.* 269, 6052–6062.
- Rocha, S.L.G., Neves-Ferreira, A.G.C., Trugilho, M.R.O., Angulo, Y., Lomonte, B., Valente, R.H., Domont, G.B., Perales, J., 2017. Screening for target toxins of the antiophidic protein DM64 through a gel-based interactomics approach. *J. Proteomics* 151, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.020>
- Rocha, S.L.G., Neves-ferreira, A.G.C., Trugilho, M.R.O., Chapeaurouge, A., Leo, I.R.,

- Valente, R.H., Domont, G.B., Perales, J., 2009. Crotalid Snake Venom Subproteomes Unraveled by the Antiophidic Protein DM43 research articles. *Analyzer* 2351–2360.
- Rodriguez-acosta, A., Aguilar, I., Giron, M.E., 1993. Natural resistance of opossum (*Didelphis marsupialis*) to the mapanare (*Bothrops lanceolatus*) snake venom. *Roum Arch Microbiol Immunol* 52, 131–136.
- Rodriguez-Acosta, A., Aguilar, I., Giron, M.E., 1995. Antivenom activity of opossum (*Didelphys marsupialis*) serum fractions against Uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941) venom. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 54, 325–330.
- Rodriguez León, I., da Costa Neves-Ferreira, A.G., da Rocha, S.L.G., de Oliveira Trugilho, M.R., Perales, J., Valente, R.H., 2012. Using mass spectrometry to explore the neglected glycan moieties of the antiophidic proteins DM43 and DM64. *Proteomics* 12, 2753–2765. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200062>
- Rojas Bárcenas, A.M., 2018. Accidente ofídico en Colombia. (No. FOR-R02.4000-001), Informe del evento. Bogotá.
- Rucavado, A., Escalante, T., Gutiérrez, J.M., 2004. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: Understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon* 43, 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.01.016>
- Sajevic, T., Leonardi, A., Križaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627–645. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.006>
- Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F., Díaz, A., Gutiérrez, J.M., 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42, 405–411.
- Saravia, P., Rojas, E., Escalante, T., Arce, V., Chaves, E., Velásquez, R., Lomonte, B., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., 2001. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* 39, 401–5.
- Schaloske, R.H., Dennis, E.A., 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 1246–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>
- Schiermeier, Q., 2015. Africa braced for snakebite crisis. *Nature* 525, 299. <https://doi.org/10.1038/525299a>
- Serrano, S.M.T., 2013. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* 62, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>
- Serrano, S.M.T., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45, 1115–1132. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>
- Serrano, S.M.T., Oliveira, A.K., Menezes, M.C., Zelanis, A., 2014. The proteinase-rich proteome of *Bothrops jararaca* venom. *Toxin Rev.* 33, 169–184. <https://doi.org/10.3109/15569543.2014.922581>

- Shioi, N., Narazaki, M., Terada, S., 2011. Novel function of antihemorrhagic factor HSF as an SSP-binding protein in Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) serum. *Fukuoka Univ. Sci. Rep.* 177–184.
- Simons, F.E.R., Arduoso, L.R., Bilò, M.B., Cardona, V., Ebisawa, M., El-Gamal, Y.M., Lieberman, P., Lockey, R.F., Muraro, A., Roberts, G., Sanchez-Borges, M., Sheikh, A., Shek, L.P., Wallace, D. V., Worm, M., 2014. International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organ. J.* 7, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-7-9>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Borges, M.H., Andriao-Escarso-S H, Cunha, O.A., Homs-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R., 1997. Inhibition of Proteases, Myotoxins and Phospholipases A2 From Bothrops Venoms by the Heteromeric Protein Complex of *Didelphis Albiventris* Opossum Serum. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43, 1091–1099.
- Tanizaki, M.M., Kawasaki, H., Suzuki, K., Mandelbaum, F.R., 1991. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 29, 673–681. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90059-Z](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90059-Z)
- Tans, G., Rosing, J., 2002. Snake Venom Activators of Factor X: An Overview. *Haemostasis* 31, 225–233.
- Tarentino, A.L., Plummer, T.H., 1994. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: Purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol.* 230, 44–57. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)30006-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)30006-2)
- Tasoulis, T., Isbister, G.K., 2017. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel)*. 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Teixeira, C. de F.P., Fernandes, C.M., Zuliani, J.P., Zamuner, S.F., 2005. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 181–184. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900031>
- Theakston, R.D.G., Reid, H.A., 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. World Health Organ.* 61, 949–956.
- Thwin, M.M., Gopalakrishnakone, P., 1998. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991-1997). *Toxicon* 36, 1471–82.
- Titus, J.K., Kay, M.K., Glaser, J.J., Hwang, Y.Y., 2019. Application of phage display for the development of a novel inhibitor of PLA2 activity in western cottonmouth venom. *Toxicon* 158, S35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.10.124>
- Tomihara, Y., Yonaha, K., Nozahi, M., Yamakawa, M., Kawamura, Y., Kamura, T., Toyama, S., 1988. Purification of an Antihemorrhagic Factor From the Serum of the Non-Venemous Snake *Dinodon semicarinatus*. *Toxicon* 26, 420–423.

