



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PÓS - GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE**

VENÔMICA E ANTIVENÔMICA DE *Bothrops erythromelas*: ESTUDO DA VARIAÇÃO  
INTRAESPECÍFICA.

ORIENTADORA: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

CO-ORIENTADOR: JUAN JOSÉ CALVETE CHORNET

Fortaleza

2015

**ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE**

VENÔMICA E ANTIVENÔMICA DE *Bothrops erythromelas*: ESTUDO DA VARIAÇÃO  
INTRAESPECÍFICA.

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do  
Ceará para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

ORIENTADORA: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

CO-ORIENTADOR: JUAN JOSÉ CALVETE CHORNET

Fortaleza

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

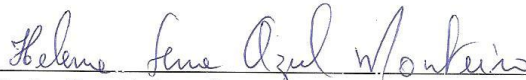
- 
- J71v Jorge, Roberta Jeane Bezerra.  
Venômica e Antivenômica de *Bothrops erythromelas*: estudo da variação intraespecífica./  
Roberta Jeane Bezerra Jorge. – 2015.  
130 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Farmacologia.  
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.  
Co-Orientação: Prof. Dr. Juan José Calvete Chornet.
1. Bothrops. 2. Proteômica. 3. Venenos de Serpente. I. Título.

ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE

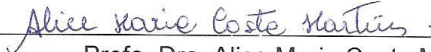
**"Venômica e Antivenômica de *Bothrops erythromelas*:  
Estudo da variação instraespecífica"**

Tese de Doutorado em Farmacologia submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 04 de março de 2015.



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
(Orientadora)



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará – UFC



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gandhi Rádís Baptista  
Universidade Federal do Ceará – UFC.



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima  
Universidade Estadual do Ceará – UECE



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Aos meus pais Nádja e Roberto e ao meu irmão Júnior.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha força maior e inexaurível.

Aos meus pais pelo que sou hoje.

A todos meus familiares e amigos pelo companheirismo e presteza, seria impossível e até passível de cometer algum esquecimento citar o nome de todos eles, mas cada um sabe o quanto sou grata e que podem sempre contar comigo.

Aos que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho: Minha orientadora Profa Dra Helena Serra Azul Monteiro e ao meu co-orientador Prof. Dr. Juan José Calvete e a sua equipe do Laboratório de Venômica y Proteinómica Estructural do Instituto de Biomedicina de Valencia e aos grandes amigos que fiz no período de estágio de doutorado na Espanha.

A todos os colaboradores deste trabalho no Brasil, Espanha e Costa Rica.

A todos do Laboratório de Farmacologia Venenos e Toxinas (LAFAVET), aos companheiros científicos, em especial aos amigos que fiz e a Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, os quais me proporcionaram crescimento profissional e pessoal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado *Sandwich* em Valencia-Espanha.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Entrega teu caminho ao Senhor, confia nele, e ele  
o fará”

Salmo 37:5

## RESUMO

A serpente *Bothrops erythromelas* é uma espécie de importância médica responsável por acidentes ofídicos, com predominância no Nordeste do Brasil. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo proteômico comparativo do *pool* de venenos desta espécie procedentes de cinco regiões geográficas do Nordeste: Ceará, Pernambuco, Juazeiro, Paraíba e Ilha de Itaparica. Além disso, foi investigada a capacidade do soro antivenenoso (SAB) do Instituto Vital Brazil e soro poliespecífico (BCL) da Costa Rica em neutralizar os venenos provenientes dessas populações através da antivenenômica e a capacidade de neutralização frente à atividade hemorrágica *in vivo*. A eletroforese bidimensional (2DE) mostrou padrões similares de proteínas distribuídas no intervalo de 14-95 kDa de massa molecular e pontos isoelétricos variando de 4 - 8,5. Trinta a quarenta frações foram recolhidas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC). Cada fração cromatográfica coletada manualmente foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE) e as bandas de proteínas foram excisadas e submetidas à análise venenômica que resultaram na identificação de aproximadamente 65 proteínas e 8 espécies de peptídeos pertencentes a 12 famílias de proteínas de venenos de serpentes: (Peptídeos Potenciadores de Bradicininina (BPPs), Fator de Crescimento Endotelial Vascular de Veneno de Serpente (svVEGF), Fosfolipase A<sub>2</sub>, Serinoproteases, Metaloproteases da classe I e da classe III (PI e PIII – SVMP), Desintegrinas e Domínios tipo Desintegrina e rico em Cisteínas, Lectinas do tipo C, Nucleotidases (5'-nucleotidase; 5'NT e Fosfodiesterase; PDE), Proteínas Secretórias Ricas em Cisteína (CRISP) e Fosfolipase B). Através desse trabalho foi demonstrado que os proteomas dos venenos das *B. erythromelas* das diferentes regiões do Nordeste são similares e parecem ser bastante conservados de acordo com sua distribuição geográfica, embora contenham diferenças peculiares tais como, a presença de CRISP detectadas apenas nos venenos de Pernambuco e da 5' NT na população de Juazeiro; assim como PDEs apenas nos proteomas das populações do Ceará e Pernambuco e da PLB no Ceará, Juazeiro e Ilha de Itaparica. Os resultados da antivenenômica mostraram que a imunorreatividade do soro pentavalente SAB é similar frente às cinco populações e mais eficiente em relação ao polivalente BCL. No entanto, pode-se observar especialmente que as frações de baixo peso molecular não são reconhecidas pelos dois antivenenos de forma eficiente. Embora tenham mostrado diferenças na sua eficácia de neutralização, ambos os antivenenos foram eficazes na neutralização da atividade hemorrágica *in vivo*. Apesar da serpente de *B. erythromelas* habitar uma abrangente área geográfica, as cinco populações estudadas apresentaram composição semelhante, exibindo um perfil altamente conservado das classes das proteínas representativas do veneno. Portanto, este estudo identificou as proteínas do veneno de *B. erythromelas* já caracterizadas na literatura (BPP, PLA<sub>2</sub> Asp49, PIII- SVMP e svVEGF) e forneceu informações adicionais para a presença de Serinoproteases e Lectinas do tipo C e de outros componentes minoritários ou específicos (PDE, 5'NT, PLB, CRISP).

**Palavras-chave:** *Bothrops*; Proteômica; Venenos de serpente.



## ABSTRACT

*Bothrops erythromelas* snake is a species of medical importance responsible for snakebites, predominantly in the Northeast of Brazil. This study aimed to conduct a comparative proteomic study of venoms pool of this species from five geographical regions of the Northeast: Ceará, Pernambuco, Juazeiro, Paraíba and Itaparica Island. In addition, we investigated the ability of *Bothrops* antivenom (SAB) of the Vital Brazil Institute and polyspecific serum (BCL) of Costa Rica to neutralize the venoms from these populations (antivenomics) and the ability to neutralize the *in vivo* haemorrhagic activity of venom. Two-dimensional electrophoresis (2DE) showed similar patterns of protein distributed in the range of 14-95 kDa molecular mass and isoelectric points ranging from 4 to 8.5. Thirty to forty fractions were collected by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). Each chromatographic fraction collected manually were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis - SDS (SDS-PAGE) and protein bands were excised and subjected to venom analysis resulting in the identification of approximately 65 proteins and 8 species of peptides belonging to 12 protein families (Bradykinin-Potentiating Peptides (BPPs), Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor (svVEGF), Phospholipase A<sub>2</sub>, Serine Protease, Metalloproteases class I and class III (PI and PIII - Symp), Disintegrins and Disintegrin-like and Rich in Cysteine domains, C-type Lectins, Nucleotidases (5'-nucleotidase; 5'NT and Phosphodiesterase; PDE), Secretory Proteins rich in Cysteine (CRISP) and snake venoms Phospholipase B. Through this work it was shown that the proteomes of venoms of *B. erythromelas* of different regions of Northeast are similar and seem to be quite kept according to their geographical distribution, although they contain peculiar differences such as the presence of CRISP detected only in the venoms of Pernambuco and 5'NT in the population of Juazeiro; and PDEs only in proteomes of populations of Ceará and Pernambuco and PLB in Ceará, Juazeiro and Itaparica Island. The antivenomics results showed that SAB pentavalent serum immunoreactivity is similar across the five populations and more efficient compared to the polyvalent BCL. However, it can be seen that especially low molecular weight fractions are not efficiently recognized by both antivenoms. Although differences were shown in their neutralization efficacy, both were effective in neutralizing antivenom hemorrhagic activity. Despite the *B. erythromelas* snake inhabit a comprehensive geographical area, the five populations showed similar composition, displaying a highly conserved profile of representative venom protein classes. Therefore, this study assigned all proteins in the venom of *B. erythromelas* that have been characterized in the literature (BPP, PLA<sub>2</sub> Asp49, PIII-Symp and svVEGF) and provided additional information to the presence of Serine Proteases and C-type Lectins and other minor or specific components (PDE, 5'NT, PLB, CRISP).

**Keywords:** *Bothrops*; Proteomic; Snake venoms.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Venenos botrópicos: constituintes, atividades tóxicas e farmacológicas</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Efeitos do envenenamento botrópico e a soroterapia tradicional</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>A serpente de <i>Bothrops erythromelas</i>: composição e ações do veneno</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Variabilidade dos venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e estudo proteômico</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Venenos e antivenenos</b>	<b>36</b>
<b>5.1.1</b>	Obtenção das peçonhas e coleta dos espécimes de <i>B. erythromelas</i>	<b>36</b>
<b>5.1.2</b>	Extração e armazenamento das peçonhas	<b>36</b>
<b>5.1.3</b>	Antivenenos	<b>39</b>
<b>5.1.4</b>	Análise eletroforética Bidimensional	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Caracterização dos venenos: Venômica</b>	<b>40</b>
<b>5.2.1</b>	Cromatografia de Fase Reversa (RP-HPLC)	<b>41</b>
<b>5.2.2</b>	SDS-PAGE e digestão <i>in gel</i>	<b>42</b>
<b>5.2.3</b>	Espectrometria de Massas	<b>43</b>
<b>5.2.4</b>	Quantificação da abundância relativa das toxinas	<b>43</b>
<b>5.3</b>	<b>Antivenômica</b>	<b>45</b>
<b>5.4</b>	<b>Neutralização da atividade hemorrágica</b>	<b>47</b>

<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>Análise eletroforetica bidimensional</b>	<b>49</b>
<b>6.2</b>	<b>Cromatogramas individuais</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>Isolamento e caracterização das proteínas do veneno</b>	<b>49</b>
<b>6.4</b>	<b>Análise dos venenos de <i>B. erythromelas</i> através da segunda geração da antivenômica</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>89</b>
	<b>Proteômica do veneno das populações de <i>B. erythromelas</i></b>	<b>89</b>
	<b>1-Componentes relacionados aos efeitos hipotensores na vítima de acidente ofídico</b>	<b>89</b>
	<b>2-Componentes majoritários e principalmente envolvidos na patogênese do envenenamento ofídico</b>	<b>90</b>
	<b>3-Componentes minoritários e ainda pouco estudados</b>	<b>96</b>
	<b>4-Antivenômica e neutralização da atividade hemorrágica de <i>B. erythromelas</i> por antivenenos comerciais.</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>106</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>126</b>

# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos podem ser considerados preocupantes para a saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais tais como, África, Ásia, Oceania e América Latina, representando importante causa de morbidade e mortalidade e incluídos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na lista de doenças negligenciadas (CRUZ *et al.*, 2009; HARRISON *et al.*, 2009).

Esses acidentes podem ocasionar sérios problemas à saúde humana, pois dados recentes mencionam que existem aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais cerca de 20% são consideradas venenosas. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aconteçam 2.500.000 casos mundiais de envenenamentos por serpentes peçonhentas ao ano, o que resulta em, aproximadamente, 125.000 mortes e inúmeros casos resultam em sequelas graves (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

No território brasileiro ocorrem quatro gêneros de serpentes venenosas, com dezenas de subespécies reconhecidas. Os gêneros *Bothrops* (jararacas) e *Micrurus* (corais) podem ser encontrados em todo o território nacional, enquanto o gênero *Crotalus* (cascavéis) se distribui preferencialmente pelo Sudeste e Sul e as *Lachesis* (surucucus), na região Amazônica e de Mata Atlântica (BÉRNILS, 2009).

Os casos de acidentes ofídicos da América do Sul são os que ocorrem em maior número no Brasil com aproximadamente 20.000 casos notificados por ano e uma taxa de letalidade de 0,45% (LEITE *et al.*, 2013). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde (MS), ocorreram nos anos de 2000 a 2013, mais de 360.506 casos de acidentes envolvendo serpentes peçonhentas, com uma média de 13,8 casos a cada 100.000 habitantes, resultando em 1.487 óbitos (BRASIL, 2013). Em torno de 90% desses acidentes são causados por serpentes do gênero *Bothrops*.

A peçonha botrópica é extremamente complexa e compreende uma variedade de substâncias farmacologicamente ativas que atuam sinergicamente na indução das alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento, responsáveis pelo desenvolvimento de efeitos tóxicos locais e sistêmicos. As alterações no local da inoculação da peçonha se desenvolvem rapidamente após o envenenamento e não são eficientemente neutralizadas pela soroterapia tradicional (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a; 2009b; GOMES *et al.*, 2010).

Estudos recentes realizados com a peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* identificaram variações na composição proteica e imunodepleção dos venenos de serpentes da mesma espécie coletadas em diferentes regiões que podem mostrar diferentes potências de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos e afetar a neutralização proporcionada pelo antiveneno, tornando pouco previsível o tratamento das vítimas de acidentes ofídicos (CALVETE *et al.*, 2011).

A variação na composição de venenos animais ocorre em diversos níveis, incluindo interfamília, intergênero, interespecie, intersubspecie e intraespecie. A variação intraespecie pode acontecer ainda individualmente, devido à variação sazonal, dieta, habitat, idade e dimorfismo sexual (CHIPPAUX *et al.*, 1991).

O estudo dessas variações intraespecíficas na composição das peçonhas ofídicas, em especial do gênero *Bothrops*, é de suma importância para a melhor compreensão deste fenômeno e sua aplicação na produção de anticorpos mais efetivos para a neutralização dos efeitos tóxicos dos envenenamentos, principalmente dos efeitos locais que muitas vezes geram sequelas permanentes, diminuindo de forma expressiva as chances de vida ativa do paciente, sobrecarregando o sistema previdenciário.

Quando a espécie de *Bothrops erythromelas* é enfocada, a necessidade de um estudo de variação intraespecífica se torna mais urgente, já que esta espécie apesar de responsável pela maior parte dos acidentes ocorridos na região Nordeste, não faz parte do *pool* de venenos que é utilizado para produção do soro antiveneno. Em vista disso, é relevante compreender as variações intraespecíficas (na composição e nas atividades farmacológicas e tóxicas) da peçonha de *B. erythromelas* coletadas em diferentes regiões geográficas onde ocorrem naturalmente, bem como a capacidade do soro antitropical comercial de reconhecer este veneno, através de estudos de proteômica e antivenômica. A fim de compreender a variabilidade individual da peçonha de *B. erythromelas* e conhecer sua possível implicação na terapêutica atual dos casos de envenenamento por essa espécie em particular.

# **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Venenos botrópicos: constituintes, atividades tóxicas e farmacológicas

Venenos de serpentes são uma mistura complexa de enzimas, glicoproteínas, polipeptídios e componentes não-protéicos sintetizados e armazenados em pares de glândulas altamente especializadas, ligadas às presas por dutos. Os componentes dos venenos permitem que as serpentes possam confinar, imobilizar e digerir suas presas, além de ser um mecanismo de defesa contra predadores (MACKESSY; BAXTER, 2006; CALVETE *et al.*, 2009; ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009).

Após a inoculação, essa mistura de componentes mostra uma rica variedade de ações biológicas (Quadro 1), agindo como toxinas e atacando vários sistemas fisiológicos, levando muitas vezes à morte e debilitação da presa ou vítima. As toxinas de serpentes em sua maioria exibem suas atividades farmacológicas por conta própria. No entanto, algumas proteínas formam complexos, covalentes ou não covalentes, com outras proteínas para exibir atividade farmacológica mais potente. Estas interações sinérgicas entre as proteínas do veneno aumentam sua potência letal (DOLEY; KINI, 2009).

Estudos sobre as últimas duas décadas têm demonstrado que as toxinas dos venenos das serpentes pertencem a superfamílias de proteínas enzimáticas e não-enzimáticas. As proteínas dentro de cada família compartilham semelhanças notáveis em suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, mas podem diferir entre si em seus efeitos farmacológicos (ÂNGULO; LOMONTE, 2009; KANG, 2011).

Cerca de 90 a 95% do peso seco dos venenos ofídicos têm propriedade protéica, e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos encontrados (BJARNASON; FOX, 1994; KOH, 2006). Em menor proporção, a fração não-protéica dos venenos têm substâncias inorgânicas, tais como, cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, colbato e zinco, estando alguns destes componentes relacionados a mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos presentes no veneno. Outros componentes incluem, substâncias orgânicas, como aminoácidos livres, pequenos peptídeos, carboidratos, fosfolípídeos e aminas biogênicas (MARKLAND, 1998; WARREL, 2010).

**Quadro 1** - Características funcionais e químicas das peçonhas de serpentes da família Viperidae



Componente	Função	Atividade Biológica	Massa molecular aproximada (KDa)
<b>ENZIMAS</b>			
<b>Fosfodiesterase</b>	Hidrólise de ácidos nucleicos e nucleotídeos	Hipotensão; depleção de di- e trinucleotídeos	94 – 140
<b>5'-nucleotidase</b>	Hidrólise do 5' nucleotídeos	Liberção de nucleosídeos.	53 – 82
<b>Alcalina-fosfomonoesterase</b>	Hidrólise das pontes de fosfomonoéster	-----	90 – 110
<b>Hialuronidase</b>	Hidrólise do hialurônio intersticial	Diminuição da viscosidade intersticial–difusão dos componentes da peçonha.	73
<b>L-aminoácido oxidase (homodimérica)</b>	Desaminação oxidativa dos L-aminoácidos	Indução de apoptose, danos celulares.	85 – 150
<b>Metaloproteinase Família M12 reprotolisina P-IIP-II P-I</b>	Hidrólise de várias proteínas estruturais, incluindo componentes da lâmina basal, fibrinogênio, etc; Algumas são ativadores de protrombina (grupos A e B)	Hemorragia, mionecrose, pré-digestão da presa.	43 – 85 25 – 30 20 – 24
<b>Serino proteinase Trombina-símile</b>	Hidrólise Catalítica do fibrinogênio	Rápida depleção do fibrinogênio; alteração da homeostasia.	31 – 36
<b>Caliceína-símile</b>	Liberção de Bradicina pelo Cininogênio de alto peso molecular; Hidrólise da angiotensina	Induz a rápida queda de pressão sanguínea; imobilização da presa.	27 – 34
<b>“Argininaesterase”</b>	Atividade esterásica e peptidase	-----	25 – 36
<b>Fosfolipase A<sub>2</sub> (Grupo II)</b>	Hidrólise dependente de Ca <sup>2+</sup> do grupo 2-acil em 3-sn-fosfoglicerídeos	Miotoxicidade, mionecrose, danos na membrana lipídica.	13 – 15
<b>PROTEÍNAS/PEPTÍDEOS NÃO-ENZIMÁTICOS</b>			
<b>Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRiSPs)</b>	Bloqueio dos canais cNTP	Induz hipotermia.	21 – 29
<b>Fatores de Crescimento Neural</b>	Promover o crescimento de fibras nervosas	Apoptose – incerto.	14 – 32,5
<b>PLA<sub>2</sub>-neurotoxinas pré-sinápticas (2 subunidades, ácida e básica)</b>	Bloqueio da liberação de acetilcolina para terminais do axônio	Potente neurotoxicidade; Imobilização da presa.	24
<b>Lectinas tipo-C</b>	Ligam-se as plaquetas e ao receptor de colágeno	Anticoagulante, modulador plaquetário.	27 – 29
<b>Desintegrinas</b>	Inibe os ligantes de integrinas	Inibição plaquetária.	5,2 – 15
<b>Miotoxinas–não-PLA<sub>2</sub></b>	Modifica voltagem dos canais para sódio; interage com os lipídios de membranas	Mionecrose, analgesia, imobilização da presa.	4 – 5,3
<b>PEPTÍDEOS</b>			
<b>Peptídeos potenciadores de bradicinina</b>	Aumenta a potência da bradicinina	Dor, hipotensão; imobilização da presa.	1,0 – 1,5
<b>Tripeptídeos inibidores</b>	Inibição de metaloproteinases da peçonha e outras enzimas	Estabilização dos componentes da peçonha.	0,43 – 0,45
<b>COMPONENTES ORGÂNICOS</b>			
<b>Purinas e Pirimidinas</b>	Amplos efeitos em diversas células	Hipotensão, paralisia, apoptose, necrose; imobilização da presa.	AMP = 0,392, hipoxantina, inosina
<b>Citrato</b>	Inibição de enzimas da peçonha	Estabilização da peçonha.	0,192
<b>COMPONENTES INORGÂNICOS</b>			
<b>Zinco, Cálcio, Magnésio, Manganés, Cobre, Ferr, Sódio, Fósforo, Colbato</b>	Estabilizar proteínas e atuar nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como, por exemplo, zinco atuando em Metaloproteinase	-----	-----

Modificação: Livro Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles (MACKESSY,2010)

São componentes da fração protéica dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae) as proteínas enzimáticas; Fosfolipase A<sub>2</sub>, metaloproteases, serino proteases, L-amino ácido oxidase (LAAO), hialuronidases, nucleotidase e fosfodiesterase e as proteínas não-enzimáticas; miotoxinas sem atividade de fosfolipase, lectinas tipo C, desintegrinas, fatores de crescimento e proteínas secretórias ricas em cisteínas (ESPINOSOLIS *et al.*, 2009; CALKOSINSKI *et al.*, 2010; KANG, 2011).

A superfamília da Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) é composta de muitos grupos diferentes de enzimas que atuam na hidrólise de fosfolipídeos de membrana especificamente na ligação 2-acil éster em uma variedade de fosfolipídeos, resultando na geração de mediadores lipídicos e segundos mensageiros que desempenham funções importantes na regulação das atividades celulares (KINI, 2003; BURKE; DENNIS, 2009). Encontram-se amplamente distribuídas em tecidos de mamíferos, microorganismos e venenos de répteis e artrópodes. Os venenos das serpentes são abundantes em PLA<sub>2</sub>, além de desempenhar um papel digestivo na hidrólise de fosfolipídeos, podem também exercer uma grande variedade de atividades farmacológicas e/ou tóxicas como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorrágica, hemolítica, edema, efeitos pró-coagulantes e anticoagulantes (SOARES; GIGLIO, 2003; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; MONTECUCCO *et al.*, 2008).

LAAO são flavoenzimas diméricas, glicosiladas, enantiosseletivas que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de uma vasta gama de L-aminoácidos, para formar alfa-cetoácidos, peróxido de hidrogênio e amônia. O peróxido de hidrogênio parece estar relacionado à toxicidade do veneno (RODRIGUES *et al.*, 2009; NAUMANN *et al.*, 2011). Este grupo de enzimas é responsável pela cor amarela do veneno liofilizado (KANG, 2011). Os efeitos biológicos destas enzimas durante o envenenamento ainda não estão claramente compreendidos. No entanto, estudos *in vitro* mostram que elas exibem diversas atividades como pró-apoptose, inibição da agregação plaquetária e distúrbios da hemostasia (DOLEY; KINI, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2009; NAUMANN *et al.*, 2011).

As serinoproteases e metaloproteases são complexos da protease que afetam a cascata de coagulação sanguínea e ajudam na digestão das presas, promovendo assim danos teciduais. Embora a maioria delas seja farmacologicamente ativa por si só, algumas requerem co-fatores (Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, fosfolipídeos) para exercerem uma atividade ideal (DOLEY; KINI, 2009). Algumas proteases exercem atividade na liberação de cininas que podem contribuir para dor local, vasodilatação e hipotensão sistêmica (CARDOSO *et al.*, 2010).

As desintegrinas são um grupo não-enzimático de moléculas pequenas que se ligam seletivamente a moléculas de integrinas. Possuem domínios ricos em cisteína e lectinas

tipo-C, geralmente conjugadas a metaloproteases. Domínios ricos em cisteína são capazes de aumentar o rolamento de leucócitos na microcirculação e inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno, contribuindo para os efeitos hemorrágicos. Proteínas com domínios de lectinas tipo C, interagem com receptores destas em plaquetas e estão envolvidas na indução de distúrbios da coagulação como atividades hemaglutinantes, agregação plaquetária e inibição da atividade da trombina (CALVETE *et al.*, 2005).

Dentre os componentes sem atividade enzimática há constituintes orgânicos e não orgânicos (TU, 1996; MATSUI *et al.*, 2000; RAJENDRA *et al.*, 2004). Os constituintes não orgânicos conhecidos são: cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH e TU, 1971). Alguns estudos sugerem que o cálcio, o manganês e o magnésio são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como metaloproteases (BJARNASON; FOX, 1994).

## **2.2 Efeitos do envenenamento botrópico e a soroterapia tradicional**

O gênero *Bothrops* pertence à família Viperidae, compreende mais de 30 espécies de serpentes, e tem esta denominação decorrente da língua grega: “Bothros” significa fosseta ou cavidade e “ops”, significa olho ou face, uma alusão à fosseta loreal, localizada entre a narina e os olhos destas serpentes (CARRASCO *et al.*, 2012). Envenenamentos por serpentes deste gênero são frequentemente associados a alterações sistêmicas e severas alterações patológicas locais (WARRELL, 2005; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b).

Os efeitos locais frequentemente incluem dor, edema, hemorragia local e inflamação. Este quadro clínico na maioria das vezes evolui resultando em necrose tecidual (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). Efeitos sistêmicos resultam em coagulopatia, hipotensão arterial, alterações hemodinâmicas, hemólise intravascular, dano agudo do miocárdio, edema pulmonar, insuficiência renal aguda, falência de múltiplos órgãos e hemorragias distantes dos locais da picada, tais como hemorragia gengival, macrohematúria, hemorragia uterina e gastrintestinal (KAMIGUTI *et al.*, 1996; WARRELL, 2005).

Uma das complicações que traz grande preocupação nos acidentes ofídicos são as alterações renais, como glomerulonefrite aguda, necrose tubular aguda e insuficiência renal

aguda (IRA), esta última relacionada aos casos de letalidade pelo envenenamento (SITPRIJA, 2008). A patogênese da IRA ainda não está completamente elucidada. No entanto, sabe-se que as lesões renais podem ser produzidas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos desencadeados pelas atividades biológicas dos venenos no organismo (PINHO *et al.*, 2000; GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008). Estudos com rim isolado demonstraram que os venenos de diferentes espécies de *Bothrops* alteram os parâmetros da função renal (HAVT *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2005).

A lesão tecidual local é um dos grandes problemas após envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* (Figura 1). A magnitude destes efeitos depende do tipo de peçonha, da quantidade injetada e do hospedeiro. Em muitos casos, o dano tecidual é tão intenso que leva a severas consequências como degeneração vascular e isquemia, as quais podem culminar com a amputação do membro afetado (CARDOSO *et al.* 1993; WARRELL, 2010).

**Figura 1.** Alterações locais promovidas por acidentes com *Bothrops*.



A: Edema, sangramento e equimose em mão esquerda (OLIVEIRA, 2008); B: Sangramento eritematoso e edema no tornozelo direito (OROPEZA *et al.*, 2000); C: Equimose, bolhas e edema em pé direito; D: necrose tecidual grave em perna direita (WHO, 2007).

Mionecrose e hemorragia induzidas por venenos de *Bothrops* são provavelmente devido, principalmente, à ação direta de toxinas nas células musculares e microvasos, respectivamente. Por outro lado, o edema depende da direta ação dos componentes do veneno na microvasculatura, bem como sobre a liberação de um número de mediadores inflamatórios nos tecidos, tais como eicosanóides, aminas vasoativas, citocinas entre outros (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Mesmo tendo sido feitos avanços importantes para o entendimento da patogênese da hemorragia e mionecrose no envenenamento por *Bothrops*, o estudo das alterações patológicas induzidas por estes venenos na lesão tecidual local tem recebido pouca atenção, apesar de sua relevância clínica (JIMENEZ *et al.*, 2008).

O tratamento eficaz para envenenamento botrópico sistêmico é a administração intravenosa de soro antibotrópico, e em alguns casos, de antiveneno botrópico-crotálico (CORREA-NETTO *et al.*, 2010). Os antivenenos são preparados por hiperimunização de animais, principalmente cavalos e ovelhas (ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009). A soroterapia neutraliza de forma eficiente os efeitos tóxicos sistêmicos, impedindo, muitas vezes, vítimas fatais. Administração imediata de antiveneno adequado para pacientes sistemicamente envenenados melhora a taxa de recuperação da coagulopatia em diversos estudos de pacientes envenenados por *Bothrops* em países sul-americanos e asiáticos (CARDOSO *et al.*, 1993; CARON *et al.*, 2009).

No entanto, os antivenenos apresentam desvantagens, tais como: induzir reações adversas, variando de leves a graves, e ser ineficaz na neutralização do dano tecidual local (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009c). As reações adversas podem variar em 37 a 87% dos casos (CARDOSO *et al.*, 1993; CRUZ *et al.*, 2009) e podem incluir reações anafiláticas leves com náuseas, vômitos e urticária e efeitos mais graves como angioedema, broncoespasmo e hipotensão (BROWN & LANDON, 2010; CARDOSO *et al.*, 1993; CARON *et al.*, 2009), que não podem ser previstos por meio de testes de sensibilidade (FAN *et al.*, 1999; PREMAWARDHENA *et al.*, 1999). A maioria dessas reações pode ser devido à ação de altas concentrações de proteínas presentes em imunoglobulinas hiperimunes disponíveis no antiveneno (GOMES *et al.*, 2010).

Além da administração do antiveneno, o tratamento também pode incluir uma série de intervenções adicionais, tais como hidratação, equilíbrio de eletrólitos; além de administração do toxóide tetânico, diálise, alcalinização precoce da urina por bicarbonato de sódio em pacientes com mioglobulinúria ou hemoglobulinúria; antibióticos em caso de desenvolvimento de infecção local e intervenções cirúrgicas no debridamento do tecido necrosado (CRUZ *et al.*, 2009).

Outros problemas são a baixa disponibilidade do tratamento em áreas distantes, os atrasos na administração, necessidade de refrigeração, e de alto custo e baixa eficácia (CRUZ *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009c). Além disso, a variabilidade inter e intra-específica na composição do veneno entre as espécies deve também ser considerada, uma vez que existem variações entre os períodos de tempo no ano, idade da amostra e distribuição geográfica, que podem afetar a neutralização pelo antiveneno (CALVETE *et al.*, 2009).

### **2.3 A serpente de *Bothrops erythromelas*: composição e ações do veneno**

O Brasil é um dos países que apresentam maior diversidade taxonômica e de formas de serpentes e isso inclui as espécies de importância na Saúde Pública. Entre estas espécies, estão envolvidas as serpentes responsáveis pelos acidentes botrópico (*Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerothis*), crotálico (Caudisona), laquético (*Lachesis*) e elapídico (*Leptomicrurus* e *Micrurus*) (FENWICK *et al.* 2009; BERNARDE, 2011; CARRASCO *et al.*, 2012; WALLACH *et al.*, 2014).

O grupo *Bothrops neuwiedi* é atualmente composto por oito espécies: *B. diporus*, *B. erythromelas*, *B. lutzi*, *B. matto grossensis*, *B. marmoratus*, *B. neuwiedi*, *B. pauloensis* e *B. pubescens* (MACHADO *et al.*, 2014). Representantes do complexo *neuwiedi* são comuns em áreas abertas do nordeste do Brasil até o sudeste da Argentina (Werman, 2005). *Bothrops erythromelas* ocorre principalmente nas áreas de Caatinga; *B. lutzi*, *B. pauloensis* e *B. marmoratus* ocorrem principalmente no Cerrado; *B. matto grossensis* e *B. diporus* são distribuídos principalmente na região do Chaco ou Gran Chaco; *B. pubescens* é limitada aos Pampas na região sul do Brasil e Uruguai e *B. neuwiedi* ocorre ao longo das montanhas na costa Sudeste do Brasil (SILVA, 2004; SILVA; RODRIGUES, 2008).

O bioma da Caatinga é caracterizado por um clima quente e semi-árido, fortemente sazonal e por um padrão extremamente irregular de chuvas com estações secas severas em alguns anos. É considerado o único bioma exclusivo do Brasil, cobrindo 734.478 km<sup>2</sup> na região Nordeste (cerca de 7% do território nacional) e ocorrendo em manchas no norte de Minas Gerais (SCARDUA, 2004; BARROS *et al.*, 2014). O que praticamente significa que grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em outro lugar do mundo.

A serpente de *Bothrops erythromelas* (figura 2), comumente conhecida como “jararaca da seca” ou “jararaca malha-de-cascavel”, é responsável por muitos acidentes ofídicos no Nordeste do Brasil, ocorrendo em habitats secos e molhados na vegetação da Caatinga. De acordo com Uetz *et al.* (2015), estende-se pelos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia e norte de Minas Gerais (figura 3), assim como o bioma da Caatinga. Esta espécie possui um comprimento rostro-cloacal médio de 55 centímetros, se alimenta de rãs, lagartos, mamíferos, e centopeias (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2014). Répteis que vivem em ambientes áridos como na Caatinga, podem mostrar adaptações fisiológicas, comportamentais, ecológicas e morfológicas relacionadas à escassez da água no ambiente (RODRIGUES, 2003).

**Figura 2:** *Bothrops erythromelas*



Fonte: Fotos gentilmente cedidas e realizadas por Roberto Murta, 2014.

O gênero *Bothrops* vem sofrendo alterações taxonômicas (Quadro 2) de acordo com o demonstrado por estudos filogenéticos sistemáticos baseados em características morfológicas e moleculares. Como se pode observar no quadro 2 com a serpente de *Bothrops erythromelas*. Classificada por Fenwick *et al.* (2009) e Wallach *et al.* (2014) como *Bothropides* e tendo em vista que esta nomenclatura é recente e divergente, ainda não tem sido amplamente utilizada nas publicações da área. No entanto, considera-se importante a constante atualização em relação às classificações taxonômicas não apenas para familiaridade ou conhecimento prévio, mas também para dar credibilidade e segurança ao que está estudando independente de mudanças na nomenclatura.



**Figura 3** - Distribuição da serpente de *Bothrops erythromelas* pelos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia e norte de Minas Gerais.



Fonte: Uetz *et al.*, (2015).

**Quadro 2** - Alterações taxonômicas da serpente de *Bothrops erythromelas*.

ESPÉCIE	REFERÊNCIAS
<i>Bothrops erythromelas</i>	(AMARAL, 1923)
<i>Bothrops erythromelas</i>	(PETERS e OREJAS-MIRANDA, 1970, p.45)
<i>Bothrops erythromelas</i>	(WELCH 1994, p.33)
<i>Bothrops erythromelas</i>	MCDIARMID <i>et al.</i> , 1999, p. 260)
<i>Bothrops erythromelas</i>	(RODRIGUES, 2003)
<i>Bothropoides erythromelas</i>	(FENWICK <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bothrops erythromelas</i>	(CARRASCO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bothropoides erythromelas</i>	(WALLACH <i>et al.</i> 2014, p.113)

O veneno de *B. erythromelas* tem quatro componentes isolados e caracterizados os quais são: Peptídeo potenciador de bradicinina (BPP), fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente (svVEGF) mediando o efeito hipotensor (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2001), Fosfolipase A2 (Asp49) ácida relacionada com o efeito antiplaquetário e inflamatório (ALBUQUERQUE-MODESTO *et al.*, 2006), e uma

metaloproteinase chamada de Berythactivase apresentando atividade coagulante (SILVA *et al.*, 2003).

A referida espécie é a principal responsável pelos acidentes ofídicos na região Nordeste, e a sua peçonha não faz parte do *pool* utilizado para a fabricação do soro antibotrópico. Em geral, os efeitos do envenenamento ofídico por *Bothrops* são semelhantes e os venenos da maioria das espécies botrópicas possuem atividade de ativação direta sobre protrombina, combinada, ou não, com atividade trombina-símile e/ou de ativação de Fator X. No entanto, esta espécie destaca-se entre as desses gêneros por possuir alta atividade coagulante (FERREIRA *et al.*, 1992b; ZAPPELLINI, 1991), além da particularidade de não exibir ação similar a trombina (serino proteases que atuam diretamente sobre a molécula de fibrinogênio convertendo-a em fibrina - encontradas em outras peçonhas botrópicas), o que leva a distúrbios hemostáticos graves (MARUYAMA *et al.*, 1992).

Valença e colaboradores (1997), estudando o processo hemorrágico induzido pela peçonha de *B. erythromelas*, em envenenamento experimental em cães, mostrou que o veneno induz mudanças hemostáticas envolvendo hipercoagulabilidade sanguínea seguida por incoagulabilidade sanguínea onde a análise histológica dos tecidos dos animais experimentais revelou um quadro hemorrágico sistêmico, sendo os principais órgãos afetados pulmões, rins e fígado.

A atividade coagulante presente na peçonha de *B. erythromelas* é atribuída à presença de toxinas pró-coagulantes, ativadoras dos fatores II (protrombina) e X, que levam à formação de trombina endógena, levando a um quadro de coagulação intravascular disseminada (NAHAS *et al.*, 1979; MARUYAMA *et al.*, 1992; KAMIGUTI & SANO-MARTINS, 1995; VASCONCELOS, 1996).

Berythactivase é ativadora de protrombina não-dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  ou de fosfolípídeo para a sua atividade. Análise da sequência de cDNA revelou que a berythactivase é um membro da classe P-III da família de proteínas metaloproteinases.

Apesar da semelhança estrutural, a berythactivase possui baixa atividade fibrinogenolítica e ausência de ação hemorrágica local, em contraste com outras metaloproteinases da classe P-III (SILVA *et al.*, 2003). Contudo, foi demonstrado que este ativador de protrombina possui atividades pro-inflamatórias, como suprarregulação da expressão endotelial de ICAM-1, liberação de fator Von Willebrand, prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) e interleucina-8 (IL-8) e geração de óxido nítrico (NO) (SILVA *et al.*, 2003; SCHATTNER *et al.*, 2005).

A fosfolipase A2 (Asp49) ácida de *B. erythromelas* (BE-I-PLA<sub>2</sub>) demonstrou potente ação anti-plaquetária e indutora da liberação de prostaglandina I<sub>2</sub> e baixa atividade miotóxica (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991). Em sistema de perfusão de rim isolado, a peçonha de *B. erythromelas* (MARTINS *et al.*, 2005) e sua fosfolipase isolada (SOUSA, 2010) promoveu alterações dos parâmetros funcionais renais da pressão de perfusão, resistência vascular renal, ritmo de filtração glomerular, fluxo urinário e dos transportes percentuais totais de sódio, cloreto e potássio, apresentando nefrotoxicidade direta neste modelo.

#### **2.4 Variabilidade dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e estudo proteômico**

A composição do veneno pode ser influenciada por uma série de fatores diferentes, principalmente o potencial de deriva genética, a variação de gênero e as variações ontogenéticas (relacionadas à idade). A heterogeneidade inter e intra-espécies na composição da peçonha explicam as diferenças nos sintomas clínicos observados em vítimas humanas de envenenamento por serpentes da mesma espécie em diferentes regiões geográficas (CALVETE *et al.*, 2009).

A variabilidade na composição e nas atividades biológicas das peçonhas de serpentes vem sendo documentada por diversos autores e pode ser observada em diversos níveis tais como variações interfamiliares, variações intergenéricas, variações interespecíficas e variações intraespecíficas. Além de variações ontogenéticas, geográficas, sazonais e sexuais, que está correlacionada com diferenças no quadro clínico e resposta na terapêutica dos acidentes ofídicos (CHIPPAUX *et al.*, 1991; SANCHEZ *et al.*, 1992; WARREL, 1997).

Estudos de mais de uma década atrás descrevem que a composição do veneno de uma mesma espécie pode variar geralmente em função de pelo menos três fatores como a idade do animal, a distribuição geográfica e o caráter individual. Os venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni* jovens possuem maior atividade pró-coagulante (ativação de fator X e protrombina) e menor atividade inflamatória aguda local em relação às serpentes adultas (FURTADO, 1987). Serpentes da mesma espécie, coletadas em regiões diferentes, podem apresentar variações nas atividades dos venenos (DALTRY *et al.*, 1996). Serpentes da mesma espécie, idade, e procedência, podem apresentar diferentes intensidades nas atividades farmacológicas que parecem variar em função da dieta presente na região onde o réptil é

encontrado (FURTADO, 1987; DALTRY *et al.*, 1996; KAMIGUTI, 1988; KAMIGUTI e CARDOSO, 1989).

Essas variações na composição da peçonha refletem adaptações locais, que conferem vantagens para a população de serpentes em relação ao meio-ambiente (GIBBS *et al.*, 2009). Daltry e colaboradores (1996) sugerem que as variações geográficas na composição das peçonhas de serpentes refletem uma especialização apropriada às presas locais. Um estudo comparativo entre os venenos de *Bothrops pubescens*, nascidas em cativeiro e de seus congêneres selvagens de mesma origem geográfica de seus genitores, observou similaridade entre os perfis de migração eletroforética apesar das diferenças da alimentação não natural em cativeiro, evidenciando que a relação entre o tipo de presa e composição do veneno é herdada e não induzida, estando sob possível controle genético (MORAIS *et al.*, 2006).