- Tomihara, Y., Yonaha, K., Nozaki, M., Yamakawa, M., Kamura, T., Toyama, S., 1987. Purification of Three Antihemorrhagic Factors from the Serum of a Mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon* 25, 685–689.
- Torres, M.P., 1997. Aporte al conocimiento de la Geología y Estratigrafía de la formación Popayán, Departamento del Cauca. *Noved. Colomb.* 7, 7–27.
- Usami, Y., Fujimura, Y., Suzuki, M., Ozeki, Y., Nishio, K., Fukui, H., Titani, K., 1993. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 928–932. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.928>
- Valente, R.H., Dragulev, B., Perales, J., Fox, J.W., Domont, G.B., 2001. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *Eur. J. Biochem.* 268, 3042–52.
- Vellard, J., 1949. Investigaciones Sobre Inmunidad Natural Contra los Venenos de Serpientes. *Publicaciones del Mus. Hist. Nat. Ser. Zool.* 1–16.
- Vellard, J., 1945. Resistencia de los *Didelphis* (Zarigüeyas) a los Venenos Ofídicos. *Rev. Bras. Biol.* 5, 463–7.
- Vieira, S.M., da Rocha, S.L.G., Neves-Ferreira, A.G. da C., Almeida, R.V., Perales, J., 2017. Heterologous expression of the antimyotoxic protein DM64 in *Pichia pastoris*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005829>
- Voss, Robert S, Jansa, S. a, 2012. Snake-venom resistance as a mammalian trophic adaptation: lessons from didelphid marsupials. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 87, 822–37.
- Voss, Robert S., Jansa, S.A., 2012. Snake-venom resistance as a mammalian trophic adaptation: lessons from didelphid marsupials. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 87, 822–837. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00222.x>
- Voss, R.S., Myers, P., Catzeflis, F., Carmignotto, A.P., Barreiro, J., 2009. Chapter 11. The Six Opossums of Félix de Azara: Identification, Taxonomic History, Neotype Designations, and Nomenclatural Recommendations. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 331, 406–433. <https://doi.org/10.1206/582-11.1>
- Wallach, V., William, K.L., Boundy, J., 2014. *Snakes of the World*. CRC Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wang, X., 2001. Plant Phospholipases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 211–231. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-7482-8.ch005>
- Wang, Y., Zhang, J., Zhang, D., Xiao, H., Xiong, S., Huang, C., 2018. Exploration of the inhibitory potential of varespladib for snakebite envenomation. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23020391>
- Warrell, D.A., 2004. Epidemiology, Clinical Features and Management of Snake Bites in Central and South America, in: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.), *Venomous Reptiles of Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, pp. 709–768.

- Weinstein, S.A., Lafaye, P.J., Smith, L.A., 1991. Observations on a Venom Neutralizing Fraction Isolated from Serum of the Northern Copperhead, *Agkistrodon contortrix mokasen*. *Copeia* 1991, 777. <https://doi.org/10.2307/1446405>
- Werner, R.M., Vick, J. a, 1977. Resistance of the opossum (*Didelphis virginiana*) to envenomation by snakes of the family *Crotalidae*. *Toxicon* 15, 29–33.
- Williams, D.J., Faiz, M.A., Abela-Ridder, B., Ainsworth, S., Bulfone, T.C., Nickerson, A.D., Habib, A.G., Junghanss, T., Fan, H.W., Turner, M., Harrison, R.A., Warrell, D.A., 2019. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007059. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007059>
- World Health Organization, 2019. Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control. Geneva. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Xiao, H., Li, H., Zhang, D., Li, Y., Sun, S., Huang, C., 2018. Inactivation of Venom PLA₂ Alleviates Myonecrosis and Facilitates Muscle Regeneration in Envenomed Mice: A Time Course Observation. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23081911>
- Yamazaki, Y., Koike, H., Sugiyama, Y., Motoyoshi, K., Wada, T., Hishinuma, S., Mita, M., Morita, T., 2002. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *Eur. J. Biochem.* 269, 2708–2715. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02940.x>
- Yamazaki, Y., Morita, T., 2004. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 44, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.023>
- Zelensky, A.N., Gready, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272, 6179–6217. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>
- Zingali, R.B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M.C., Bon, C., 1993. Bothrojaracin, a New Thrombin Inhibitor Isolated from *Bothrops jararaca* Venom: Characterization and Mechanism of Thrombin Inhibition. *Biochemistry* 32, 10794–10802. <https://doi.org/10.1021/bi00091a034>

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1: Análise *shotgun* do veneno de *B. rhombeatus*, replicata biológica 1

Grupo proteína	ID proteína	Protein Accession	-10lgP	Cobertura (%)	#Pep tídeos	Spectral count	#Pep. únicos	# SC único	Área pep únicos	Massa (Da)	Código	Descrição
Group 102	23160	tr A0A1L8D667 A0A1L8D667_BOTAT	318.57	53	22	121	5	36	2.22E+09	61,015	5'NUCL	BATXNUC1 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 274	23198	A0A2I4HXH5 V5NTD_NAJAT	171.72	16	6	16	2	2	1.06E+07	58,198	5'NUCL	Snake venom 5'-nucleotidase (Fragment) OS=Naja atra OX=8656 PE=1 SV=1
							total	38				
Group 403	23291	tr T1E687 T1E687_CROHD	112.74	14	3	4	3	4	3.34E+07	37,477	CATHB	Cathepsin B-like protein OS=Crotalus horridus OX=35024 PE=2 SV=1
							total	4				
Group 98	23195	tr A0A2H4N3D5 A0A2H4N3D5_BOTMO	290.94	56	11	126	8	94	1.26E+10	26,837	CRISP	Cysteine-rich Venom Protein Moojin (Fragment) OS=Bothrops moojeni OX=98334 PE=2 SV=1
							total	94				
Group 341	23202	tr J3SEA2 J3SEA2_CROAD	190.84	19	6	10	6	10	2.74E+08	47,013	DIPEP	Dipeptidase OS=Crotalus adamanteus OX=8729 PE=2 SV=1
							total	10				