Dias (2013) demonstrou a expressiva variabilidade individual nos venenos de filhotes de *B. jararaca*, fato que já havia sido demonstrado em venenos individuais de adultos desta espécie, e sugeriu que a variação individual nos venenos está presente desde o nascimento, não sendo um reflexo da ontogenia do animal. Outro estudo proteômico recente do veneno de *B. jararaca*, no entanto com um *pool* representativo de duas regiões do Brasil, identificou que entre as proteínas majoritárias do veneno, as espécimes do Sudeste apresentaram mais metaloproteínases, enquanto os do Sul uma maior quantidade de PLA<sub>2</sub>. A população do Sul ainda possui uma toxina exclusiva em relação ao Sudeste, identificada como uma Lys49-PLA<sub>2</sub>, mostrando, desse modo, diferenças importantes na composição de extremos da distribuição geográfica desta espécie, o que pode ter relevância para o quadro clínico e tratamento (GONÇALVES-MACHADO, 2014).

De acordo com Vellard (1937) a variação intraespecífica do veneno de *B. atrox*, resultou na variabilidade do quadro clínico e pode ser evidenciado em espécies que tem uma distribuição geográfica mais ampla. A variabilidade geográfica e intraespecífica de venenos de serpentes *B. asper* provenientes da Costa Rica foi demonstrada principalmente no que diz respeito à toxicidade (JIMENEZ-PORRAS, 1964; GUTIERREZ *et al.*, 1980; ARAGON e GUBENSEK, 1981; MORENO *et al.*, 1988). Gutiérrez e colaboradores (1980) mostraram que venenos de serpentes provenientes de regiões do Caribe causavam nos pacientes maiores efeitos hemorrágico e mionecrótico do que aqueles advindos de diferentes partes do Pacífico.

Um estudo comparativo entre os efeitos tóxicos de diferentes espécies do gênero *Bothrops* (e *Bothropoides*) (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*) mostrou diferenças entre o potencial hemorrágico, necrosante, proteolítico,

coagulante e edematogênico (FURTADO *et al.*, 1991). Outra pesquisa com peçonhas de espécimes de *Bothrops jararacussu* provenientes de diferentes localidades constatou expressivas diferenças nas atividades biológicas das peçonhas, principalmente na miotoxicidade e hemorragia induzida em camundongos (RAFAEL *et al.*, 2005).

Calmette, em 1894, foi o primeiro pesquisador a preparar soro antipeçonha para uso médico contra acidentes ofídicos, tornando-se, então, o real promotor da terapia com soro antipeçonha. Depois dele muitos outros cientistas começaram a desenvolver soros antipeçonha em seus próprios países: Tidwell na Austrália em 1902; Vital Brazil no Brasil em 1901; Ishizaka no Japão em 1907 - todos utilizando os protocolos de Calmette (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998).

Vital Brazil foi o primeiro pesquisador a demonstrar, em 1901, a especificidade dos soros antiofídicos, o que levou ao grande desenvolvimento da eficácia na soroterapia no mundo. Partindo dessa descoberta, no mesmo ano, o Brasil já possuía soro antipeçonha mono e polivalentes para uso médico. Após ter demonstrado a especificidade dos soros antiofídicos, e iniciado o preparo dos soros antibotrópico, anticrotálico e antilaquétrico, Vital Brazil verificou que o soro preparado por Calmette era incapaz de neutralizar a peçonha da elapídia *Bungarus fasciatus* e das viperídeas *Echis carinatus* e *Vípera russellii*, serpentes causadoras de acidentes na Índia. Vital Brazil foi, portanto, o introdutor da soroterapia antiofídica em bases realmente eficazes (BEZERRA, 2000).

Os soros antipeçonha brasileiros distribuídos pelo Ministério da Saúde são utilizados como único tratamento para envenenamentos de serpentes de um determinado gênero. São produzidos no Rio de Janeiro pelo Instituto Vital Brazil; em Belo Horizonte, pela Fundação Ezequiel Dias e em São Paulo, pelo Instituto Butantan e são gênero-específicos. Nos acidentes com serpentes do gênero *Laquesis* (surucucus) deve ser administrado o soro anti-laquétrico; nos acidentes pelo gênero *Bothrops* e *Bothropoides* (jararacas), o antibotrópico; nos acidentes por *Crotalus* (cascavéis), o anti-crotálico; e nos acidentes por serpentes da família Elapidae (corais), o anti-elapídico (BEZERRA, 2000).

A diferença do poder neutralizante de um soro para serpentes de mesmo gênero e até mesmo de mesmas espécies provenientes de diferentes regiões geográficas tem sido extensamente relatada (OTERO *et al.*, 1997; BOGARIN *et al.*, 1999; BOGARIN *et al.*, 2000; MUNIZ *et al.*, 2000; SARAVIA *et al.*, 2001).

Bezerra (2000) ao estudar a neutralização pelo antiveneno comercial e monoespecífico contendo somente o *pool* de *B. erythromelas* frente ao veneno de *B. erythromelas* observou uma eficácia cerca de duas vezes maior pelo antiveneno

monoespecífico em relação ao comercial, em todas as atividades testadas. Neste trabalho, foi demonstrado que o soro antibotrópico monoespecífico foi mais efetivo que o antibotrópico comercial na neutralização das atividades testadas (letal, hemorrágica, necrosante, coagulante e fosfolipásica), na capacidade de formar imunocomplexos *in vitro* com a peçonha de *B. erythromelas* e no reconhecimento das proteínas separadas eletroforicamente.

Um estudo comparativo entre as peçonhas de *B. atrox* e *B. erythromelas* mostrou diferenças em seus efeitos letais e atividades coagulante, desfibrinante, hemorrágica e edematogênica e nos estudos de neutralização com heparina e soro antibotrópico (SAB). O SAB foi capaz de neutralizar 57% da atividade hemorrágica, 85,8% do edema e ofereceu apenas 58% de proteção contra a letalidade da peçonha de *B. erythromelas*, enquanto que para estes efeitos induzidos por *B. atrox* os valores percentuais de inibição foram 38%, 44,6%, 100%, respectivamente (BOECHAT *et al.*, 2001).

Em estudo realizado por Zamunér e colaboradores (2004) a atividade de bloqueio neuromuscular em aves promovida por peçonhas botrópicas (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*) mostrou proteção variável por meio de tratamento prévio com SAB, sugerindo que os componentes das peçonhas responsáveis por esta atividade podem diferir em potencia e em quantidade nas diferentes espécies. Nesse mesmo estudo, a peçonha de *B. erythromelas* foi a mais letal (0,55 mg/kg) e a de *B. jararacussu* (26,9 mg/kg) a menos letal. A extensão do dano muscular promovido pela peçonha de *B. jararacussu* foi de 98 a 100% da área total e esse efeito não foi neutralizado pelo SAB, apesar da presença da peçonha (12,5%) no *pool* utilizado na produção do soro antibotrópico comercial.

Castro Junior (2008) avaliou a potência do SAB e de um soro experimental contendo *pool* de *B. erythromelas* na neutralização de algumas atividades tóxicas desta peçonha em comparação com a peçonha de *B. jararaca*. O veneno de *B. erythromelas* apresentou atividade coagulante e fosfolipásica mais potentes que as observadas no veneno de *B. jararaca* e para a neutralização destas atividades foi necessário um volume significativamente menor com o soro experimental do que com o SAB comercial.

Considerando que a diversidade e abundância de proteínas presentes nos venenos é extremamente variável, a análise proteômica é uma ferramenta importante para o entendimento da complexidade dos venenos. Análises proteômicas de venenos de serpentes têm revelado aspectos importantes em relação à variabilidade da composição do veneno, seja ela interespecífica ou intraespecífica (FOX; SERRANO, 2008; CALVETE *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). Permite ainda, aliada a análise das proteínas e peptídeos transcritos pela glândula de veneno (transcriptoma) a identificação de modificações pós-

tradicionais, avaliação do processamento de precursores e de proteínas maduras, análises de filogenia molecular, entre outras (FOX; SERRANO, 2008; CIDADE *et al.*, 2006).

# **JUSTIFICATIVA**



### 3 JUSTIFICATIVA

Venenos de serpentes são compostos por uma mistura complexa de substâncias enzimáticas e não enzimáticas capazes de interferir em vários processos biológicos. Estes compostos são importantes nas funções primárias do veneno (imobilização, morte e digestão da presa) e nos efeitos locais e sistêmicos do acidente ofídico. O veneno botrópico provoca efeitos locais representados por dor, edema, podendo evoluir para sangramentos e necrose, e efeitos sistêmicos representados por sangramentos, alterações cardiovasculares e renais. Também pode provocar o aumento da pressão intracompartimental, podendo levar à necrose isquêmica, déficit na cicatrização das lesões e em alguns casos, amputação do membro. A fisiopatologia do envenenamento ofídico envolve uma série complexa de eventos que são dependentes de uma ação combinada dos componentes farmacologicamente ativos da peçonha, componentes estes que podem sofrer variação interespecie e intraespecie. Portanto, o conhecimento da composição proteica dos venenos através de estudos proteômicos permite a elucidação da patogênese do envenenamento e o direcionamento do tratamento da vítima, além de ser fonte de ferramentas farmacológicas.

A variabilidade de composição dos venenos entre as diferentes espécies ou na mesma espécie pode explicar os relatos clínicos na literatura muitas vezes conflitantes. Deste modo, o estudo proteômico das peçonhas de serpentes é essencial para um aprimoramento da soroterapia tradicional, principalmente no que diz respeito a um possível desenvolvimento regionalizado de soros anti-peçonha espécie-específicos, além de subsidiar novas ferramentas fisiológicas e farmacológicas.

Assim, o estudo dessas variações intraespecíficas na composição da peçonha ofídica, em especial da espécie de *Bothrops erythromelas* e avaliação do potencial neutralizante dos antivenenos comerciais é de suma importância já que esta espécie apesar de responsável pela maior parte dos acidentes ocorridos na região Nordeste, não faz parte do *pool* de venenos que é utilizado para produção do soro antiveneno.

## **OBJETIVOS**

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Estudar a variação intraespecífica da peçonha de *Bothrops erythromelas* a partir da caracterização proteômica e antivenômica de peçonhas obtidas de espécimes oriundas de diferentes regiões geográficas do Nordeste brasileiro, bem como avaliar a neutralização de atividade tóxica pelo soro antitoxinotrópico comercial.

### 4.2 Objetivos específicos

- Proceder à coleta dos espécimes nas diferentes regiões objeto de estudo e realizar a extração individual das peçonhas;
- Caracterizar o perfil proteômico de cada peçonha de *B. erythromelas* de cada subpopulação da região Nordeste;
- Analisar a reatividade entre soros antiveneno e os venenos das diferentes regiões de *B. erythromelas*;
- Estudar o perfil de neutralização da atividade hemorrágica local promovida pelo veneno de *B. erythromelas* frente a dois diferentes soros antiofídicos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Venenos e antivenenos

#### 5.1.1 Obtenção das peçonhas e coleta dos espécimes de *B. erythromelas*

Foram realizadas extrações de venenos de três a seis espécimes adultos de *B. erythromelas* (tamanho variando entre 44 a 85 cm) de oito cidades correspondentes a seis Estados, representados por cinco regiões geográficas principais, distando 200 km pelo menos uma da outra, da Região Nordeste - Brasil, como ilustrado na Figura 01. As regiões compreenderam: **Ceará:** Ceará (Icapuí; n=1, Caridade; n=1) e parte fronteira com o Rio Grande do Norte (Upanema; n=3), **Pernambuco:** Pernambuco (Inajá; n=6), **Juazeiro:** Bahia (Juazeiro; n=7), **Paraíba:** Paraíba (Sumé; n=1, São Jose da Mata; n=1) e parte fronteira com o Rio Grande do Norte (Currais Novos; n=1), **Ilha de Itaparica:** Bahia (Ilha de Itaparica; n=5) (Quadro 3 e Figura 4).

Os serpentários e/ou Laboratórios envolvidos neste trabalho compreenderam: Núcleo Regional de Ofiologia da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação da Prof. Dra. Diva Maria Borges-Nojosa, Laboratório de Animais Peçonhetos e Toxinas do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, sob a coordenação da Prof. Dra. Miriam Camargo Guarnieri, Centro de Conservação de Répteis da Caatinga (CCRC) na Paraíba, sob a coordenação da Prof. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna e o serpentário da Fundação Ezequiel Dias - FUNED, Belo Horizonte-MG, sob a coordenação da Consuelo Latorre Fortes Dias.

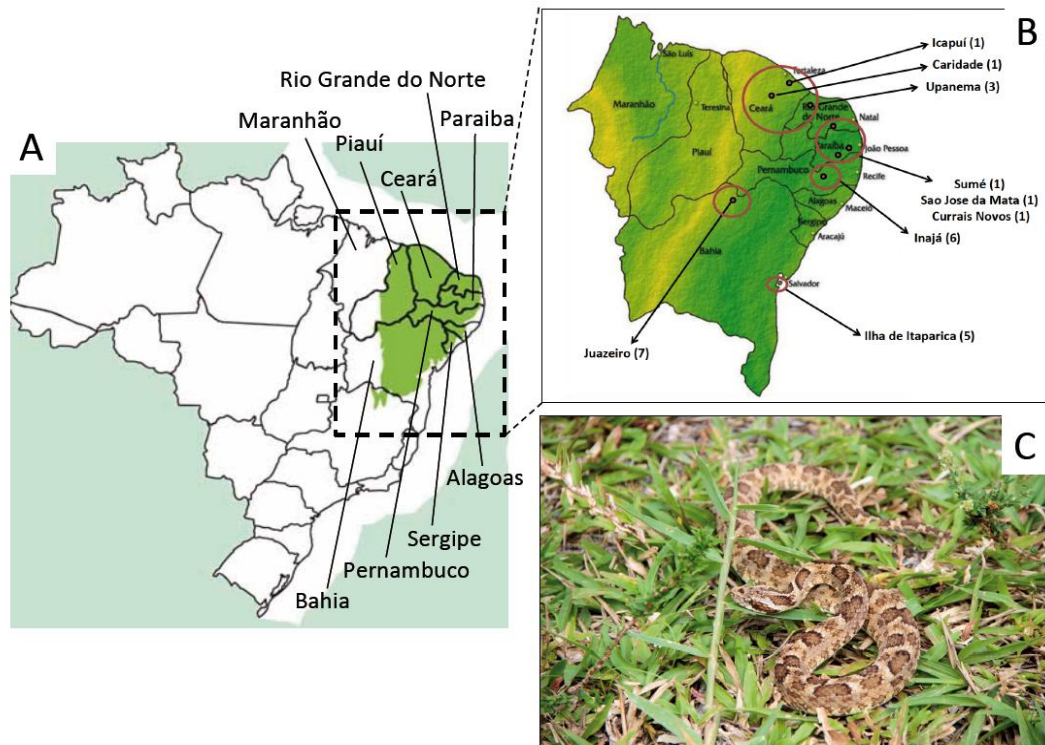
Os animais foram mantidos nas acomodações dos respectivos serpentários/laboratórios seguindo os cuidados necessários para manutenção dos mesmos em condição de cativeiro, estando todos devidamente regularizados pelos órgãos de fiscalização competentes.

As coletas de serpentes, quando necessárias, foram realizadas com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ, licença número 27617-2 sendo esta renovada para a licença 27617-3 com validade estendida para outubro de 2014 (ANEXO 1).

#### 5.1.2 Extração e armazenamento das peçonhas

As serpentes foram anestesiadas com auxílio de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) (BIASI, 1977). A peçonha de cada espécime foi extraída (figura 5), liofilizada e armazenada a -20°C de forma individual até o momento da utilização e ocorreram nos respectivos laboratórios e centros acima descritos.

**Figura 4** - Distribuição geográfica dos espécimes de *B. erythromelas* estudados.



(A) Destaque na região verde ocupada pela ecorregião da Caatinga (850, 000 km<sup>2</sup> de superfície), estendendo-se em oito Estados do Nordeste do Brasil (B) Localidades aproximadas da amostragem dos venenos de *B. erythromelas* estudados neste trabalho, com os respectivos números de amostras. (C) Imagem de *B. erythromelas* cedida generosamente por Miva Filho, Universidade Federal de Pernambuco.

**Figura 5** - Extração do veneno de *B. erythromelas* Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco.



Fonte: Miriam Camargo Guarnieri, 2013.

**Quadro 3** - Espécimes individuais de *B. erythromelas* de cada região estudada.

Região e número de registro	Cidade	Gênero	Tamanho (cm)
<b>Região 1: Ceará(CE) e Rio Grande do Norte (RGN)</b> Núcleo Regional de Ofiologia da Universidade Federal do Ceará			
Be 0703	Icapuí-CE	Macho	56,4
Be 0902	Upanema-RN	Fêmea	56,4
Be 0903	Upanema-RN	Macho	53,5
Be 1001	Upanema-RN	Fêmea	58,6
Be 1004	Caridade-CE	Fêmea	53,0
<b>Região 2: Pernambuco (PE)</b> Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da Universidade Federal de Pernambuco			
Be 571	Inajá- PE	Fêmea	57
Be 574	Inajá- PE	Fêmea	45
Be 576	Inajá- PE	Fêmea	64
Be 577	Inajá- PE	Fêmea	50
Be 578	Inajá- PE	Fêmea	55
Be 581	Inajá- PE	Fêmea	67
<b>Região 3: Bahia (BA) - (Juazeiro da Bahia)</b> Serpentário Cobra Viva			
Be 47	Juazeiro- BA	Fêmea	Não informado
Be 52	Juazeiro- BA	Fêmea	Não informado
Be 55	Juazeiro- BA	Fêmea	Não informado
Be 58	Juazeiro- BA	Fêmea	Não informado
Be 61	Juazeiro- BA	Fêmea	Não informado
Be 64	Juazeiro- BA	Fêmea	Não informado

Be 66	Juazeiro- BA	Fêmea	Não informado
<b>Região 4: Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RGN)</b> Centro de Conservação de Répteis da Caatinga (CCRC)			
Be 001	São José da Mata-PB	Fêmea	52
Be 002	Sumé-PB	Fêmea	44
Be 003	Currais Novos-RN	Macho	66,5
<b>Região 5: Bahia (BA) - (Ilha de Itaparica)</b> Serpentário da Fundação Ezequiel Dias - FUNED			
Be8822	Ilha de Itaparica- BA	Fêmea	72
Be 0401	Ilha de Itaparica- BA	Fêmea	82
Be 0402	Ilha de Itaparica- BA	Fêmea	85
Be 0403	Ilha de Itaparica- BA	Fêmea	78
Be 0404	Ilha de Itaparica- BA	Macho	60

### 5.1.3. Antivenenos

O antiveneno utilizado para os ensaios de antivenômica e para a neutralização da atividade hemorrágica correspondem ao soro comercial antibotrópico pentavalente (SAB) produzido pelo Instituto Vital Brazil – Niterói – Brasil e ao soro polivalente do Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica, este último contendo uma mistura de partes iguais dos venenos das serpentes costarriquenhas *Bothrops asper*, *Crotalus durissus durissus* e *Lachesis muta stenophrys* (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988). No que se refere ao protocolo do *pool* de imunização para produção do soro antibotrópico no Brasil utiliza as seguintes espécies e suas respectivas proporções: *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu* (12,5%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%), *Bothrops alternatus* (12,5%) e *Bothrops moojeni* (12,5%) (Raw *et al.*, 1991).

### 5.1.4. Análise eletroforética Bidimensional

Previamente ao estudo proteômico realizou-se a análise eletroforética bidimensional (2D-PAGE) para as cinco populações de venenos de *B. erythromelas* e tornar possível uma visão geral e comparação inicial das características das proteínas. Esta técnica consiste na separação de proteínas baseada em duas importantes propriedades, carga elétrica e massa molecular. Na primeira dimensão (Focalização isoelétrica) a separação ocorre com base na carga elétrica da proteína. Nesta etapa, a amostra é submetida a uma migração eletroforética em fita de gel contendo um gradiente de pH. Assim, as proteínas migram horizontalmente no gel até chegarem ao pH em que sua carga líquida seja zero (ponto



Isoelétrico) (Berg *et al.*, 2002). Após a focalização isoelétrica (FI) concluída, ou seja, as proteínas tiverem focalizado em seus respectivos pIs, a primeira dimensão é concluída. Na segunda etapa, a fita resultante da primeira dimensão é submetida à tradicional Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) para uma segunda separação das proteínas, agora pela diferença no peso molecular das moléculas.