Group 140	3670	Q9YIB5 QPCT_BOTJA	285.13	55	18	66	18	66	2.70E+09	42,204	GLUCT	Glutaminy l-peptide cyclotransferase OS=Bothrops jararaca OX=8724 GN=QPCT PE=2 SV=1
							total	66				
Group 321	23306	tr V8P395 V8P395_OPHHA	134.51	21	4	16	4	16	6.60E+08	29,588	GLUPER	Glutathione peroxidase (Fragment) OS=Ophiophagus hannah OX=8665 GN=Gpx3 PE=3 SV=1
							total	16				
Group 255	23192	tr A0A2H4N3E2 A0A2H4N3E2_BOTMO	207.86	31	10	26	2	4	1.78E+07	52,550	HYAL	Hyaluronidase (Fragment) OS=Bothrops moojeni OX=98334 PE=2 SV=1
							total	4				
Group 15	26	J7H670 OXLA_LACMT	442.19	60	40	617	14	228	2.98E+10	58,532	LAAO	L-amino acid oxidase Lm29 OS=Lachesis muta OX=8752 PE=1 SV=1
Group 23	16	X2JCV5 OXLAA_CERCE	290.87	23	10	614	2	236	3.98E+09	58,557	LAAO	L-amino acid oxidase OS=Cerastes cerastes OX=8697 PE=1 SV=1
Group 151	3708	P81375 OXLA_MALCB	179.57	51	7	61	2	4	1.48E+07	12,435	LAAO	L-amino-acid oxidase (Fragments) OS=Macrovipera lebetina OX=8709 PE=1 SV=2

Group 30	33	A0A024B TN9 OXLA_BOTS C	337.21	32	20	371	2	4	1.76E+07	56,376	LAOO	L-amino acid oxidase Bs29 (Fragment) OS=Bothriechis schlegelii OX=44725 PE=1 SV=1
Group 2	4	B5AR80 OXLA_BOTPA	398.46	53	33	1061	2	2	0	56,800	LAOO	L-amino-acid oxidase (Fragment) OS=Bothrops pauloensis OX=1042543 PE=1 SV=1
Group 80	3441	Q6STF1 OXLA_GLOHA	252.48	23	15	126	2	2	4.15E+06	57,125	LAOO	L-amino-acid oxidase OS=Gloyd ius halys OX=8714 PE=1 SV=1
							total	476				
Group 239	23266	tr A0A1L8D6F1 A0A1L8D6F1_BOTAT	149.27	37	5	26	4	23	4.12E+08	17,255	LECT_C	BATXCT L1 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 119	3461	tr T2HS62 T2HS62_OVOOK	199.95	26	6	102	2	22	2.84E+09	18,492	LECT_C	Galactose binding lectin OS=Ovophis okinavensis OX=8769 PE=2 SV=1
Group 277	7269	tr A0A1L8D6E6 A0A1L8D6E6_BOTAT	170.29	42	7	21	7	21	9.94E+08	18,030	LECT_C	BATXCT L34 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 54	3364	Q9PSM4 LECG_LACST	286.61	100	19	296	2	8	1.68E+09	16,223	LECT_C	C-type lectin LmsL OS=Lachesis stenophrys OX=88085 PE=1 SV=1
Group 292	23267	tr A0A1L8D657 A0A1L8D65	174.71	47	6	23	2	6	3.90E+08	17,037	LECT_C	BATXCT L9 OS=Bothrops atrox

		7_BOTA T										OX=8725 PE=2 SV=1
Group 314	23255	tr A0A1L 8D630 A0 A1L8D63 0_BOTA T	152.66	46	4	16	2	6	1.13E+0 8	17,741	LECT_ C	BATXCT L42 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 69	3367	P21963 L ECG_CR OAT	271.79	67	13	260	2	3	1.53E+0 7	16,291	LECT_ C	C-type lectin Cal OS=Crotal us atrox OX=8730 PE=1 SV=1
Group 210	3783	tr A0A1L 8D638 A0 A1L8D63 8_BOTA T	109.92	12	3	28	2	3	3.81E+0 7	18,829	LECT_ C	BATXCT L32 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
							total	92				
Group 261	8777	Q27J48 V ESP_LAC MU	185.43	32	6	22	6	22	1.22E+0 9	24,179	NEUR	Ohanin- like protein OS=Lache sis muta muta OX=8753 PE=2 SV=1
							total	22				
Group 430	23387	tr A0A2D 4H5M3 A 0A2D4H5 M3_MIC LE	101.84	9	2	4	2	4	1.92E+0 7	31,205	PERO X	Thioredoxi n domain- containing protein OS=Micru rus lemniscatu s lemniscatu s OX=12946 7 PE=4 SV=1
							total	4				
Group 11	57	P20474 P A2B3_B OTAS	282.64	57	10	727	7	577	9.81E+1 0	15,751	PLA2	Basic phospholip ase A2 myotoxin III OS=Bothr ops asper OX=8722 PE=1 SV=2
Group 26	25	P86389 P A2A2_B OTAS	232.2	60	10	398	7	307	3.64E+1 0	14,194	PLA2	Acidic phospholip ase A2 2 OS=Bothr

												ops asper OX=8722 PE=1 SV=1
Group 82	609	tr L7VGC l L7VGC 1_BOTA N	256.21	48	12	164	6	110	2.72E+1 0	15,566	PLA2	Myotoxic protein PLA2K49 OS=Bothr ocophias andianus OX=11443 73 PE=2 SV=1
Group 96	187	P84651 P A2A_LA CST	217.73	66	8	113	6	62	7.06E+0 9	13,902	PLA2	Acidic phospholip ase A2 OS=Lache sis stenophrys OX=88085 PE=1 SV=1
Group 66	405	tr A0A1S 5XW05 A 0A1S5X W05_BO TMO	267.39	53	13	252	3	6	4.54E+0 7	15,618	PLA2	BomoTx OS=Bothr ops moojeni OX=98334 PE=2 SV=1
Group 162	23517	tr A0A1L 8D6C4 A 0A1L8D6 C4_BOT AT	117.85	17	3	46	2	3	9.23E+0 6	15,489	PLA2	BATXPL A4 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 235	3921	tr A0A193 CHJ8 A0 A193CHJ 8_CROM N	100.92	26	4	6	2	2	1.12E+0 7	15,453	PLA2	Phospholip ase A2_2 OS=Crotal us molossus nigrescens OX=8734 PE=2 SV=1
							total	1,067				
Group 376	1030	tr T1DNX 8 T1DNX 8_CROH D	134.74	8	6	9	6	9	2.60E+0 7	110,76 7	SVAP	Aminopept idase OS=Crotal us horridus OX=35024 PE=2 SV=1
							total	9				
Group 1	5	tr A0A1L 8D600 A0 A1L8D60 0_BOTA T	329.66	45	17	1314	4	396	5.88E+1 0	53,567	SVMP	BATXSV MPIII OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 9	3	P86976 V M1B1_B OTBA	301.76	55	12	748	6	350	1.52E+1 0	23,063	SVMP	Zinc metallopro teinase barnettlysi

												n-1 OS=Bothr ops barnetti OX=10516 30 PE=1 SV=1
Group 46	41	tr A0A1L 8D5X9 A 0A1L8D5 X9_BOT AT	377.99	43	23	362	14	225	1.64E+1 0	68,047	SVMP	BATXSV MPIII1 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 39	74	P83512 V M1B1_B OTAS	303.39	40	12	389	4	215	9.21E+1 0	45,936	SVMP	Snake venom metallopro teinase BaP1 OS=Bothr ops asper OX=8722 PE=1 SV=2
Group 79	620	C5H5D6 VM32_L ACMR	332.56	58	17	232	11	154	1.49E+1 0	46,708	SVMP	Zinc metallopro teinase- disintegrin -like lachestatin -2 OS=Lache sis muta rhombeata OX=60219 PE=2 SV=1
Group 10	20	P30431 V M3JA_B OTJA	293.23	39	16	628	2	130	9.97E+0 9	63,983	SVMP	Zinc metallopro teinase- disintegrin -like jararhagin (Fragment) OS=Bothr ops jararaca OX=8724 PE=1 SV=1
Group 117	110	P22796 V M1H2_L ACMU	258.2	52	6	114	5	107	1.44E+1 0	22,596	SVMP	Snake venom metallopro teinase hemorrhag ic factor 2 OS=Lache sis muta muta OX=8753 PE=1 SV=1
Group 152	1482	Q1PBD1 VM2DI_ GLOHA	167.33	26	6	57	2	28	7.41E+0 8	53,142	SVMP	Zinc metallopro teinase/disi ntegrin OS=Gloyd ius halys OX=8714

												PE=2 SV=1
Group 144	3486	tr E3UJL1 E3UJL1_BOTNU	219.76	21	8	69	2	18	3.85E+08	49,627	SVMP	MP_III2 SVMP (Fragment) OS=Bothr ops neuwiedi OX=95648 PE=2 SV=1
Group 20	11	P85420 VM11_BO TAT	317.85	71	13	614	2	15	6.64E+06	22,918	SVMP	Snake venom metallopro teinase atroxlysin- 1 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=1 SV=2
Group 305	7143	Q92043 VM3AA_C ROAT	173.56	8	3	15	2	14	1.40E+08	46,879	SVMP	Zinc metallopro teinase- disintegrin- like atroxlysin- A (Fragment) OS=Crotalus atrox OX=8730 PE=1 SV=1
Group 279	8758	Q7SZD9 VM2US_ GLOUS	153.9	15	4	18	2	14	4.21E+08	53,444	SVMP	Zinc metallopro teinase/disi ntegrin ussurin OS=Gloyd ius ussuriensis OX=35671 PE=2 SV=1
Group 19	14	tr A0A1L8D5Y9 A0A1L8D5Y9_BOT AT	326.38	41	15	614	2	12	0	46,031	SVMP	BATXSV MPI5 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 320	23760	O93516 VM2S2_G LOBR	95.16	32	2	12	2	12	7.10E+08	11,726	SVMP	Zinc metallopro teinase/disi ntegrin (Fragment) OS=Gloyd ius brevicaudu s OX=259325 PE=2 SV=1
Group 284	7395	tr A0A194APG6 A0A194APG6_9SAUR	122.32	6	3	13	2	11	1.12E+09	54,419	SVMP	Metallopro teinase type II 1 OS=Agkist rodon