O protocolo foi realizado essencialmente de acordo com as instruções do fabricante do (GE Healthcare Amersham Biosciences). Para a focalização isoelétrica (IEF), aproximadamente 150 µg cada um dos cinco pools de veneno foi dissolvido em uréia 7 M, tiuréia 2M, CHAPS 4%, DTT 40 mM e 0,5% IPG Buffer pH 3-10 e aplicou-se gradientes lineares de pH imobilizado (IPG) das tiras/fitas de 7 cm cada (anteriormente rehidratadas). A focalização isoelétrica foi realizada a temperatura constante de 20° C no sistema de focagem isoelétrica Ettan IPGphor com as seguintes condições: 300V (0,5 hora), aumentando a 1000 V (0,5 h) e para 5000 após 1,3 h, até seguir-se a 5000 V por 0,5 horas. Depois da FI, as tiras de IPG foram mantidos a -70 ° C até à sua utilização. Para a segunda dimensão (SDS-PAGE) os IPGs foram equilibrados durante 15 min com agitação suave à temperatura ambiente em tampão de equilíbrio (6 M de ureia, 2% [w / v] de SDS, 30% [v / v] de glicerol, 75 mM de Tris-HCl [pH 8,8]). Tiras de IPG foram então colocadas em cima de um gel de poliacralamida SDS-15%. A corrida foi executada em um sistema de eletroforese Protean II (Bio-Rad) e a temperatura ambiente. Os spots das proteínas foram visualizados por coloração com Azul Brilhante de Coomassie G250.

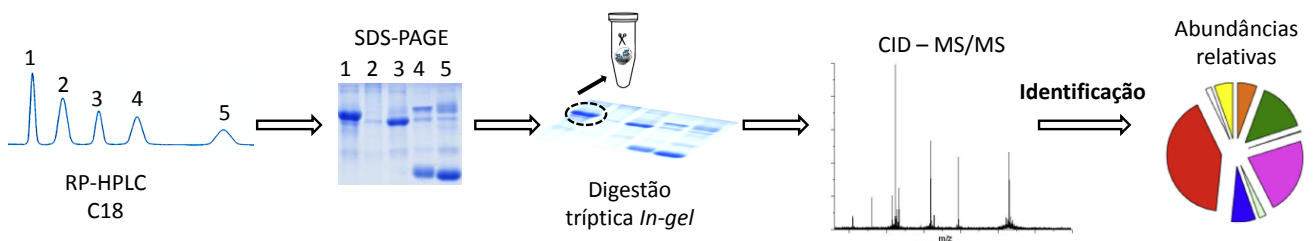
## 5.2. Caracterização dos venenos: Venômica

Os estudos de venômica e antivenômica tiveram local de desenvolvimento no Instituto de Biomedicina de Valencia, sob supervisão do Prof Dr. Juan José Calvete como parte da realização do Doutorado *sanduche* financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O envio dos venenos *B.erythromelas* até o referido local de estudo foi possível através da emissão de uma licença de transporte em nome do pesquisador (ANEXO 2).

A abordagem utilizada para realizar a caracterização proteômica do veneno de *Bothrops erythromelas* se enquadra na metodologia já bem descrita e reproduzida para proteômica de venenos, que é a venômica (Calvete *et al.*, 2007, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2009; Calvete, 2010, 2011). A sequência metodológica utilizada na venômica consiste, de maneira geral, no fracionamento e recuperação do veneno bruto numa cromatografia de fase reversa

(RP-HPLC), seguida de análise dos picos cromatográficos por SDS-PAGE, digestão *in gel* das bandas de interesse e sua posterior identificação por espectrometria de massas. As frações cromatográficas de baixo peso molecular ( $m/z \leq 1700$ ) foram analisadas diretamente por LC-MS/MS. A obtenção de espectros provenientes de CID-MS/MS permite a identificação, a nível de família de proteínas, das bandas referentes a toxinas visualizadas e digeridas a partir do gel de poliacrilamida e das frações de baixo peso. Uma vez identificadas, as toxinas podem ter sua abundância relativa estimada no veneno (Figura 6).

Figura 6 - Sequência metodológica da venômica:



o veneno bruto é fracionado por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC); as frações provenientes da cromatografia são submetidas a SDS-PAGE; digestão tríplica das bandas de proteína de interesse; identificação dos peptídeos tríplicos e naturais por CID - MS/MS; análise dos resultados por interpretação manual ou uso de plataformas de busca frente aos banco de dados, assinalando a família de proteína da amostra; estimação do perfil geral de toxinas expressada como porcentagem total das proteínas do veneno. FONTE: GONÇALVES-MACHADO, 2014.

### 5.2.1 Cromatografia de Fase Reversa (RP-HPLC)

Primeiramente foram efetuados cromatogramas referentes aos espécimes individuais de cada região (26 espécimes) para que o *pool* fosse validado como representativo de cada população utilizando 200  $\mu\text{g}$  de veneno de cada individuo. As amostras foram ressuspensas e centrifugadas utilizando o microinjetor automático. As corridas foram realizadas utilizando uma coluna Discovery® BIO Wide Pore C18 (15 cm x 2.1 mm, 3  $\mu\text{m}$  particle size, 300 Å pore size) nas seguintes condições: isocraticamente 5% B por 1 min, seguido por 5-25% B por 5 min, 25-45% B por 35 min, e 45-70% por 5 min, com as mesmas soluções e o mesmo sistema de alta pressão utilizados para as análises dos *pools*.

Para análise cromatográfica dos *pools* de cada população de *Bothrops erythromelas* foram utilizados 2 a 2,2 mg de veneno, ressuspensos em 190  $\mu\text{l}$  de solução de acetonitrila (ACN) 5% + 0,1% de Ácido Trifluoroacético (TFA). Em alguns casos houve o

acréscimo de 5 µl de Ácido Fórmico a 70%, dependendo da solubilidade da amostra. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 min para eliminação de possíveis *debris* antes de serem injetadas manualmente no sistema. A coluna utilizada para as corridas cromatográficas dos *pools* foi uma Teknokroma Europa C18 (0.4 cm × 25 cm, 5 mm particle size, 300 Å pore size) no sistema de gradiente de alta pressão Agilent LC 1100 equipado com detector DAD e micro-autoinjeção. A taxa de fluxo foi setada para 1 ml/min e os experimentos foram executados em gradiente linear de 0,1% TFA em água (solução A) e 0,1% de TFA em acetonitrila (solução B) nas seguintes condições: isocraticamente 5% B por 5 min, seguido de 5-25% B por 10 min, 25-45% B por 60 min e 45-70%B por 10 min. A detecção dos picos foi monitorada a 215 nm (com referência de comprimento de onda de 400 nm). Os picos foram coletados manualmente, secos em uma centrífuga a vácuo (Savant) e posteriormente ressuspensos em água mili-Q para submissão das frações ao SDS-PAGE

### 5.3.2 - SDS-PAGE e digestão *in gel*

As frações provenientes do RP-HPLC, após terem sido secas em centrífuga a vácuo (SPD SpeedVac®, ThermoSavant) foram devidamente ressuspensas de acordo com a proporção de cada pico (isto é, as frações não foram ressuspensas nos mesmos volumes. Cada uma foi ressuspensa de acordo com a área do seu pico, a fim de alcançar de maneira aproximada uma proporção mais homogênea da concentração final de cada uma). As amostras de cada fração foram preparadas nas seguintes condições: 10 µL de amostra + 2 µL de tampão de amostra reduzido (200 mM Tris-HCl pH 6.8 + 6% SDS + 0.05% Azul de Bromofenol + 36% glicerol + 5% β-mercaptoethanol, 6X) ou não reduzido (200 mM Tris-HCl pH 6.8 + 6% SDS + 0.05% Azul de Bromofenol + 36% glicerol 6X). Nas amostras que apresentaram, de acordo com o indicador azul de bromofenol, uma coloração visual de pH abaixo da faixa desejável (pH do gel de corrida) foram adicionados de 1–3 µL de tampão Tris 1.5 M pH 8.8 até que a amostra apresentasse uma coloração arroxeada indicativa do pH ideal para corrida. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100 °C em um Thermoblock. As frações foram então submetidas à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), utilizando o sistema Mini-PROTEAN® da Bio Rad em um sistema descontínuo de géis de poliacrilamida de 0.75 mm (gel de stacking 4% e gel de corrida 15%, a partir de solução de 30% acrilamida/bis-acrilamida, 3,3% de cross-linker) na presença do tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3) e voltagem de 80 V nos primeiros 20 min, seguidos de 110 V até o final da corrida eletroforética. Após três lavagens de 5 min com água

destilada, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (G250) (0.05 mg/ml de Coomassie em água destilada + 0.15% de HCl 12 N) *overnight* sob agitação constante à temperatura ambiente. Os géis foram descorados por sucessivas lavagens com água destilada até que se eliminasse satisfatoriamente a coloração de fundo.

As bandas de interesse foram excisadas dos géis e posteriormente reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina em um digestor automático (Genomics Solution ProGest Protein Digestion Workstation) seguindo as instruções do fabricante (redução com 10 mM de DTT, alquilação com 50 mM de iodoacetamida, digestão *overnight* com 0,25 µg de tripsina por amostra em 25 mM de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila). Os produtos da digestão também foram secos em centrífuga a vácuo e posteriormente ressuspensos em 0,1% de ácido fórmico para análise de LC-MS/MS.

### 5.3.3 – Espectrometria de Massas

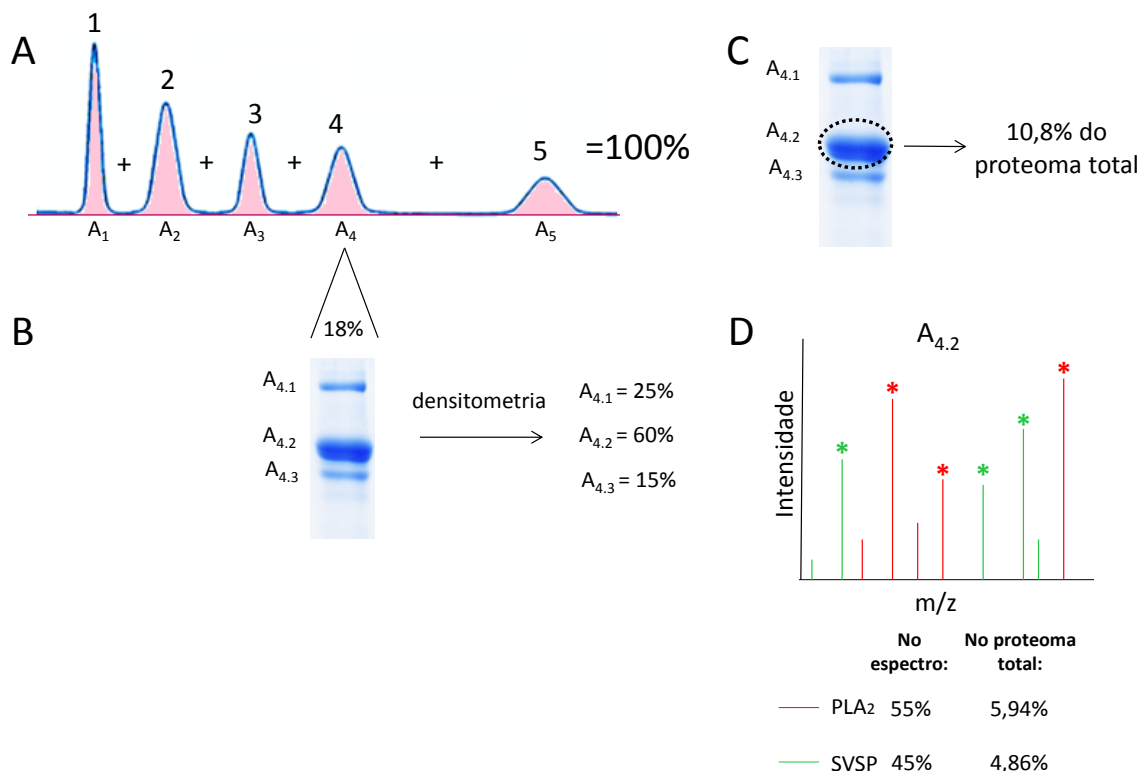
Os peptídeos trípticos foram separados em uma coluna de ultra performance (nano-Acquity LC® UPLC® com coluna BEH130 C18, 100 µm x 100 mm, 1.7 µm de tamanho de partícula) acoplada a um sistema de espectrometria de massas de alta definição (Waters SYNAPT G2). O fluxo da ultracromatografia foi setado para 0.6 µl/min nas seguintes condições: isocraticamente 1% B, seguido por 1-12% B por 15 min, 40-85% B por 2 min, utilizando as soluções 0,1% de ácido fórmico (solução A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solução B).

Os íons de carga +2 ou +3 foram selecionados e submetidos a CID-MS/MS para fragmentação e posterior elucidação da sequência. Os espectros adquiridos foram interpretados manualmente ou utilizando a plataforma online MASCOT em <http://www.matrixscience.com> (Mascot database search > Access Mascot Server > MS/MS Ions Search) com busca na base de dados do SwissProt ou NCBI e taxonomia de busca dentro do grupo “bony vertebrates”. Os parâmetros setados para a busca foram:  $\pm 0,6$  Da de tolerância de massa; carbamidometilação dos resíduos de cisteína como modificação fixa; oxidação da metionina como modificação variável. Os sequenciamentos *de novo* (manuais) foram identificados submetendo as sequências encontradas à busca nos bancos de dados disponíveis através do programa BLAST em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Serpentes taxid:8570).

### 5.3.4 – Quantificação da abundância relativa das toxinas

A obtenção de espectros provenientes de CID- MS/MS permite a identificação das amostras analisadas a nível de família de proteínas. Uma vez identificadas, as toxinas podem ter sua abundância relativa estimada no veneno a partir da soma das porcentagens das áreas dos picos dos cromatogramas (Agilent ChemStation software), seguida pelo cálculo da contribuição de cada banda dentro de cada fração por densitometria dos géis de poliacrilamida (MetaMorph software, MDS Analytical Technologies) (Calvete, 2011). Se mais de uma família de proteína for identificada em uma mesma banda, a quantificação é baseada na intensidade dos picos no espectro de massas. Para cada grupo de toxina, extrai-se a média da intensidade dos três picos mais intensos. As médias são somadas e o valor da soma é normalizado para 100% e posteriormente dividido entre elas, dando um valor percentual para cada grupo (Figura 7).

Figura 7 - Quantificação da abundância relativa das famílias de toxinas presentes no veneno total.



Cálculo da porcentagem das áreas de cada pico do cromatograma (A). Cálculo da porcentagem que cada banda representa dentro de cada pico (B). De acordo com a porcentagem de cada banda e de seu respectivo pico, cálculo da porcentagem de cada banda em relação ao veneno total (C). Nos casos em que mais de uma família de proteína é identificada em uma mesma banda, a quantificação é feita por Label-free MS, levando-se em consideração a intensidade média dos três íons mais intensos de cada grupo (asteriscos). As médias de intensidade de cada família são somadas (100%) e o valor total é dividido novamente entre elas. O valor percentual de cada família de toxina é então dividido entre a porcentagem da banda (D). FONTE: GONÇALVES-MACHADO, 2014.

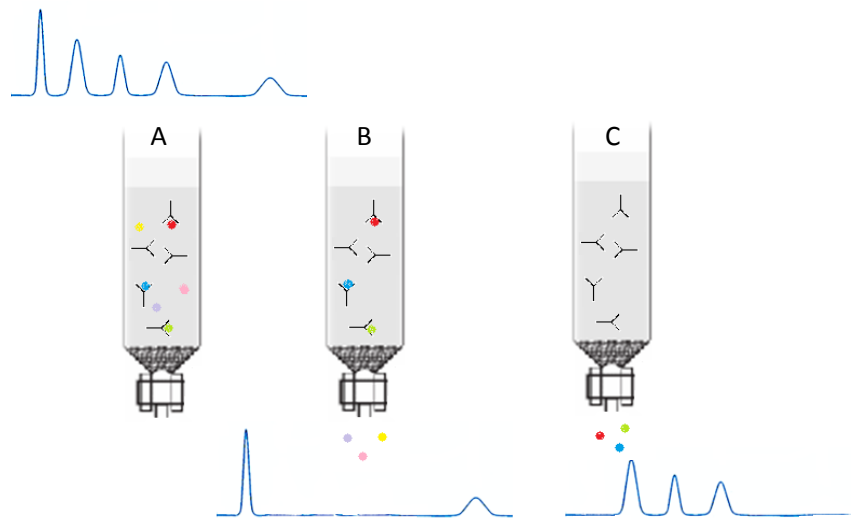
### 5.3 – Antivenômica

A antivenômica é um ensaio que tem como objetivo avaliar *in vitro* a imunorreatividade de um veneno e um antiveneno (soro antiofídico). De maneira geral, os anticorpos do antiveneno são imobilizados para compor a coluna de imunoafinidade (e, portanto essa coluna pode ser reutilizada), onde posteriormente o veneno de interesse é carregado e incubado à fim de que ocorram os possíveis reconhecimentos entre antígenos e anticorpos. O que não fica retido na coluna, à princípio não foi reconhecido por nenhum anticorpo ou possui baixa afinidade, e portanto corresponde a toxinas não neutralizadas eficientemente pelo antiveneno. A fração eluída em pH ácido, por sua vez, corresponde às toxinas reconhecidas pelo antiveneno. Ambas as frações, retida e não retida, passam por uma cromatografia de fase reversa, o que assinala os picos reconhecidos ou não pelo antiveneno (PLA *et al.*, 2012). Essa metodologia apresenta diversas vantagens em relação às clássicas de imunorreatividade, como Western Blot e ELISA, pois é possível não só a obtenção de um resultado qualitativo do tipo “tudo-ou-nada” como alcançar dados quantitativos, além de eliminar os artefatos que podem ocorrer utilizando-se as outras técnicas.

Os ensaios de antivenômica foram realizados como descrito em Pla *et al.*, 2012 com algumas modificações. Seguem as etapas de preparo da coluna: 200 µL de matriz (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, Ge Healthcare) foram empacotados em um suporte de coluna e lavados com 15 volumes de tampão frio 1 mM HCl. Para equilibrar a coluna para a incubação com o antiveneno foram utilizados 2 volumes de tampão de acoplamento (0.2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8.3). Foram incubados 18 mg de cada antiveneno, dissolvidos em 300 µL do mesmo tampão de acoplamento, *overnight* a 4°C em um agitador orbital. O antiveneno não unido a matriz foi recuperado com mais 2 volumes de matriz de tampão de acoplamento e quantificado por densitometria (MetaMorph software, MDS Analytical Technologies) de SDS-PAGE, usando uma curva-padrão construída por quantidades conhecidas do antiveneno pré-incubado. A estimativa da quantidade da fração não unido a matriz foi feita pela subtração do valor inicial pelo não unido, dando um rendimento de 5,3 mg para o SAB e 16 mg para o BCL. Após o acoplamento, os grupos NHS-ativados que não reagiram foram bloqueados com 400 µL de 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 a 4°C, *overnight* usando agitador orbital. Para remover os resíduos de moléculas não unidas, a coluna foi lavada, alternando-se 6 vezes, 3 volumes de tampão ácido (0.1 M acetato de sódio, 0.5 M NaCl, pH 4,0-5,0) e 3 volumes de tampão básico (0.1 M Tris-HCl, pH 8,5).

Para o preparo das colunas de controle, da mesma maneira descrita para o SAB, foram acopladas IgGs séricas de cavalos não imunizados à matriz NHS-Sepharose (controle IgGs) com um rendimento de aproximadamente 8 mg. A coluna de controle de matriz foi feita pelo empacotamento de 200  $\mu\text{L}$  da matriz NHS-Sepharose, lavados com 15 volumes de tampão frio 1 mM HCl seguidos diretamente pelo bloqueio dos grupos NHS-ativados não reagidos com 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 a 4°C, *overnight*. As colunas controles foram incubadas com os venenos nas mesmas condições da coluna experimental a fim de acompanhar a especificidade da interação dos venenos com as colunas SAB e BCL

**Figura 8** - Etapas da incubação do veneno e a coluna de imunoafinidade:



O veneno bruto é incubado com a coluna (A); os componentes não retidos na coluna são lavados e recuperados (B); os componentes imunocapturados pela coluna são eluídos em pH ácido (C). Todas as frações e o veneno bruto contendo a mesma quantidade de inicial incubada são analisados por cromatografia de fase reversa. FONTE: GONÇALVES-MACHADO, 2014.