												piscivorus OX=8715 PE=3 SV=1
Group 171	4536	tr A0A1L 8D691 A0 A1L8D69 1_BOTA T	221.15	20	10	51	5	10	2.84E+0 8	68,031	SVMP	BATXSV MPIII14 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 138	4018	tr A0A1L 8D5Y6 A 0A1L8D5 Y6_BOT AT	280.06	45	18	79	2	9	2.95E+0 7	68,099	SVMP	BATXSV MPIII5 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 184	3900	tr A0A1W 7RB97 A0 A1W7RB 97_CRO AD	250.78	20	9	49	2	7	6.83E+0 8	69,020	SVMP	Cadam10_ SVMPIII- 6 OS=Crotal us adamanteu s OX=8729 PE=3 SV=1
Group 170	3458	tr A0A1L 8D5X6 A 0A1L8D5 X6_BOT AT	188.43	16	8	49	3	7	1.83E+0 8	67,860	SVMP	BATXSV MPIII15 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 27	7	Q5XUW8 VM2IA_ BOTIN	234.74	23	11	507	2	6	4.06E+0 7	53,313	SVMP	Zinc metallopro teinase/disi ntegrin OS=Bothr ops insularis OX=8723 PE=1 SV=1
Group 13	21	tr A0A0K 2JNB8 A0 A0K2JNB 8_BOTA T	300.61	37	18	558	2	4	6.43E+0 5	68,290	SVMP	BATROX RHAGIN OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 301	8764	tr A0A194 AQ32 A0 A194AQ3 2_SISMB	136.01	20	5	18	2	3	5.08E+0 6	53,766	SVMP	Metallopro teinase type II 5d OS=Sistrur us miliaris barbouri OX=8759 PE=3 SV=1
Group 387	23314	tr E9JGA2 E9JGA2_ ECHCO	130.34	12	4	7	2	3	0	69,742	SVMP	Metallopro teinase OS=Echis coloratus OX=64175 PE=2 SV=1

Group 386	6603	tr A0A194AMD0 A0A194AMD0_9SAUR	99.92	11	3	6	2	3	2.21E+07	68,076	SVMP	Metalloprotease type III 2a OS=Agkistrodon piscivorus OX=8715 PE=3 SV=1
Group 17	23	tr A0A1S6K7T1 A0A1S6K7T1_BOTAT	274.18	35	15	498	2	2	0	68,317	SVMP	Atroxlysin-III OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 359	23221	tr A0A194AME3 A0A194AME3_9SAUR	126.89	17	5	6	2	2	2.84E+06	54,204	SVMP	Metalloprotease type II 2 OS=Agkistrodon piscivorus OX=8715 PE=3 SV=1
							total	1,757	1.76E+03			
Group 87	8583	tr A0A1L8D6B7 A0A1L8D6B7_BOTAT	384.28	55	32	177	13	83	5.88E+09	91,859	SVPD	BATXPDE1 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
							total	83				
Group 415	23246	tr A0A1W7RI96 A0A1W7RI96_AGKCO	101.7	8	3	3	3	3	2.41E+07	55,517	SVSCP	Putative serine carboxypeptidase CPVL-like protein OS=Agkistrodon contortrix contortrix OX=8713 PE=3 SV=1
							total	3				
Group 75	3365	P0DJ86 V SPL_BOTLC	261.01	56	8	247	3	108	1.11E+10	25,493	SVSP	Thrombin-like enzyme leucurobin OS=Bothrops leucurus OX=157295 PE=1 SV=1
Group 108	3381	Q5W959 VSP14_BOTJA	239.76	56	7	117	4	68	2.32E+10	27,843	SVSP	Snake venom serine protease

												HS114 OS=Bothr ops jararaca OX=8724 PE=1 SV=1
Group 122	3394	tr A0A1L 8D5V4 A 0A1L8D5 V4_BOT AT	228.95	49	6	98	2	21	3.58E+0 9	27,744	SVSP	BATXSV SP13 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 70	3395	Q27J47 V SPPA_LA CMU	227.74	42	7	273	3	79	3.58E+1 0	28,062	SVSP	Venom plasminog en activator LV-PA OS=Lache sis muta muta OX=8753 PE=1 SV=1
Group 212	4919	tr A0A1L 8D610 A0 A1L8D61 0_BOTA T	216.55	45	10	28	3	9	6.80E+0 7	28,380	SVSP	BATXSV SP11 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 174	3488	Q072L7 V SP_LACS T	210.49	51	7	50	4	32	7.05E+0 9	27,814	SVSP	Snake venom serine protease OS=Lache sis stenophrys OX=88085 PE=2 SV=1
Group 256	8772	B0FXM2 VSP14_C RODU	144.84	25	3	26	2	24	6.83E+0 8	29,262	SVSP	Thrombin- like enzyme gyroxin B1.4 OS=Crotal us durissus terrificus OX=8732 PE=2 SV=1
							total	341				
Group 420	23425	tr A0A1L 8D601 A0 A1L8D60 1_BOTA T	119.83	17	2	7	2	7	1.60E+0 8	22,563	VEGF	BATXVE GF1 OS=Bothr ops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
								7				

Material suplementar 2: Análise *Shotgun* do veneno de *B. rhombeatus*, replicata biológica 2.

Grupo proteí na	ID proteína	Protein Accession	-10lgP	Cobertura (%)	#Pept ídeos	Spectral count	#Pep. únicos	# SC únicos	Área pep únicos	Massa (Da)	Código	Descrição
Group 112	23160	tr A0A1L 8D667 A0 A1L8D66 7_BOTA T	293.36	55	22	106	5	25	1.66E+0 9	61,015	5'NUC L	BATXNU C1 OS=Bothro ps atrox OX=8725 PE=2 SV=1
							total	25				
Group 105	23195	tr A0A2H 4N3D5 A 0A2H4N3 D5_BOT MO	258.17	56	12	125	9	94	1.09E+1 0	26,837	CRISP	Cysteine- rich Venom Protein Moojin (Fragment) OS=Bothro ps moojeni OX=98334 PE=2 SV=1
							total	94				
Group 338	23202	tr J3SEA2 J3SEA2_ CROAD	176.13	14	4	11	4	11	2.78E+0 8	47,013	DIPEP	Dipeptidas e OS=Crotal us adamanteus OX=8729 PE=2 SV=1
							total	11				
Group 448	23631	tr V8N4Y 2 V8N4Y 2_OPHH A	60.14	14	2	3	2	3	8.23E+0 7	18,083	ENDO NU	Endonuclea se domain- containing 1 protein OS=Ophio phagus hannah OX=8665 GN=END OD1 PE=4 SV=1
							total	3				
Group 149	3670	Q9YIB5 QPCT_B OTJA	276.49	55	17	65	17	65	2.41E+0 9	42,204	GLUC T	Glutaminy l-peptide cyclotransf erase OS=Bothro ps jararaca OX=8724 GN=QPCT PE=2 SV=1
							total	65				

Group 317	23306	tr V8P395 V8P395_OPHHA	123.49	21	4	22	4	22	5.89E+08	29,588	GLUPER	Glutathione peroxidase (Fragment) OS=Ophiophagus hannah OX=8665 GN=Gpx3 PE=3 SV=1
							total	22				
Group 447	23772	tr J3S8W7 J3S8W7_CROAD	95.22	15	2	4	2	4	2.34E+07	15,563	HEMO	Hemoglobin subunit alpha 1 OS=Crotalus adamanteus OX=8729 PE=2 SV=1
Group 433	23396	tr A0A098LYB7 A0A098LYB7_9SAUR	78.09	15	2	2	2	2	2.47E+07	16,144	HEMO	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Hypsigena sp. JMG-2014 OX=1550645 PE=3 SV=1
							total	6				
Group 266	23192	tr A0A2H4N3E2 A0A2H4N3E2_BOTMO	182.84	23	8	23	2	4	9.24E+06	52,550	HYAL	Hyaluronidase (Fragment) OS=Bothrops moojeni OX=98334 PE=2 SV=1
							total	4				
Group 15	26	J7H670 OXLAA_CMT	422.46	66	40	622	15	224	3.01E+10	58,532	LAO	L-amino acid oxidase Lm29 OS=Lachesis muta OX=8752 PE=1 SV=1
Group 24	16	X2JCV5 OXLAA_CERCE	285	25	11	605	3	224	2.67E+09	58,557	LAO	L-amino acid oxidase OS=Cerastes cerastes OX=8697 PE=1 SV=1
							total	448				
Group 115	3461	tr T2HS62 T2HS62_OVOOK	186.53	25	6	103	3	28	2.42E+09	18,492	LECT_C	Galactose binding lectin

												OS=Ovophis okinavensis OX=8769 PE=2 SV=1
Group 261	23266	tr A0A1L8D6F1 A0A1L8D6F1_BOTAT	135.64	39	5	22	5	22	9.55E+08	17,255	LECT_C	BATXCTL1 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 311	7269	tr A0A1L8D6E6 A0A1L8D6E6_BOTAT	182.04	42	6	17	6	17	7.98E+08	18,030	LECT_C	BATXCTL34 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 54	3364	Q9PSM4 LECG_LACST	264.21	99	19	295	2	11	1.61E+09	16,223	LECT_C	C-type lectin LmsL OS=Lachesis stenophrys OX=88085 PE=1 SV=1
Group 67	3367	P21963 LECG_CR OAT	247.46	67	16	249	4	7	5.87E+08	16,291	LECT_C	C-type lectin Cal OS=Crotalus atrox OX=8730 PE=1 SV=1
							total	85				
Group 275	8777	Q27J48 VESP_LACMU	176.92	32	7	23	7	23	1.14E+09	24,179	NEUR	Ohanin-like protein OS=Lachesis muta OX=8753 PE=2 SV=1
Group 407	26501	P0DJG8 CRVP_H ELAG	116.24	100	3	7	2	2	2.73E+06	2,620	NEUR	Helicopsis angulatus (Fragments) OS=Helicopsis angulatus OX=121331 PE=1 SV=1
							total	25				
Group 402	23419	tr A0A2D4Q6R4 A0A2D4Q6R4_MICS U	106.61	9	2	5	2	5	2.57E+07	31,223	PERO X	Thioredoxin domain-containing protein OS=Micrurus surinamensis OX=12947

												0 PE=4 SV=1
							total	5				
Group 10	57	P20474 P A2B3_B OTAS	299.27	75	15	803	7	503	4.59E+1 0	15,751	PLA2	Basic phospholipase A2 myotoxin III OS=Bothrops asper OX=8722 PE=1 SV=2
Group 19	25	P86389 P A2A2_B OTAS	227.35	76	13	449	9	354	3.78E+1 0	14,194	PLA2	Acidic phospholipase A2 OS=Bothrops asper OX=8722 PE=1 SV=1
Group 81	609	tr L7VGC 1 L7VGC 1_BOTAN	225.8	41	11	159	5	97	3.06E+1 0	15,566	PLA2	Myotoxic protein PLA2K49 OS=Bothrocophias andianus OX=1144373 PE=2 SV=1
Group 95	187	P84651 P A2A_LA CST	227.42	66	7	124	5	70	6.17E+0 9	13,902	PLA2	Acidic phospholipase A2 OS=Lachesis stenophrys OX=88085 PE=1 SV=1
Group 70	404	Q9PVE3 PA2H3_B OTAS	243.61	64	13	249	3	10	1.13E+0 8	15,559	PLA2	Basic phospholipase A2 homolog M1-3-3 OS=Bothrops asper OX=8722 PE=2 SV=1
Group 136	3831	B3EWP6 PA2_LA CMR	128.94	42	3	55	2	10	2.15E+0 9	6,740	PLA2	Phospholipase A2 (Fragment) OS=Lachesis muta rhombeata OX=60219 PE=1 SV=1
Group 84	146	Q8AXY1 PA2A_B OTJR	132.9	24	4	87	2	4	8.74E+0 6	15,456	PLA2	Acidic phospholipase A2 BthA-1 OS=Bothrops jararacussu OX=8726