As colunas foram equilibrada com 5 volumes de PBS antes da incubação com 200  $\mu\text{g}$  do veneno de cada um dos pools das subpopulações de *Bothrops erythromelas* em  $\frac{1}{2}$  volume de matriz (razão veneno:antiveneno, 1:25 para a coluna SAB e 1:80 para coluna BCL). Os venenos foram incubados (Figura 8) por 3 horas à temperatura ambiente em agitador orbital. A fração não retida na coluna foi recuperada com mais dois volumes de PBS enquanto a fração retida foi eluída com 2,5 volumes de tampão 0.1 M glicina-HCl, pH 2.0. As frações eluídas foram imediatamente neutralizadas com tampão 1 M Tris-HCl, pH 9.0. A coluna foi armazenada em 20% de etanol e entre a incubação do veneno de uma região e outra foi regenerada com 3 ciclos de lavagem entre tampão ácido e básico como na etapa de

montagem da coluna. As frações não retida e eluída foram concentradas em centrífuga a vácuo (Savant) e injetadas com 40 µL por microinjeter automático no sistema de gradiente de alta pressão Agilent LC 1100. O fracionamento ocorreu utilizando-se uma coluna Dicovery® BIO WidePore C18 (15 cm x 2.1 mm, 3 µm particle size, 300 Å pore size) na presença de 0,1% TFA em água (solução A) e 0,1% de TFA em acetonitrila (solução B) nas seguintes condições de corrida: isocraticamente (5% B) por 1 min, seguido por 5-25% B por 5 min, 25-45% B por 35 min, e 45-70% por 5 min, com fluxo de 400 µL/min.

#### 5.4 Neutralização da atividade hemorrágica

O estudo de neutralização frente à atividade hemorrágica do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* foi realizada no Instituto Clodomiro Picado em colaboração com o Prof Dr. José Maria Gutiérrez e respeitados o protocolo de experimentação com animais.

Neste método, camundongos machos (n=4) da linhagem CD-1 tiveram seu dorso tricotomizado onde foi injetado por via intradérmica doses de concentrações variadas de uma das populações do veneno de *B. erythromelas*, dissolvidas em 100 µL de uma solução de PBS (NaCl 0,14M, phosphates 0,04M, pH:7,2). Controles negativos receberam apenas a solução de 100 µL de PBS. Duas horas após as injeções animais foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub>, as peles dorsais removidas e as superfícies internas foram examinadas e o diâmetro das lesões foram calculadas em mm. A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) foi estimada como a dose capaz de induzir área hemorrágica de 10 mm de diametro. Para o estudo de neutralização da atividade hemorrágica, 5 vezes o valor da DMH (25 µg) foi incubado com cada um dos antivenenos (SAB e BCL) com 250, 500 e 1000 correspondente às três proporções em µL de antiveneno / mg de veneno testados. Antes da injeção, as misturas contendo o veneno e os inibidores foram previamente incubadas por 30 min a 37 ° C.

Os resultados foram apresentados como média ± SEM. A significância das diferenças entre as médias foi avaliada por uma análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett, quando os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle. A hemorragia foi significativamente reduzida ou eliminada quando  $p \leq 0,05$ . Em relação aos dois antivenenos nas três razões de antiveneno / veneno.



## **RESULTADOS**

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Análise Eletroforética Bidimensional

A eletroforese bidimensional (2DE) de *B. erythromelas* venenos a partir de amostras recolhidas em cada uma das cinco ecoregiões da Caatinga mostraram padrões similares de proteínas distribuídas no intervalo de 14-95 kDa de massa molecular e pontos isoelétricos 4- 8,5 (Figura 9).

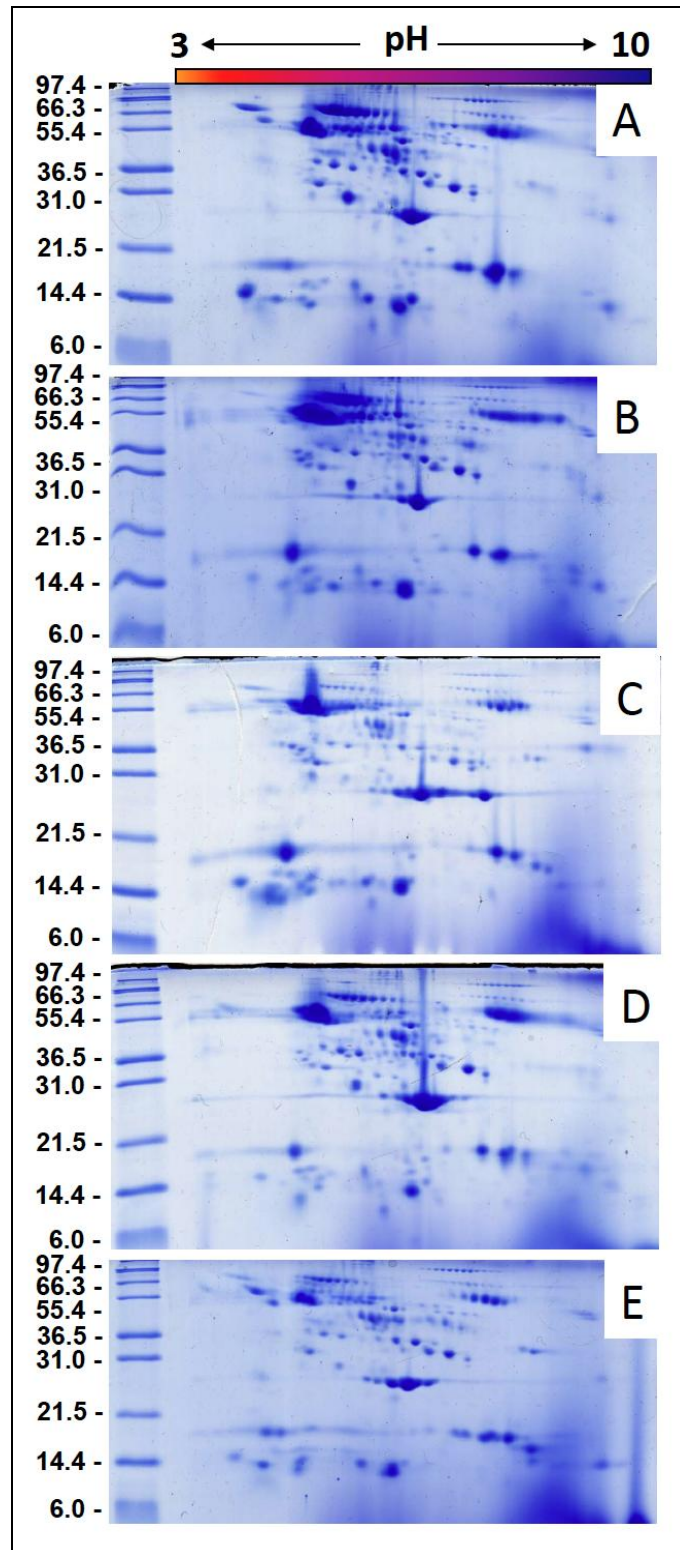
### 6.2 Cromatogramas individuais

O *pool* de cada população (Figuras 10-14) foi confirmado como representativo e apesar das pequenas diferenças individuais, os venenos parecem ser bastante conservados de acordo com sua distribuição geográfica. Partindo destas análises seguiu-se a realização de cromatogramas com *os pools* de cada uma das cinco populações.

### 6.3 Isolamento e Caracterização das proteínas do veneno

Trinta a quarenta frações foram recolhidas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC) (Figura 15 A-E). Cada fração cromatográfica coletada manualmente foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE) e as bandas de proteínas foram excisadas e submetidas à análise venomica (CALVETE, 2014). Os dados listados na Tabela 1, resultaram na identificação de aproximadamente 65 proteínas e 8 espécies de péptidos pertencentes a 12 famílias de proteínas de venenos serpentes, cuja ocorrência e abundância relativa de cada grupo veneno geográfica são exibidos na Figura 16 A-E.

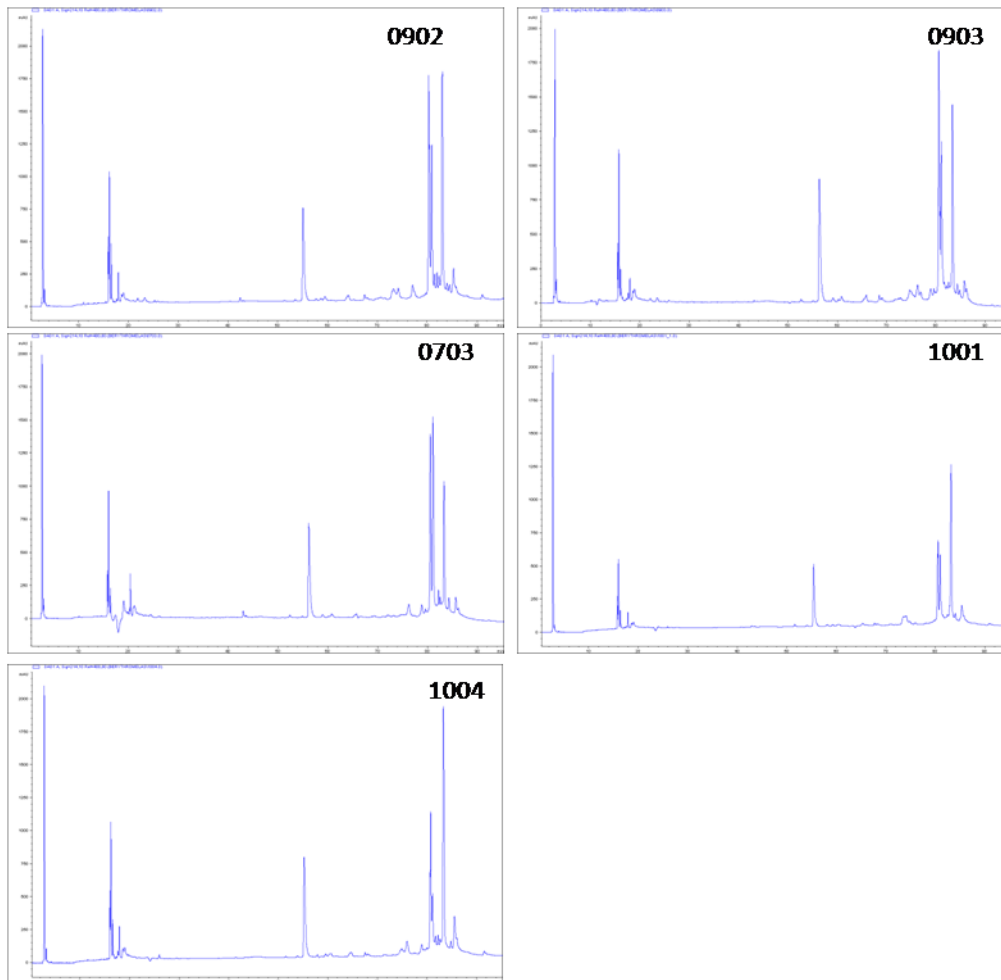
**Figura 9.** Análise eletroforética Bidimensional (A-E).



A figura mostra separações eletroforéticas bidimensionais das proteínas do veneno de *B. erythromelas* das cinco populações geográficas dentro da ecorregião Caatinga do Nordeste do Brasil: Ceará (A), Pernambuco (B),

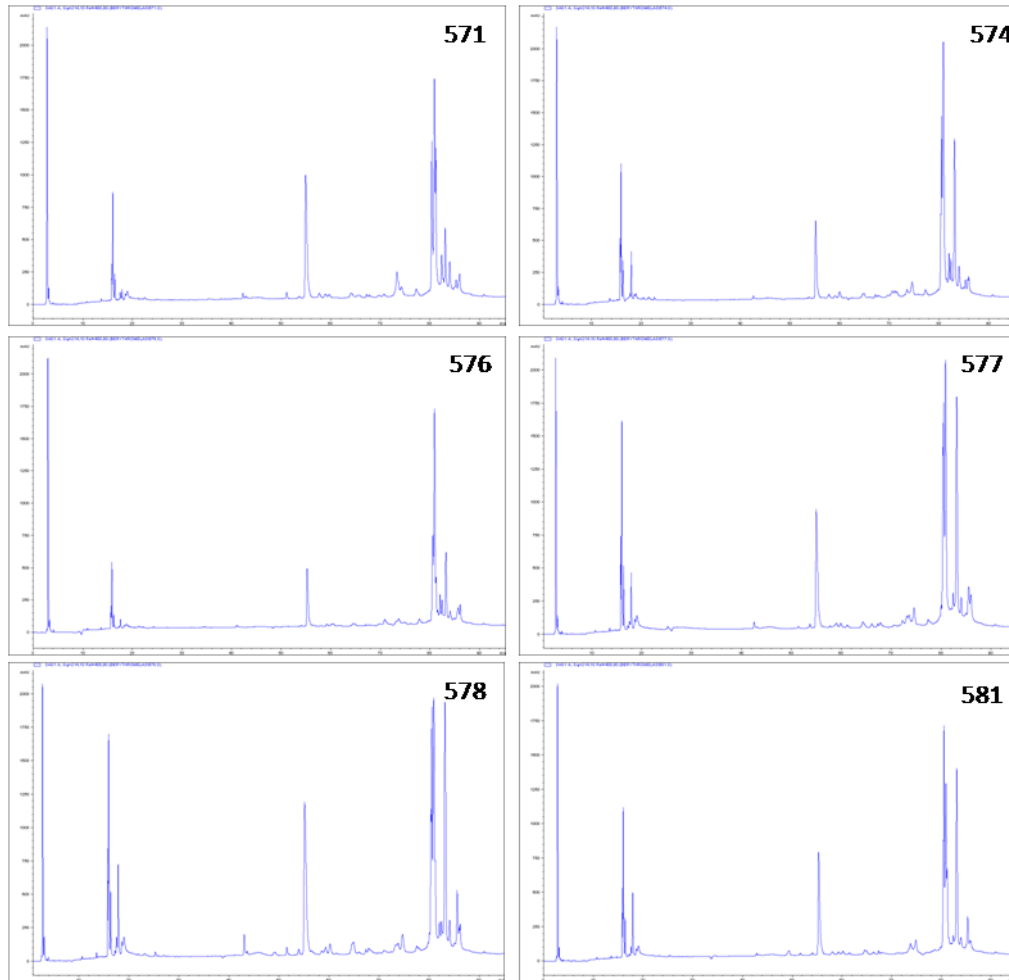
Juazeiro (C), Paraíba (D), e Ilha de Itaparica (E). Pontos isolétricos variando de 4 a 8,5 e pesos moleculares de 14 a 95 KDa.

**Figura 10** - Cromatogramas individuais da população do Ceará



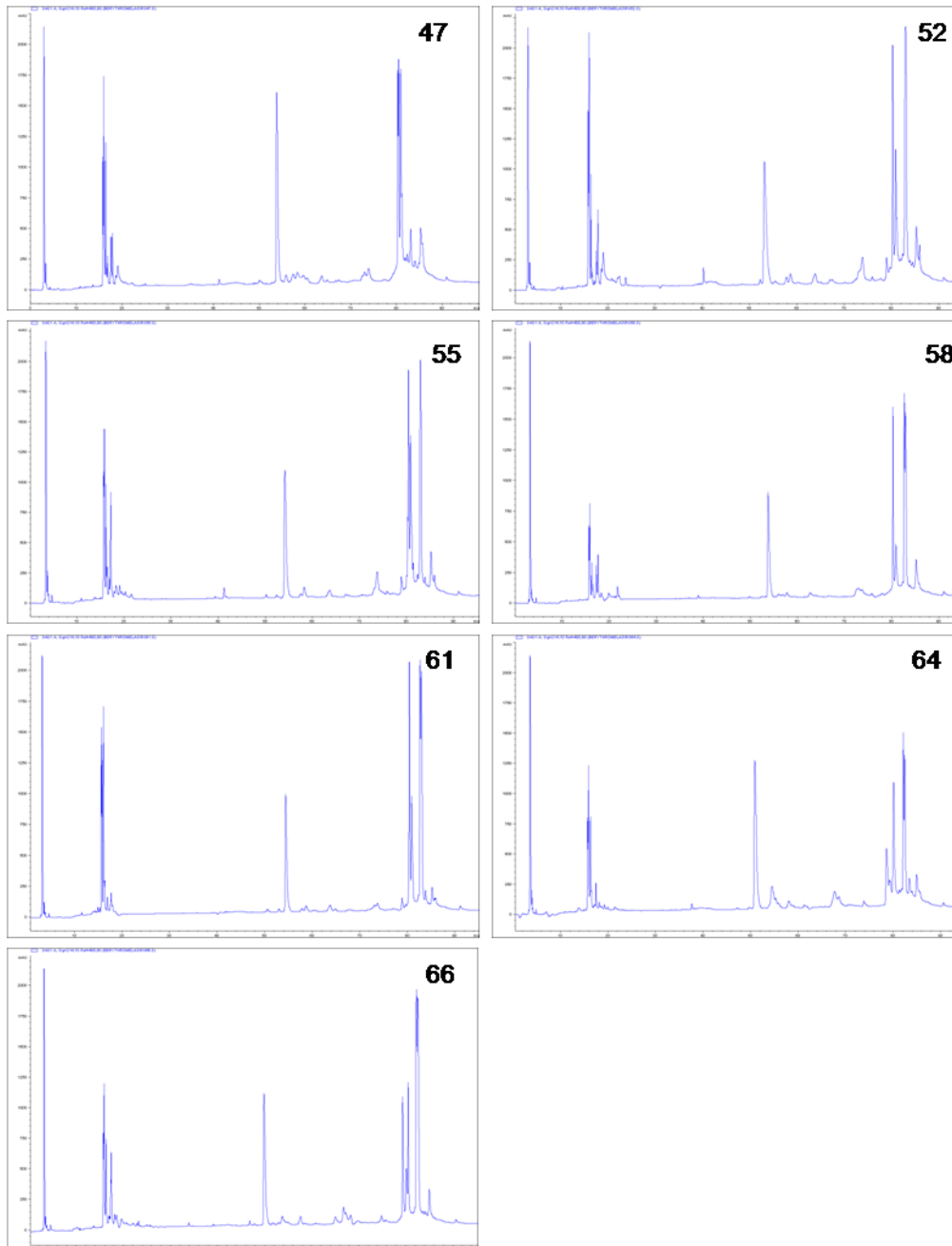
A figura 10 mostra os cromatogramas individuais da população de *B. erythromelas* do Ceará (cinco espécies). 0902, 0903 e 1001 provenientes de Upanema-RN. 0703 proveniente de Icapuí-CE e 1004 da cidade de Caridade-CE.

**Figura 11.** Cromatogramas individuais da população de *Bohtrops erythromelas* de Pernambuco



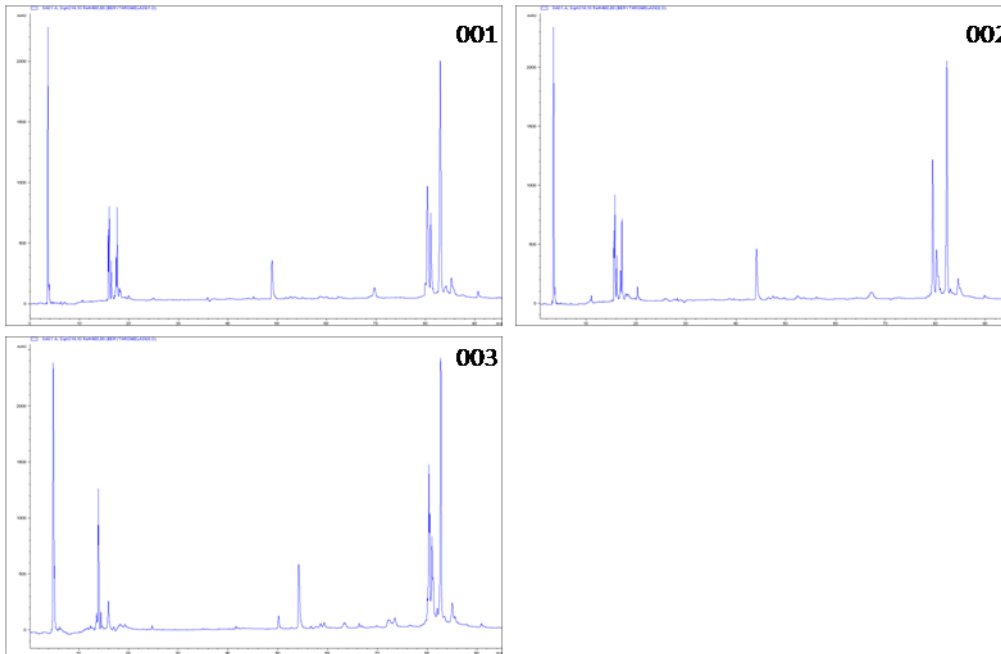
A figura 11 mostra os cromatogramas individuais da população de *B. erythromelas* de Pernambuco (seis espécies). 571, 574, 576, 577, 578 e 581: todos provenientes da cidade de Inajá-PE.