Group 151	23517	tr A0A1L8D6C4 A0A1L8D6C4_BOTAT	108.88	17	3	49	2	4	3.73E+07	15,489	PLA2	PE=1 SV=1 BATXPLA4 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
							total	1,052				
Group 398	23239	tr J3S9B2 J3S9B2_CROAD	110.57	6	2	5	2	5	4.03E+07	58,013	SAPO	Proactivator polypeptide-like OS=Crotalus adamanteus OX=8729 PE=2 SV=1
							total	5				
Group 403	1030	tr T1DNX8 T1DNX8_CROHD	115.09	7	5	6	5	6	1.25E+07	110,767	SVAP	Aminopeptidase OS=Crotalus horridus OX=35024 PE=2 SV=1
							total	6				
Group 445	23250	tr A0A0K8S1F1 A0A0K8S1F1_CROHD	110.29	5	2	4	2	4	2.69E+06	55,483	SVSCP	Putative serine carboxypeptidase CPVL-like protein OS=Crotalus horridus OX=35024 PE=3 SV=1
							total	4				
Group 8	3	P86976 V M1B1_BOTBA	286.03	64	13	857	7	478	1.31E+10	23,063	SVMP	Zinc metalloproteinase barnettlysin-1 OS=Bothrops barnetti OX=1051630 PE=1 SV=1
Group 50	41	tr A0A1L8D5X9 A0A1L8D5X9_BOTAT	333.91	41	21	385	14	265	1.89E+10	68,047	SVMP	BATXSVMPIII1 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1

Group 38	74	P83512 VM1B1_BOTAS	284.57	41	13	408	5	224	9.25E+10	45,936	SVMP	Snake venom metalloproteinase BaP1 OS=Bothrops asper OX=8722 PE=1 SV=2
Group 78	3366	C5H5D3 VM32_BOTAT	299.62	58	17	246	11	174	1.65E+10	46,303	SVMP	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like batroxstatin-2 (Fragment) OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 116	110	P22796 VM1H2_LACMU	246.62	59	7	106	6	96	1.41E+10	22,596	SVMP	Snake venom metalloproteinase hemorrhagic factor 2 OS=Lachesis muta muta OX=8753 PE=1 SV=1
Group 12	20	P30431 VM3JA_BOTJA	268.62	40	18	597	2	91	1.49E+10	63,983	SVMP	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like jararhagin (Fragment) OS=Bothrops jararaca OX=8724 PE=1 SV=1
Group 32	3457	P18618 VM2_BOTAT	201.28	83	7	519	2	46	2.22E+10	7,736	SVMP	Disintegrin batroxstatin OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=1 SV=2
Group 203	3644	tr A0A3G1E3T4 A0A3G1E3T4_ECHO C	114.29	6	2	34	2	34	1.06E+10	68,419	SVMP	Venom metalloproteinase PIII-SVMP EOC00089 OS=Echis ocellatus OX=99586 PE=3 SV=1
Group 140	3428	Q98UF9 VM3H3_BOTJA	192.45	22	8	66	2	27	1.65E+08	67,695	SVMP	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like HF3

												OS=Bothrops jararaca OX=8724 PE=1 SV=3
Group 150	3486	tr E3UJL1 E3UJL1_BOTNU	211.21	21	8	70	2	18	3.89E+08	49,627	SVMP	MP_III2 SVMP (Fragment) OS=Bothrops neuwiedi OX=95648 PE=2 SV=1
Group 83	322	tr A0A1L8D646 A0A1L8D646_BOTAT	214.09	21	10	119	2	17	2.74E+09	68,490	SVMP	BATXSV MIII27 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 22	11	P85420 VM11_BOTAT	284.81	71	13	568	2	15	8.25E+07	22,918	SVMP	Snake venom metalloproteinase atroxlysin-1 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=1 SV=2
Group 314	8758	Q7SZD9 VM2US_GLOUS	129.78	15	4	17	2	14	3.06E+08	53,444	SVMP	Zinc metalloproteinase/disintegrin ussurin OS=Gloydius ussuriensis OX=35671 PE=2 SV=1
Group 179	4536	tr A0A1L8D691 A0A1L8D691_BOTAT	208.23	20	10	50	4	12	3.14E+08	68,031	SVMP	BATXSV MIII14 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 194	1482	Q1PBD1 VM2DI_GLOHA	151.14	26	6	37	2	11	2.69E+08	53,142	SVMP	Zinc metalloproteinase/disintegrin OS=Gloydius halys OX=8714 PE=2 SV=1
Group 307	7395	tr A0A194APG6 A0A194APG6_9SAUR	110.3	6	3	12	2	11	1.20E+09	54,419	SVMP	Metalloproteinase type II OS=Agkistrodon piscivorus OX=8715 PE=3 SV=1
Group 39	3754	P31990 VM2I_LA CMU	185.73	79	6	482	2	10	1.41E+09	7,765	SVMP	Disintegrin lachesin OS=Laches