**Figura 12** - Cromatogramas individuais da população de *Bohtrops erythromelas* de Juazeiro



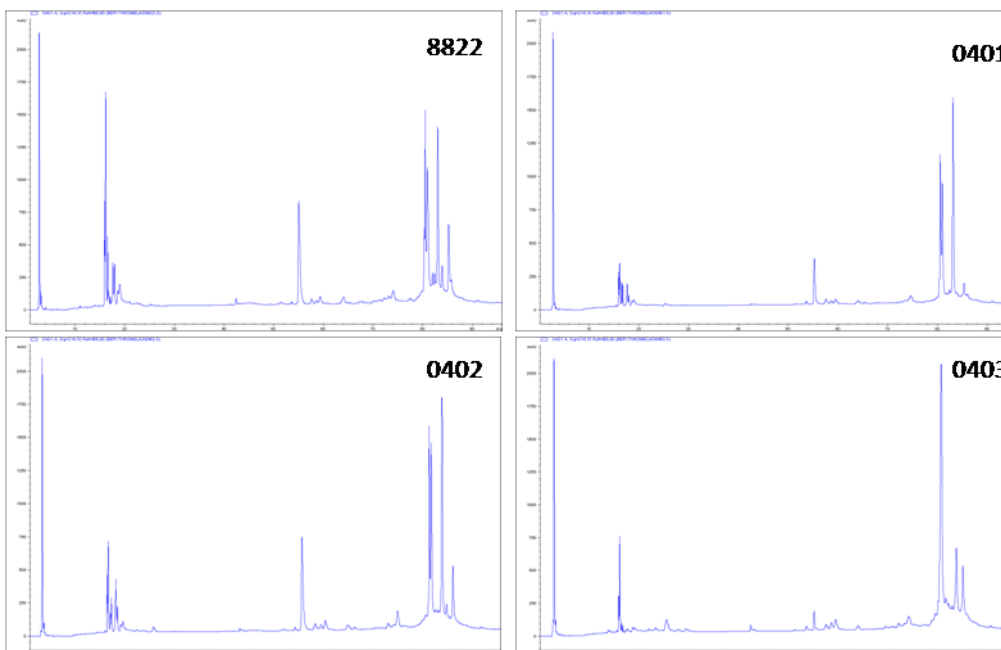
A figura 12 mostra os cromatogramas individuais da população de *B. erythromelas* de Juazeiro (sete espécies). 47, 52, 55, 58, 61, 64 e 66: todos provenientes da cidade de Juazeiro-BA.

**Figura 13** - Cromatogramas individuais da população de *Bohtrops erythromelas* da Paraíba

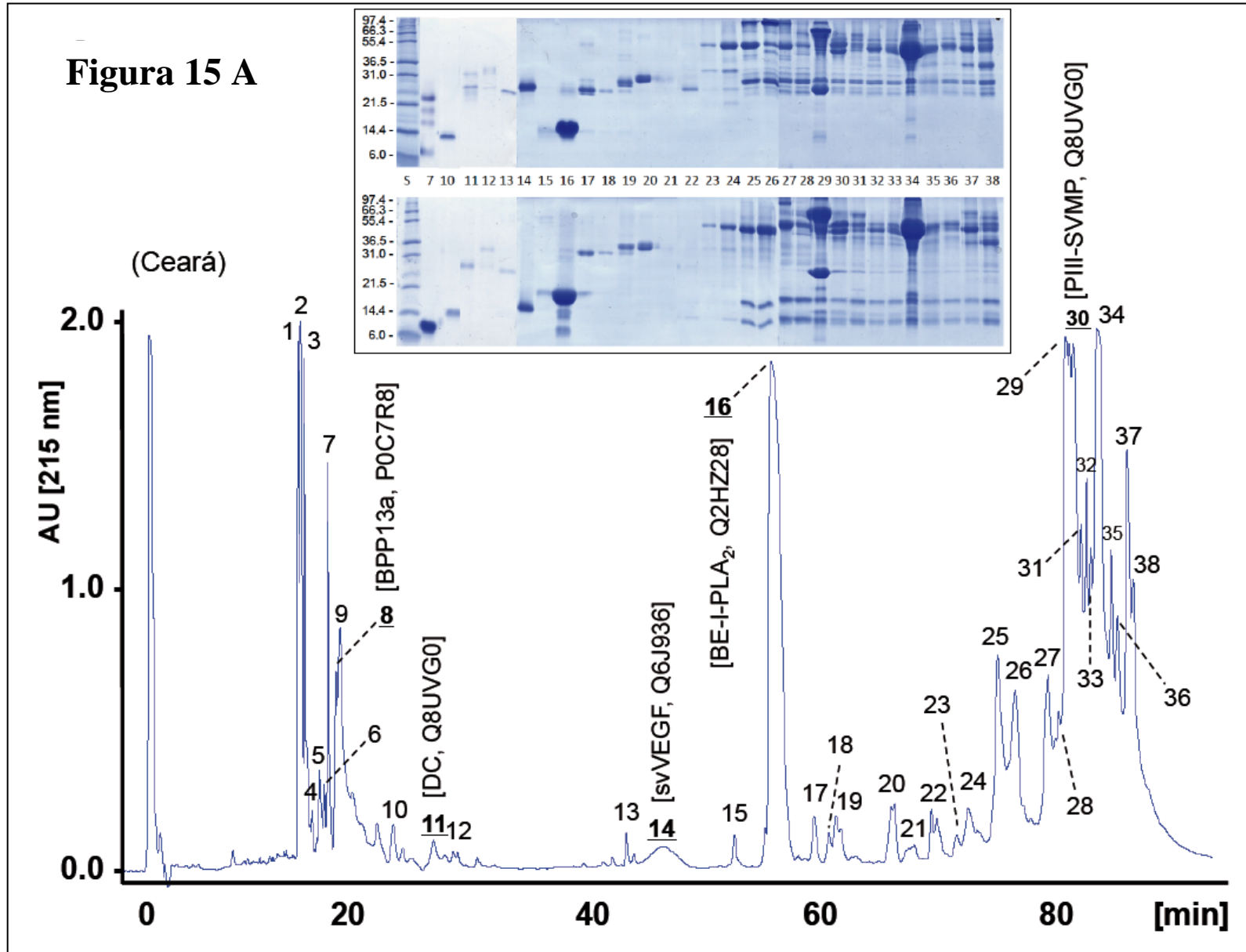


A figura 13 mostra os cromatogramas individuais da população de *B. erythromelas* da Paraíba (três espécies). 001 proveniente de São José da Mata-PB, 002 de Sumé-PB e 003 de Currais Novos-RN.

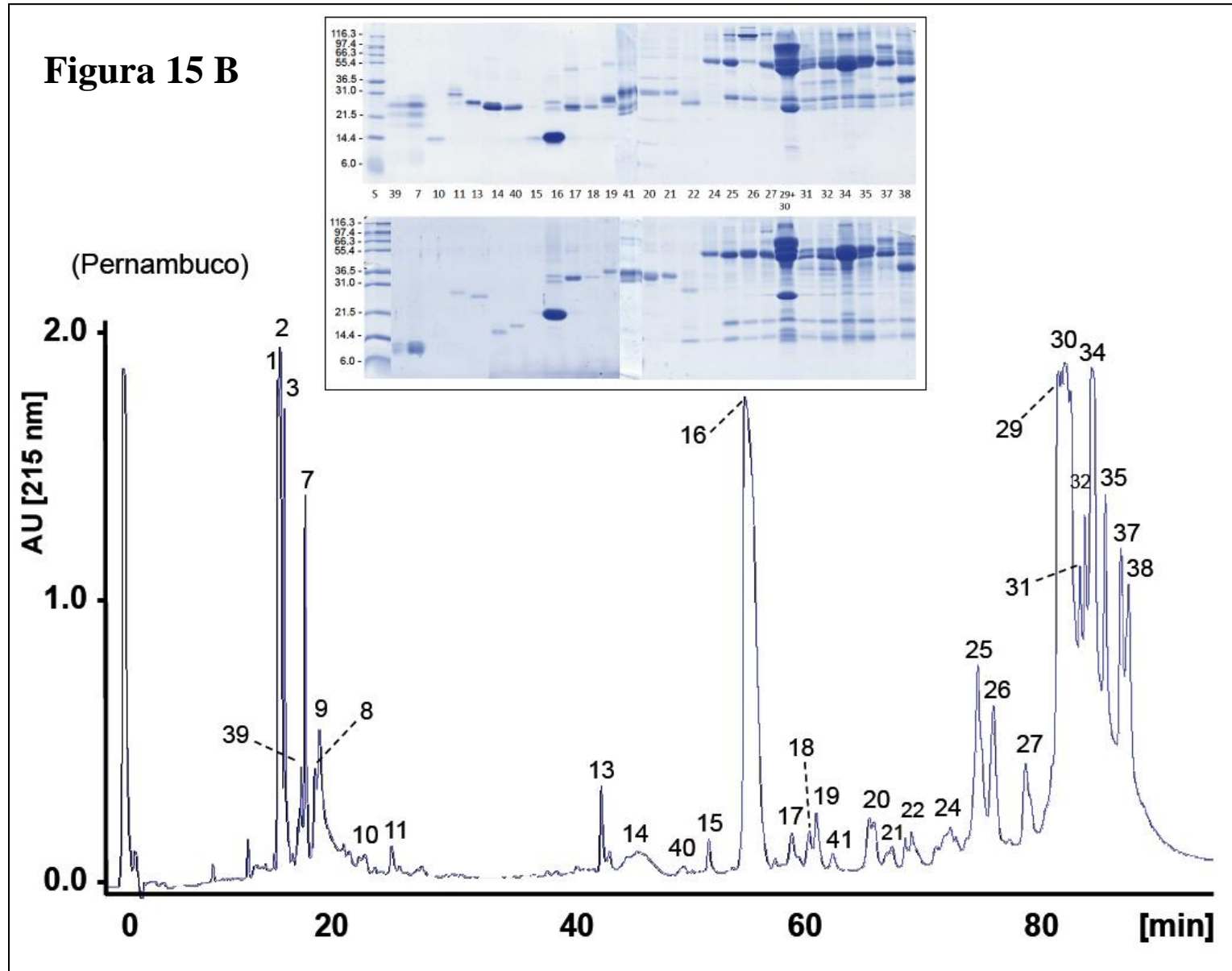
**Figura 14** - Cromatogramas individuais da população *Bohtrops erythromelas* da Ilha de Itaparica



A figura 14 mostra os cromatogramas individuais da população de *B. erythromelas* da Ilha de Itaparica (quatro espécies). 8822, 0401, 0402 e 0403: todos provenientes da Ilha de Itaparica- BA.







**Figura 15 C**

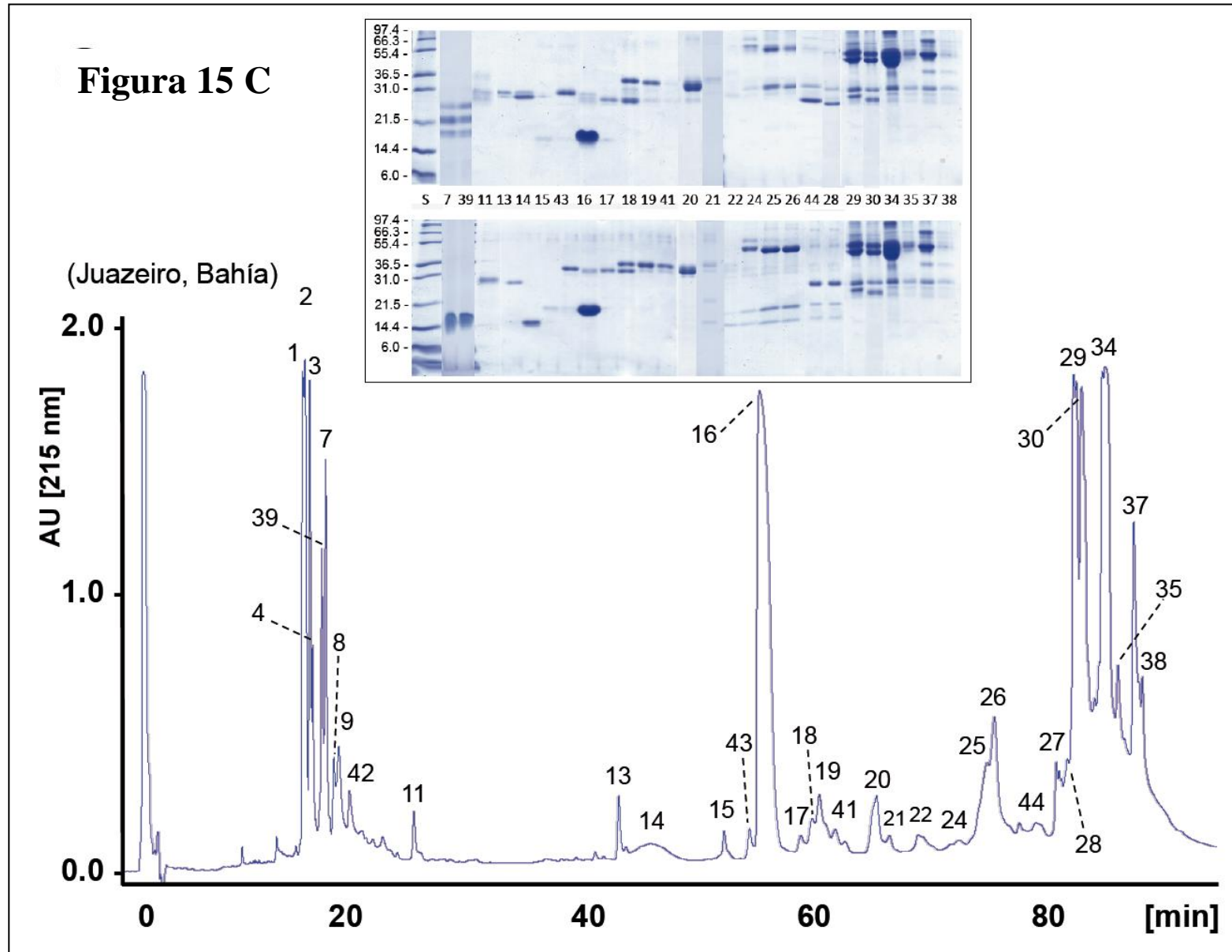
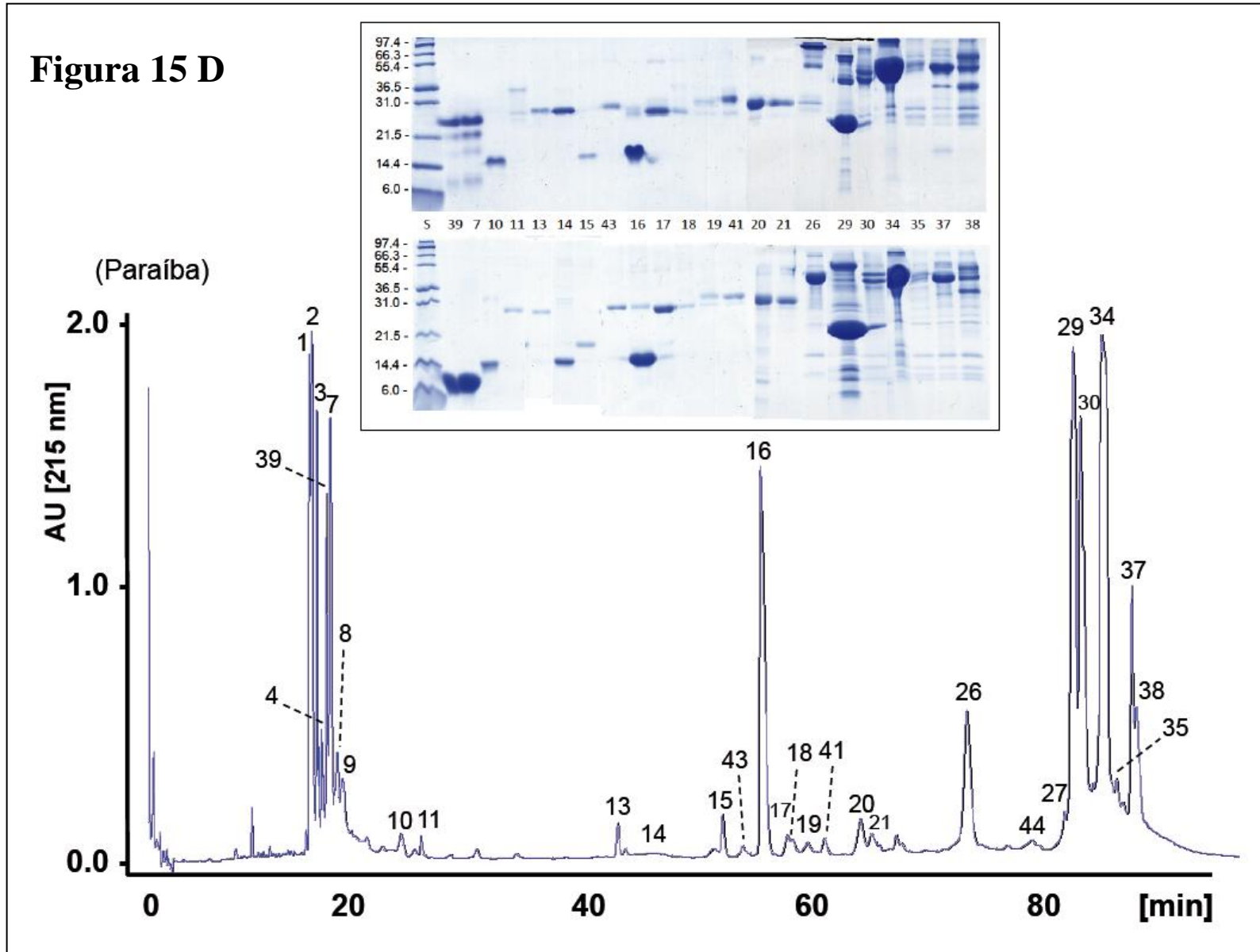
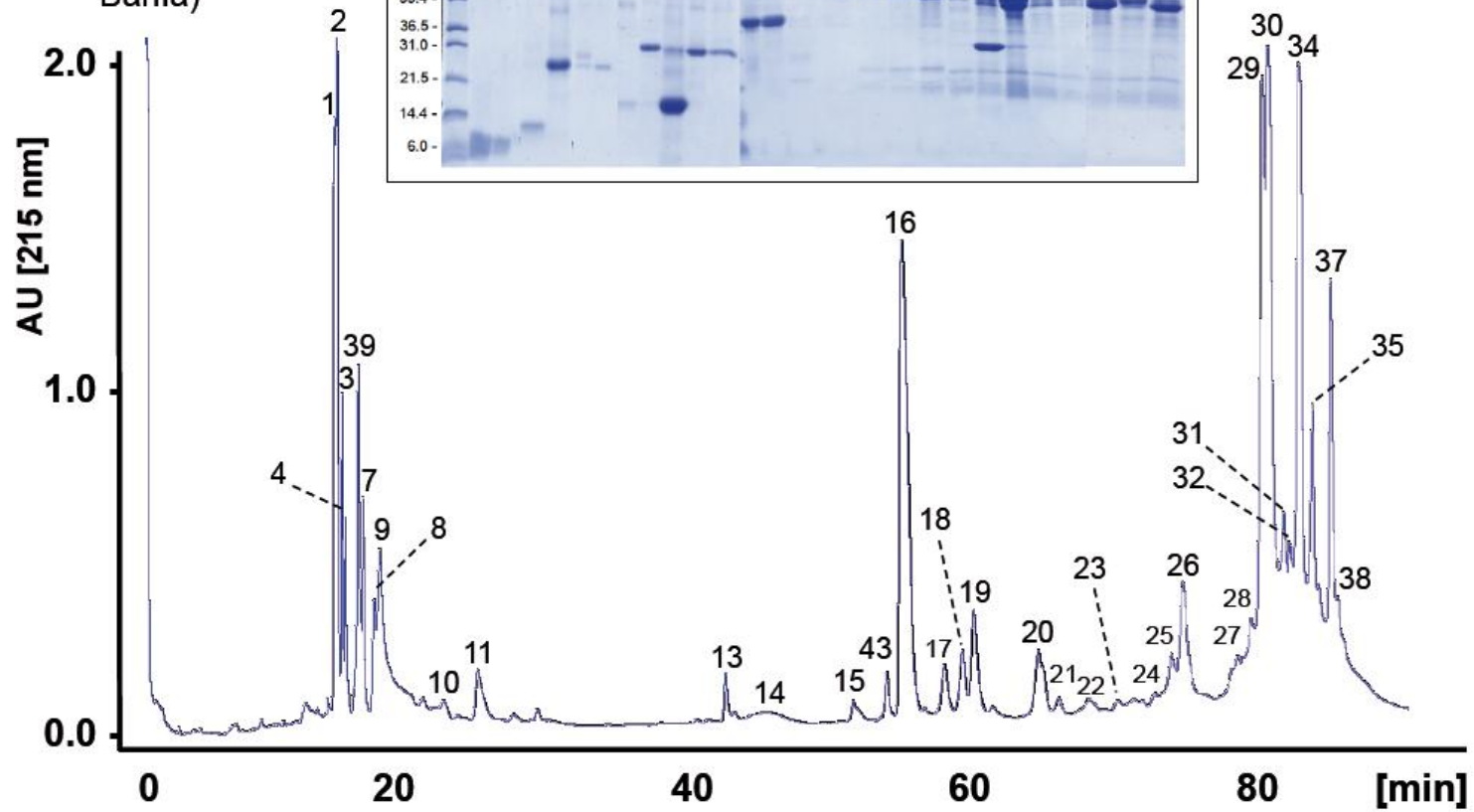


Figura 15 D



**Figura 15 E**

(Ilha de Itaparica,  
Bahía)



A figura 15 mostra os painéis de visualização A-E dos pools das proteínas de venenos de *B. erythromelas* do Ceará (A), Pernambuco (B), Juazeiro (C), Paraíba (D), e Ilha de Itaparica (E). As frações foram recolhidas manualmente e analisadas por SDS-PAGE (inserções) em condições não reduzidas (painéis superiores) e reduzidas (painéis inferiores). As bandas de proteína foram excisadas e caracterizadas por LC-nESI-MS/MS dissociação induzida por colisão de íons peptídicos dupla ou triplamente carregados (Tabela 1). Os números dos picos que contém proteínas do veneno de *B. erythromelas* já descritas na literatura são destacados em negrito e os códigos do banco de acesso UniProtKB são indicados na figura 15A correspondente a população do Ceará.