												is muta muta OX=8753 PE=1 SV=1
Group 323	7143	Q92043 V M3AA_C ROAT	144.27	8	3	11	2	10	1.30E+0 8	46,879	SVMP	Zinc metalloprot einase- disintegrin- like atrolysin-A (Fragment) OS=Crotal us atrox OX=8730 PE=1 SV=1
Group 74	136	Q9W6M5 VM3AH _DEIAC	177.43	18	8	137	2	9	1.19E+0 9	68,543	SVMP	Zinc metalloprot einase- disintegrin- like acurhagin OS=Deinag kistrodon acutus OX=36307 PE=1 SV=2
Group 351	23760	O93516 V M2S2_G LOBR	98.67	32	2	9	2	9	3.53E+0 8	11,726	SVMP	Zinc metalloprot einase/disin tegrin (Fragment) OS=Gloydi us brevicaudu s OX=25932 5 PE=2 SV=1
Group 25	14	tr A0A1L 8D5Y9 A 0A1L8D5 Y9_BOT AT	288.02	41	15	564	2	8	0	46,031	SVMP	BATXSV MPI5 OS=Bothro ps atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 218	3900	tr A0A1 W7RB97 A0A1W7 RB97_CR OAD	222.19	16	8	40	2	8	7.21E+0 8	69,020	SVMP	Cadam10_ SVMPIII-6 OS=Crotal us adamanteus OX=8729 PE=3 SV=1
Group 44	86	tr A0A1L 8D633 A0 A1L8D63 3_BOTA T	308.59	42	25	235	2	6	6.33E+0 8	68,843	SVMP	BATXSV MPIII19 OS=Bothro ps atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 354	11225	tr A0A2H 4Z2W1 A 0A2H4Z2 W1_DAB SI	103.11	8	3	6	2	4	3.18E+0 7	69,358	SVMP	RVV-X heavy chain OS=Daboia siamensis OX=34325 0 PE=2 SV=1

Group 28	7	Q5XUW8 VM2IA_BOTIN	211.02	23	11	540	2	2	2.39E+07	53,313	SVMP	Zinc metalloproteinase/disintegrin OS=Bothrops insularis OX=8723 PE=1 SV=1
Group 33	66	tr A0A1L8D641 A0A1L8D641_BOTAT	187.61	20	10	478	2	2	8.69E+07	67,724	SVMP	BATXSVMPIII9 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 180	3765	tr R4NNL0 R4NNL0_VIPAA	148.85	16	5	49	2	2	0	68,546	SVMP	H3 metalloproteinase 1 OS=Viperammodytes ammodytes OX=8705 PE=2 SV=1
Group 329	4992	Q8JIR2 VM3HA_PROFL	132.68	16	5	10	2	2	0	68,766	SVMP	Zinc metalloproteinase/disintegrin-like HR1a OS=Protothrops flavoviridis OX=88087 PE=1 SV=1
Group 313	4484	tr A0A194ARY4 A0A194ARY4_SISMB	127.84	21	4	17	2	2	4.93E+05	53,794	SVMP	Metalloproteinase type II 5c OS=Sistrurus miliarius barbouri OX=8759 PE=3 SV=1
Group 395	23298	tr E3UJL5 E3UJL5_BOTNU	113.98	14	3	6	2	2	1.31E+06	36,084	SVMP	MP_Iib1 SVMP (Fragment) OS=Bothrops neuwiedi OX=95648 PE=2 SV=1
							total	1,609				
Group 93	8583	tr A0A1L8D6B7 A0A1L8D6B7_BOTAT	365.53	54	30	146	11	69	4.67E+09	91,859	SVPD	BATXPDE1 OS=Bothrops atrox OX=8725 PE=2 SV=1
							total	69				
Group 77	3365	PODJ86 VSPL_BO TLC	244.6	56	8	236	3	115	8.40E+09	25,493	SVSP	Thrombin-like enzyme

												leucurobin OS=Bothro ps leucurus OX=15729 5 PE=1 SV=1
Group 66	3395	Q27J47 V SPPA_L ACMU	238.39	42	7	307	3	107	3.63E+1 0	28,062	SVSP	Venom plasminoge n activator LV-PA OS=Laches is muta muta OX=8753 PE=1 SV=1
Group 106	3381	Q5W959 VSP14_B OTJA	209.37	56	7	129	4	85	2.27E+1 0	27,843	SVSP	Snake venom serine protease HS114 OS=Bothro ps jararaca OX=8724 PE=1 SV=1
Group 165	3488	Q072L7 VSP_LA CST	182.72	47	6	58	3	36	7.11E+0 9	27,814	SVSP	Snake venom serine protease OS=Laches is stenophrys OX=88085 PE=2 SV=1
Group 124	3394	tr A0A1L 8D5V4 A 0A1L8D5 V4_BOT AT	194.36	49	6	91	2	22	3.68E+0 9	27,744	SVSP	BATXSVS P13 OS=Bothro ps atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 285	8772	B0FXM2 VSP14_C RODU	133.86	27	3	23	2	19	4.86E+0 8	29,262	SVSP	Thrombin- like enzyme gyroxin B1.4 OS=Crotal us durissus terrificus OX=8732 PE=2 SV=1
Group 217	4919	tr A0A1L 8D610 A0 A1L8D61 0_BOTA T	225.09	45	10	30	3	8	1.33E+0 8	28,380	SVSP	BATXSVS P11 OS=Bothro ps atrox OX=8725 PE=2 SV=1
Group 255	3522	tr A0A19 4AST0 A 0A194AS T0_SISM B	140.68	19	4	32	2	6	1.90E+0 8	28,204	SVSP	Serine proteinase 7a OS=Sistrur us miliarius barbouri OX=8759 PE=3 SV=1

Group 457	3748	tr A0A1L 8D5V3 A 0A1L8D5 V3_BOT AT	64.64	5	2	3	2	3	5.31E+0 8	28,000	SVSP	BATXSVS P14 OS=Bothro ps atrox OX=8725 PE=2 SV=1
							total	401				
Group 424	23425	tr A0A1L 8D601 A0 A1L8D60 1_BOTA T	88.01	27	2	6	2	6	1.69E+0 8	22,563	VEGF	BATXVE GF1 OS=Bothro ps atrox OX=8725 PE=2 SV=1
							total	6				