**Tabela 1**

Identificação das frações de fase reversa do veneno das populações *Bothrops erythromelas* do Ceará (CE), Pernambuco (PE), Juazeiro (JUA), Paraíba (PB), e Ilha de Itaparica (IT), para famílias de proteínas por nESI-MS/MS colisão induzida por dissociação dos íons dos peptídeos obtidos pela digestão de bandas protéicas separadas por SDS-PAGE. X = Ile ou Leu; Mox, sulfóxido de metionina. Os resíduos de cisteína são carbamidometilado. Massas moleculares aparentes (MW em kDa) foram estimadas por SDS-PAGE de amostras não reduzido (■) e reduzido por beta-mercaptoetanol-reduzido (▼). As massas de proteínas selecionadas determinados por ESI-MS estão em Da (fração 7 e 16). BPP: peptídeo potenciador de bradicinina; Disi, desintegrina; DC, desintegrina-símile e domínios ricos em cisteína; svVEGF: fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente; SerProt: serinoproteinase; PLA2: fosfolipase A2; (PI-, PII-, PIII-) SMVP: metaloproteinase da classe PI, PII, ou PIII; 5'NT, 5' nucleotidase; CTL, lectina do tipo C-símile; PDE, fosfodiesterase; PLB, fosfolipase B; CRISP: Proteína de secretória rica em cisteína. *dn*, seqüenciamento de novo. Os códigos de adesão NCBI / TrEMBL para os componentes do veneno previamente identificados em *B. erythromelas* são sublinhadas.

Mw	Fração de HPLC em fase reversa					m/z	z	Sequencia peptídica	Mascot Score	Maior homologia em NCBI/TrEmbl	Proteína/Família	
	CE	PE	JUA	PB	IT							
7603.8	1	1	1	1	1	430,4	1	ZNW	<i>dn</i>		BPP	
	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	444,4	1	ZWB	<i>dn</i>		BPP	
	3,4,5,6	3	3,4	3,4	3,4	575,5	2	ZGRAPHPPIPP	<i>dn</i>		BPP	
	5					659,5	2	ZGRAPHPPIPPAP	<i>dn</i>		BPP	
	6					602,1	2	ZGRAPHPPIPP(53,2 Da)	<i>dn</i>		BPP	
	7	7	7	7	7	684,6	3	LRPGAQCAEGLCCDQCR	117	<i>B. jararaca</i> Q0NZX5		Disi
						951,4	2	GDDMDDYCNGISAGCPR				
						959,8	2	GDDMoxDDYCNGISAGCPR				
		8	8	8	8	595,5	2	ZARPPHPPIP	<i>dn</i>			BPP
						685,6	2	ZGGWPRPGPEIPP	<i>dn</i>	<i>B. erythromelas</i> <u>POC7R8</u>		BPP
14 <sup>■</sup>	9	9	9	9	9	598,9	2	ZNWPHPQIPP	<i>dn</i>		BPP	
	10	10		10	10	932,5	2	GNDPDNCCNGISAGCPR	<i>dn</i>	<i>B. neuwiedi</i> ADO21510		Disi

						534,8	2	GLCCDQCR		<i>dn</i>		
24▼	11	11	11	11	11	598,7	2	NPCCDAATCK	91	<i>C. atrox</i> A2CJE4	DC	
						526,7	2	GNYGYCR				
						514,8	2	IPCAPEDVK				
						598,7	2	DPCCDAATCK	83	<i>B. jararaca</i> Q98UF9	DC	
						776,8	2	VCSNGHCVDVATAY				
31■	12					666,3	2	NEDRGMoxVLPGTK	34	<i>B. erythromelas</i> <u>Q8UUVG0</u>	DC	
25▼	13	13	13	13	13	1106,4	2	LHSWVECESGECCDQCR	116	<i>B. leucurus</i> P86092	DC	
						737,9	3	LHSWVECESGECCDQCR				
						513,7	2	AGNVCRPPR				
						1308,2	2	SEC DIAESCTGQSADCPTDDIQR	106	<i>B. jararaca</i> Q0NZX8	DC	
						603,8	2	IFPCKEDVK				
14▼	14	14	14	14	14	442,2	2	HSVCQPR	100	<i>B. erythromelas</i> <u>Q61936</u>	svVEGF	
						953,4	2	CGGCTDESLECTATGK				
56▼					15	796,8	2	TLCAGVLQGGIDTCK	66	<i>C. albolabris</i> A7LAC6	SerProt	
						519,3	2	GAHAGLPATSR	42	<i>B. jararaca</i> Q9PTU8	SerProt	
16▼	15	15	15	15	15	753,3	2	CCFVHDCCYGK	92	<i>B. erythromelas</i> <u>Q2HZ28</u>	D49-PLA <sub>2</sub>	
						854,7	3	ADVITYSEENGVVVCGDDPCKK				
						490,7	2	QICECDR				
						412,7	2	VAATCFR				
						479,7	2	YWFFPAK				
31▼	16	16	16	16	16	847,9	2	DTYDNKYWFFPAK	85	<i>B. erythromelas</i> <u>Q2HZ28</u>	D49-PLA <sub>2</sub>	
						479,8	2	YWFFPAK				
						576,7	2	NCQESEPC				
13652.1	16	16	16	16	16	997,4	3	SGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPDASDR	451	<i>B. erythromelas</i> <u>Q2HZ28</u>	D49-PLA <sub>2</sub>	
						753,3	2	CCFVHDCCYGK				
						1217,5	2	ADVITYSEENGVVVCGDDPCK				
						854,7	3	ADVITYSEENGVVVCGDDPCKK				
						554,7	2	KQICECDR				
						490,7	2	QICECDR				
						893,4	2	QICECDRVAATCFR				
						412,6	2	VAATCFR				

10 <sup>▼</sup>	16					847,8	2	DTYDNKYWFFPAK				
						654,8	2	SLVQFETLIMK	79	<i>B. pictus</i> Q9I8F8	D49-PLA <sub>2</sub>	
						662,8	2	SLVQFETLIMoxK				
6 <sup>▼</sup>	16					753,3	2	CCFVHDCCYGK	71	<i>B. erythromelas</i> <u>Q2HZ28</u>	D49-PLA <sub>2</sub>	
						490,7	2	QICECDR				
31 <sup>▼</sup>	17	17	17	17	17	644,8	2	NFQMQLGVHVK	192	<i>B. asper</i> Q072L6	SerProt	
						652,8	2	NFQMoxQLGVHVK				
						616,3	2	KVLNEDEQTR				
						552,3	2	VLNEDEQTR				
						826,4	3	VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR				
						1239,1	2	VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR				
34 <sup>▼</sup>			18			511,8	2	LGVHSIKIR	95	<i>B. jararaca</i> P81824	SerProt	
						723,4	2	DDVLDKDIMLIR				
31 <sup>▼</sup>	18	18	18	18	18	411,6	2	KTLNQDEQTR	359	<i>B. jararaca</i> Q5W959	SerProt	
						554,6	2	KNDDALDKDMLVLR				
						511,9	2	NDDALDKDMLVLR				
						765,4	2	TNPDVPHCANINLLDDAVCR				
34 <sup>▼</sup>	19	19	19	19	19	532,7	2	EKFICPNR	98	<i>B. jararaca</i> P81824	SerProt	
						403,7	2	FICPNR				
						480,7	2	KKDDVLDK				
						787,4	2	KDDVLDKDIMLIR				
						723,4	2	DDVLDKDIMLIR				
31 <sup>▼</sup>	19		19	19		552,7	2	TLNQDEQTR	77	<i>B. jararaca</i> Q5W959	SerProt	
						767,4	2	NDDALDKDLMoxLVR				
34 <sup>▼</sup> /28 <sup>■</sup>	20,21	20,21	20,21	20,21	20,21	749,8	2	VVGDECNINEHR	117	<i>B. jararaca</i> P81883	SerProt	
						444,8	2	FFCLSSK	95	<i>S. c. edwardsi</i> ABG26977	SerProt	
						558,9	2	VLCAGILEGGK				
28 <sup>▼</sup> /26 <sup>■</sup>	22	22	22			449,8	2	ERDLLPR	51	<i>B. asper</i> P83512	PI-SVMP	
14 <sup>▼</sup>	22	22				626,9	2	RPYCTVMVVK	38	<i>D. acutus</i> Q8JIV8	CTL	
						634,9	2	RPYCTVMoxVVK				
52 <sup>▼</sup> ■	23				23	1029,5	3	HDNAQLLTAIDLGDGPTVGLAYVGSMoXCNPk	118	<i>B. atrox</i> C5H5D2	PIII-SVMP	
						656,4	3	YLIDNRPPCILNIPLR				
						897,8	2	LIPGAQCEDGECCEr				



						1345,3	2	SECDIAESCTGQSPECPTDDDFQR				
						622,3	2	KQNGVTIPCAR				
						558,3	2	QNGVTIPCAR				
36 <sup>▼</sup> ■	23					984,1	2	YLIDNRPPCILNIPLR	139	<i>B. atrox</i> C5H5D2	PIII-SMVP	
						897,4	2	LIPGAQCEDGECCER				
						897,1	3	SECDIAESCTGQSPECPTDDDFQR				
						1345,1	2	SECDIAESCTGQSPECPTDDDFQR				
						622,3	2	KQNGVTIPCAR				
						558,3	2	QNGVTIPCAR				
66 <sup>▼</sup>			24			672,3	2	CTGQDCYGGVAR	231	<i>C. adamanteus</i> F8S0Z7	5'-NT	
						863,1	3	YDAMALGNHEFDNGLAGLLDPLLK				
						430,2	2	IINVGSEK				
						476,3	2	VGHGYTTK				
						859,9	2	ETPVLSNPGPYLEFR				
						1024,5	3	ETPVLSNPGPYLEFRDEVEELQNHANK				
						713,3	2	DEVEELQNHANK				
						423,2	2	LTTLGVNK				
						521,2	2	SSGNPILLNK				
						807,7	3	FHECNLGNLICDAVIYNNVR				
						556,3	2	QAFEHSVHR				
55 <sup>▼</sup>	24	24	24		24	803,5	2	YIELVIVADNVMVK	292	<i>B. atrox</i> C5H5D2	PIII-SVMP	
						867,5	2	YIELVIVADNVMVKK				
						422,8	2	ETVLLNR				
						656,4	3	YLIDNRPPCILNIPLR				
						897,4	2	LIPGAQCEDGECCER				
						535,2	2	KGQNSYCR				
						622,3	2	KQNGVTIPCAR				
						558,3	2	QNGVTIPCAR				
						1180,9	3	LFCVQGPIGNTISCQSTSSQDDPDIGMVDLGTK				
36 <sup>▼</sup> /33 <sup>■</sup>	24					984,1	2	YLIDNRPPCILNIPLR	38	<i>B. atrox</i> C5H5D2	PIII-SVMP	
						558,3	2	QNGVTIPCAR				
100 <sup>■</sup>	25,26	25,26	25,26	26	25,26	679,9	2	ASQSNLTPEQQR	186	<i>G. halys</i> Q8AWI5	PIII-SVMP	

						806,1	3	GAGTECRAATDECDMADLCTGR			
						419,7	2	SAECTDR			
						634,4	2	LYCIDSSPANK			
						690,4	2	ACSNGQCVDVNR			
55▼	25,26	25,26	25,26	26	25,26	803,4	2	YIELVIVADNVMVK	126	<i>B. atrox</i> C5H5D2	PIII-SVMP
						442,8	2	ETVLLNR			
						984,1	2	YLIDNRPPCILNIPLR			
						656,4	3	YLIDNRPPCILNIPLR			
18▼/28■	25,26	25,26	25,26	26	25,26	867,9	2	DTPFECPSDWSTHR	200	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
						435,2	2	FCSEQAK			
						535,3	2	YYVWIGLR			
						777,4	2	YYVWIGLRIENK			
						852,9	2	WSDYSSVSYENLVR			
97▼■	27	27				533,8	2	CSSITELEK	581	<i>C. adamanteus</i> AEJ31980	PDE
						546,8	2	TLGMLMEGLK			
						561,3	2	NPFYTPSPAK			
						583,8	2	QPLPETLQLK			
						630,9	2	TFLPIFVNPVN			
						678,3	2	AATYFWPGSEVK			
						766,9	2	LWNYFH TTLIPK			
						834,9	2	DVELLTGLNFYSGLK			
						1166,5	2	EQSSPLSCLPFGVPSPDVSGCK			
						988,8	3	NGLNVISGPIFDYNYDGHFDSYDTIK			
	27	27	27			1113,6	3	IPIPTHYFVVLTSCEINQINTPLNCLGPLK			
						690,3	2	ACSNGQCVDVNR	73	<i>G. halys</i> Q8AWI5	PIII-SVMP
						598,7	2	DPCCDAATCK	64	<i>B. jararaca</i> Q0NZX9	PIII-SVMP
						528,7	2	QCVDVTTAY			
55▼	27	27	27			656,6	3	YLIDNRPPCILNIPLR	97	<i>B. atrox</i> C5H5D2	PIII-SVMP
						622,5	2	KQNGVTIPCAR			
						1113,6	2	LHSWVECESGECCEQCR	84	<i>B. jararaca</i> Q0NZX8	PIII-SVMP
18▼	27	27	27			558,3	2	XVAPNXGEFR	dn	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
						535,4	2	YYVWIGLR	26	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL

14▼	27	27	27		435,2	2	FCSEQAK	dn	<i>B. insularis</i> P0C930	CTL
					838,6	2	(330.2)DFVVSXTSADHR			
					435,2	2	FCSEQAK			
100■	28	28	28	28	598,7	2	DPCCDAATCK	69	<i>B. jararaca</i> Q98UF9	PIII-SVMP
					666,8	2	VVPESLFAWER	45	<i>C. adamanteus</i> F8S101	PLB
					461,3	2	VADISMoxAAK			
80■	28	28	28	28	805,9	3	GAGTECRAATDECDMADLCTGR	39	<i>G. brevicaudus</i> O93517	PLB
					852,9	2	SLEDGTYIIEQVPK	37	<i>C. adamanteus</i> F8S101	PLB
55■	28	28	28	28	613,7	2	NPCCDATTCK	62	<i>B. jararaca</i> Q0NZX8	PIII-SVMP
					897,4	3	LIPGAQCEDGECCER	36	<i>B. atrox</i> C5H5D2	PIII-SVMP
					558,3	2	QNGVTIPCAR			
					535,2	2	YYVWIGLR	36	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
48■	28	28	28	28	902,7	3	VLPGYENIYFAHSSWFTYAATLR	176	<i>C. adamanteus</i> F8S101	PLB
					666,8	2	VVPESLFAWER			
					527,3	2	IANMMoxADSGK			
					506,3	2	TWAETFEEK			
					852,9	2	SLEDGTYIIEQVPK			
					726,8	2	HGLEFSYEMoxAPR			
					486,7	2	VTDMoxESMoxK			
					453,3	2	VADISMAAK			
28■/18-14▼	28	28	28	28	435,3	2	FCSEQAK	41	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
					535,4	2	YYVWIGLR			
					773,9	2	VFNEPQNWADA EK	28	<i>C. albolabris</i> P8114	CTL
66▼	29	29	29	29	999,4	2	LTPGSQCADGLCCDQCR	91	<i>B. jararaca</i> Q0NZY0	PIII-SVMP
					437,8	2	ETDLLKR	68	<i>B. atrox</i> C5H5D3	PIII-SVMP
					688,9	2	LTPEQQAYLDAK	dn	<i>B. erythromelas</i> <u>Q8UVG0</u>	PIII-SVMP
	29	29	29	29						

50▼/55▼						742,3	3	LHSWVECESGECCEQCR	163	<i>B. jararaca</i> Q0NZX8	PIII-SVMP
						1113,4	2	LHSWVECESGECCEQCR			
						872,4	3	SECDAESCTGQSADCPTDDIQR			
						603,8	2	IFPCKEDVK			
						432,2	2	EDVKCGR			
23▼	29	29	29	29	29	707,1	2	DLLVAVTMDHELGHNLGIR	350	<i>B. jararaca</i> P31989	PI-SVMP
						1052,1	3	DLLVAVTMDHELGHNLGIR			
						686,1	4	HDTGSCSCGGYSCVMSPVISHDISK			
						919,7	3	HDTGSCSCGGYSCVMoxSPVISHDISK			
						1089,9	2	YFSDCSYIQCWDFIMoxK			
						558,3	2	ENPQCILNK			
18▼	29	29	29	29	29	867,9	2	DTPFECPSDWSTHR	89	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
						435,2	2	FCSEQAK			
						535,3	2	YVWIGLR			
14▼	29	29	29	29	29	853,9	2	MNWADAENLCAQQR	139	<i>B. jararaca</i> Q9PSM5	CTL
						907,9	2	VNYNAWASESECVASK			
						849,9	2	TTDNQWWSFPCTR			
55▼	30	30	30	30	30	564,3	2	ATVAEDSCFK	60	<i>B. erythromelas</i> <u>Q8UVG0</u>	PIII-SVMP
						806,8	2	ATVAEDSCFKDNQK			
						543,3	2	IPCEPQDVK			
42▼	30	30	30	30	30	1106,4	2	LHSWVECESGECDDQCR	98	<i>B. jararaca</i> Q0NZX9	PIII-SVMP
						528,7	2	QCVDVTTAY			
						887,1	3	DDCDIAESCTGQSADCPTDDLQR	68	<i>G. brevicaudus</i> P0DM89	PIII-SVMP
23▼	30	30	30	30	30	707,1	3	DLLVAVTMDHELGHNLGIR	193	<i>B. jararaca</i> P31989	PI-SVMP
						558,3	2	ENPQCILNK			
						921,5	2	YIELFIVVDHGMFMK	75	<i>B. jararaca</i> Q98SP2	PI-SVMP
						937,5	2	YIELFIVVDHGMoxFMoxK			
						533,7	2	YNGNSDKIR			
						557,3	2	IHQMVNIMK			
						430,3	2	KTDLLNR			
18▼	30	30	30	30	30	435,2	2	FCSEQAK	41	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL

						535,3	2	YYVWIGLR				
14▼	30	30	30	30	30	773,9	2	VFNEPQNWADA EK	28	<i>C. albolabris</i> P81114	CTL	
						838,6	2	(330.2)DFVVSXTSADHR	<i>dn</i>	<i>B. insularis</i> POC930	CTL	
55▼	31					1081,5	2	SHDNAQLLTNTDFDGSTIGR	67	<i>B. erythromelas</i> <u>Q8UVG0</u>	PIII-SMVP	
						1020,4	2	LTPGSQCVEGLCCDQCR				
						806,8	2	ATVAEDSCFKDNQK				
						607,3	2	KIPCEPQDVK				
						890,8	2	LYCNDNSPGQNNPCK				
						666,8	2	NEDRGMoxVLPGTK				
54▼	31,32,33	31,32			31,32	448,7	2	YKDDLDK	83	<i>B. erythromelas</i> <u>Q8UVG0</u>	PIII-SMVP	
						721,3	3	SHDNAQLLTNTDFDGSTIGR				
						428,2	2	CIYFPR				
52▼	31,32,33	31,32			31,32	558,3	2	XVAPNXGEFR	<i>dn</i>	~ <i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL	
18▼	31,32,33	31,32			31,32	435,2	2	FCSEQAK	43	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL	
						535,3	2	YYVWIGLR				
14▼	31,32,33	31,32			31,32	849,8	2	TTDNQWWSFPCTR	49	<i>B. jararaca</i> Q9PSM5	CTL	
100■	34	34	34	34	34	508,7	2	NNGDLKIK	212	<i>B. jararaca</i> P30431	PIII-SVMP	
						814,9	2	MoxYELANIVNEIFR				
						806,4	2	MYELANIVNEIFR				
						1077,5	2	ITVKPDVDYTLNSFAEWR				
						423,7	2	KTDLLTR				
						1154,2	3	KKHDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPK				
						711,3	3	SGSQCGHGDCCEQCKFSK				
						578,8	2	KIPCAPEDVK				
						468,2	3	IPCAPEDVKCGR				
						776,8	2	VCSNGHCVDVATAY				
52▼	34	34	34	34	34	508,8	2	NNGDLKIK	611	<i>B. jararaca</i> P30431	PIII-SVMP	
						806,4	2	MYELANIVNEIFR				
						814,4	2	MoxYELANIVNEIFR				
						718,7	3	ITVKPDVDYTLNSFAEWR				
						423,8	2	KTDLLTR				
						1111,6	3	KHDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPK				
						885,3	2	SGSQCGHGDCCEQCK				
						979,7	3	ASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHK				

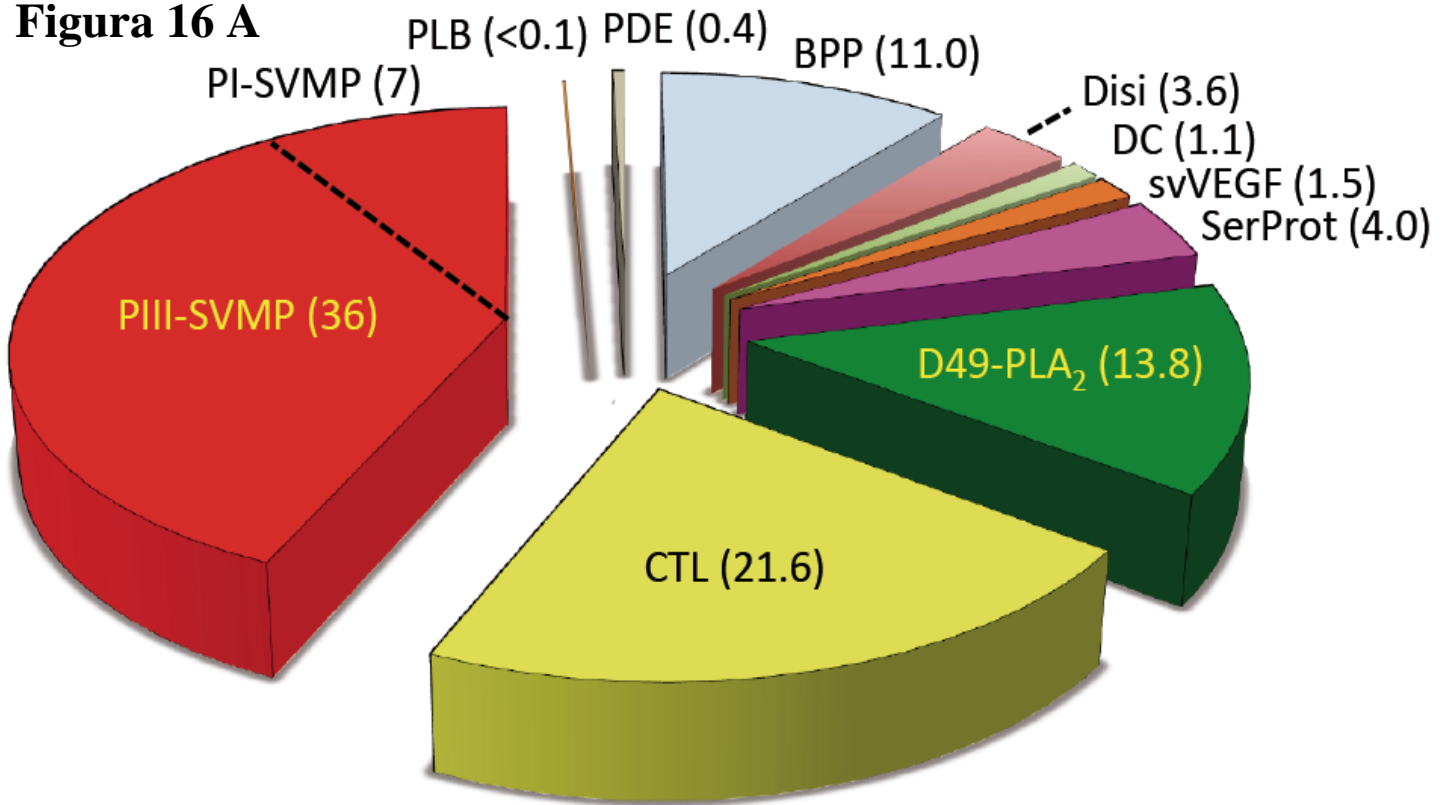
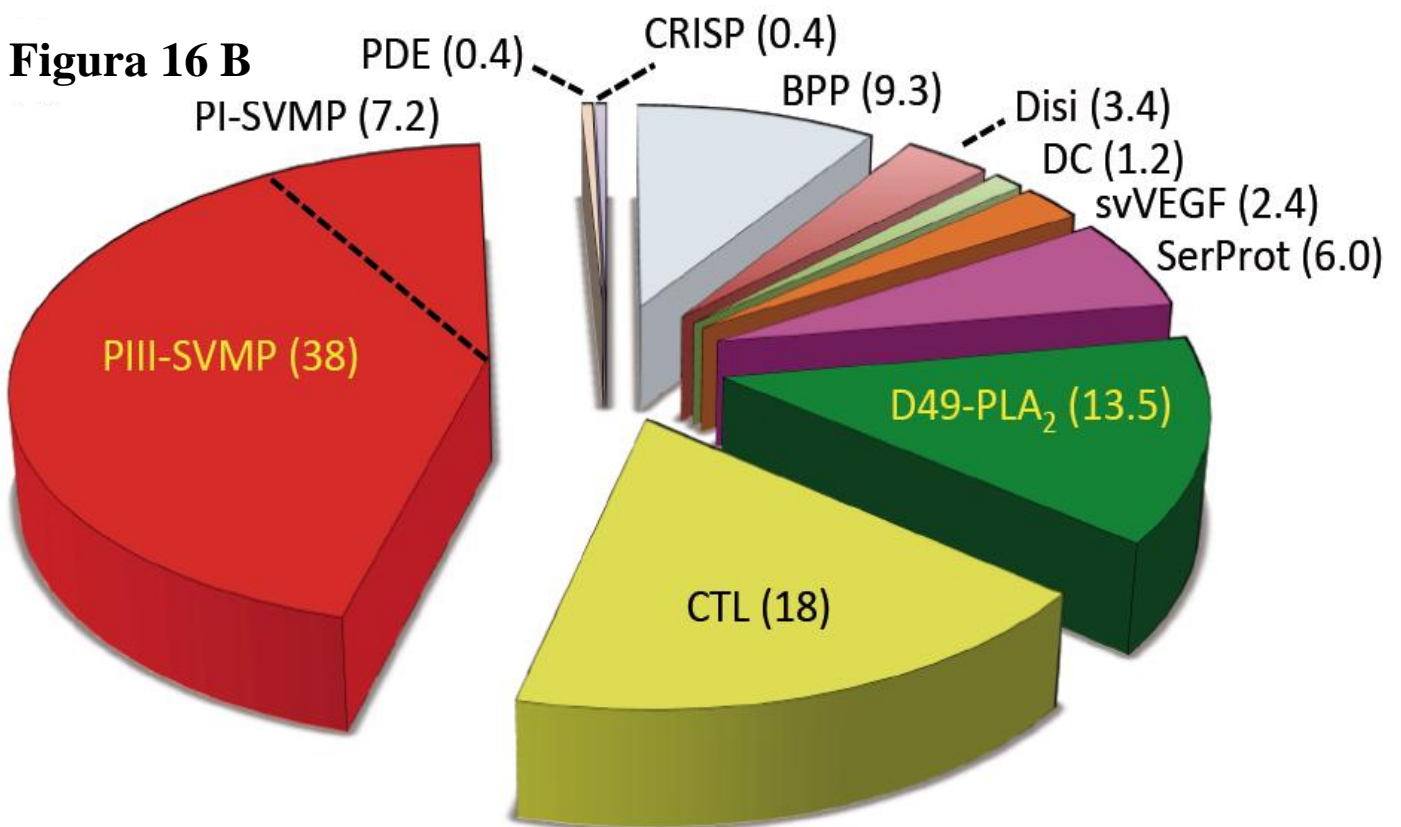
						526,7	2	GNYGYCR			
						578,8	2	KIPCAPEDVK			
						514,8	2	IPCAPEDVK			
						643,7	2	MFYSNDDEHK			
						690,3	3	MFYSNDDEHKGMVLPGTK			
						1042,9	2	MoxFYSNDDEHKGMVLPGTK			
						401,7	2	GMVLPGTK			
						776,8	2	VCSNGHCVDVATAY			
18▼/28■	34	34	34	34	34	867,9	2	DTPFECPSDWSTHR	131	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
						435,2	2	FCSEQAK			
						535,3	2	YYVWIGLR			
						852,9	2	WSDYSSVSYENLVR			
28■/29■	34	34	34	34	34	914,9	2	DCPSDWSPYGGHCYK	100	<i>B. jararaca</i> Q9PSM5	CTL
						849,9	2	TTDNQWWSFPCTR			
						854,1	2	MNWADAENLCAQQR			
55▼	35,36	35	35	35	35	818,5	2	IYEIVNILNEIFR	83	<i>B. jararaca</i> Q98UF9	PIII-SVMP
						513,2	2	FKGAGTECR			
						530,3	2	IPCAQEDVK	<i>dn</i>	<i>B. leucurus</i> P86092	PIII-SVMP
52▼	35,36	35	35	35		546,7	2	GDKFFYCR	65	<i>B. jararaca</i> Q0NZX9	PIII-SVMP
						872,5	2	KENVIITPCAQEDVK			
						808,4	2	ENVIITPCAQEDVK			
18▼	35,36	35	35	35	35	867,9	2	DTPFECPSDWSTHR	159	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
						435,2	2	FCSEQAK			
						535,3	2	YYVWIGLR			
						777,4	2	YYVWIGLRIENK			
						852,9	2	WSDYSSVSYENLVR			
14▼	35,36	35	35	35		907,9	2	VNYNAWASESECVASK	123	<i>B. jararaca</i> Q9PSM5	CTL
						914,9	2	DCPSDWSPYGGHCYK			
						849,9	2	TTDNQWWSFPCTR			

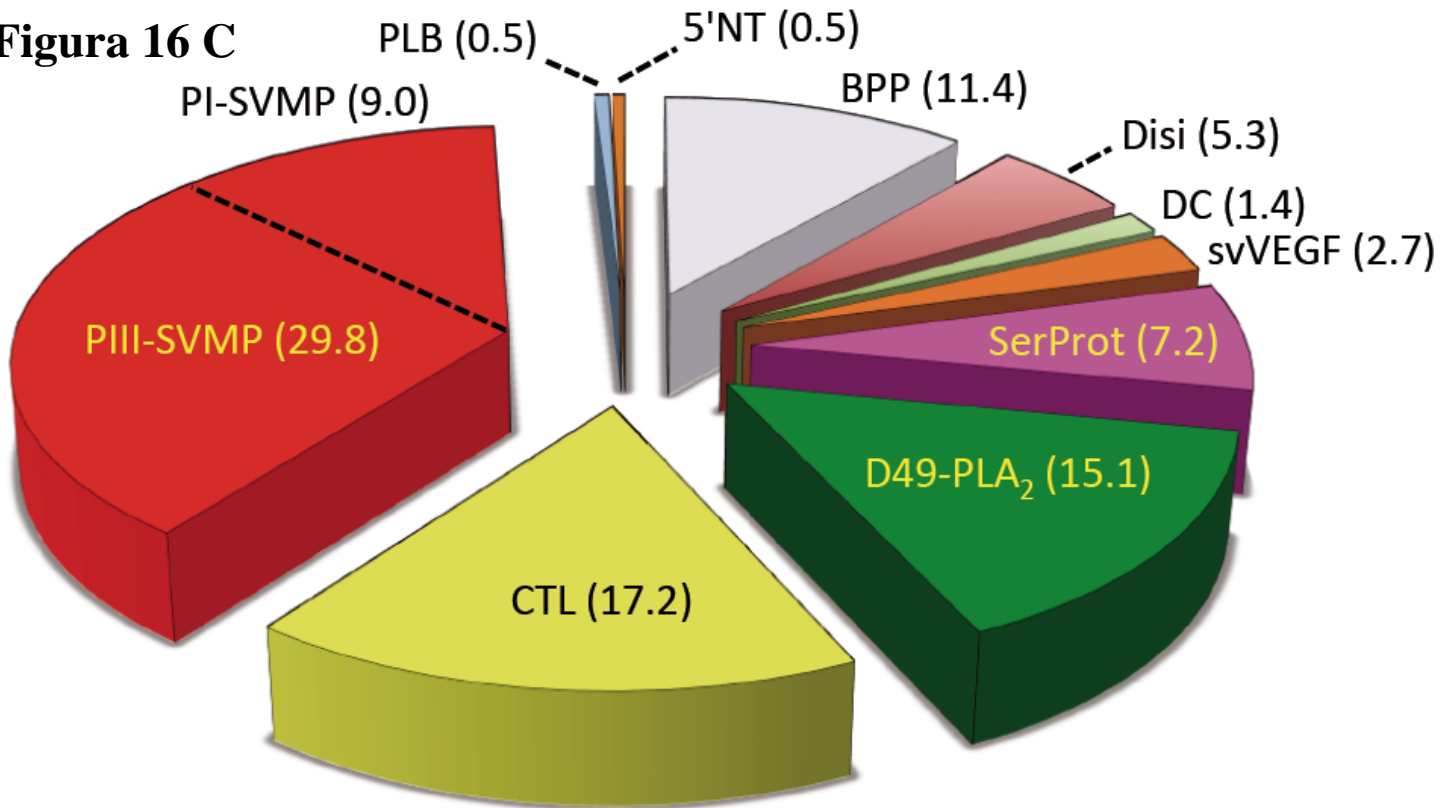
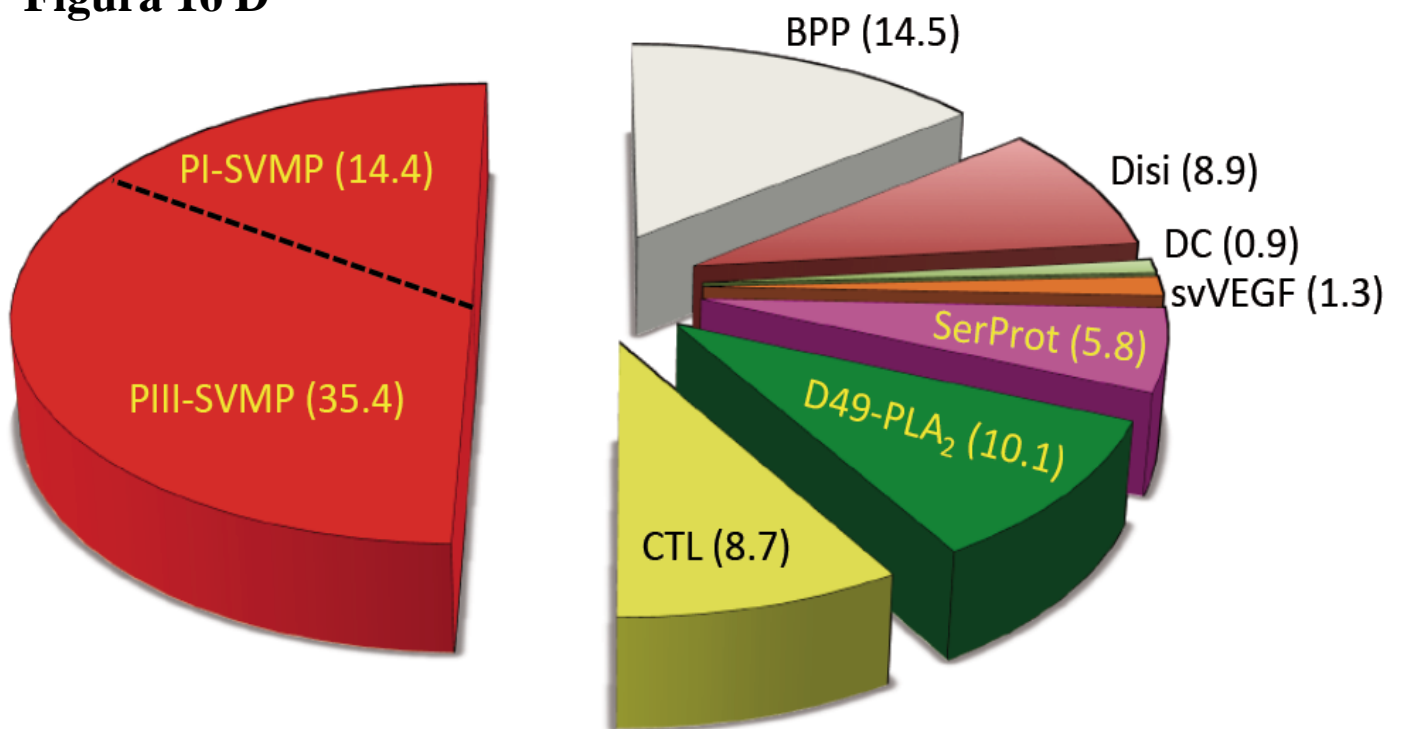
100 <sup>■</sup>					37	523,3	2	NNGNLDEIR	282	<i>B. neuwiedi</i> ADO21502	PIII-SVMP
						974,4	3	TDIVSPPVCGNELLEMGEEDCGSPR			
						979,4	3	TDIVSPPVCGNELLEMoxGEECDGSPR			
						872,5	2	KENVITPCAQEDVK			
						808,4	2	ENVITPCAQEDVK			
						881,7	3	SECDAESCTGQSAQCPTDDFHK			
55 <sup>■</sup>	37	37	37	37	37	523,3	2	NNGNLDEIR	282	<i>B. neuwiedi</i> ADO21502	PIII-SVMP
						974,4	3	TDIVSPPVCGNELLEMGEEDCGSPR			
						979,4	3	TDIVSPPVCGNELLEMoxGEECDGSPR			
						872,5	2	KENVITPCAQEDVK			
						808,4	2	ENVITPCAQEDVK			
						881,7	3	SECDAESCTGQSAQCPTDDFHK			
36 <sup>■</sup>	37	37	37	37	37	979,4	3	TDIVSPPVCGNELLEMoxGEECDGSPR	292	<i>B. neuwiedi</i> ADO21502	PIII-SVMP
						881,7	3	SECDAESCTGQSAQCPTDDFHK			
						872,4	2	KENVITPCAQEDVK			
						808,4	2	ENVITPCAQEDVK			
31 <sup>■</sup>	37	37	37	37	37	979,4	3	TDIVSPPVCGNELLEMoxGEECDGSPR	116	<i>B. neuwiedi</i> ADO21502	PIII-SVMP
						808,4	2	ENVITPCAQEDVK			
28 <sup>■</sup>	37	37	37	37	37	552,2	2	VLNEDEQTR	85	<i>B. asper</i> Q072L6	SerProt
						535,2	2	YYVWIGLR	46	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
						858,9	2	(199.1)SDYSSVSYENLVR	<i>dn</i>	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
64 <sup>▼</sup>	38	38	38	38		523,2	2	NNGNLDEIR	175	<i>B. neuwiedi</i> ADO21503	PIII-SVMP
						615,4	2	KENGVNIPCAK			
						551,4	2	ENGVNIPCAK			
55 <sup>▼</sup>	38	38	38	38		677,4	2	NPQCILNEPLR	89	<i>G. brevicaudus</i> O93516	PIII-SVMP
						881,7	3	SECDAESCTGQSAQCPTDDFHK	83	<i>B. jararaca</i> Q0NZX9	PIII-SVMP
						546,7	2	GDKFFYCR			
						872,5	2	KENVITPCAQEDVK			
						808,4	2	ENVITPCAQEDVK			

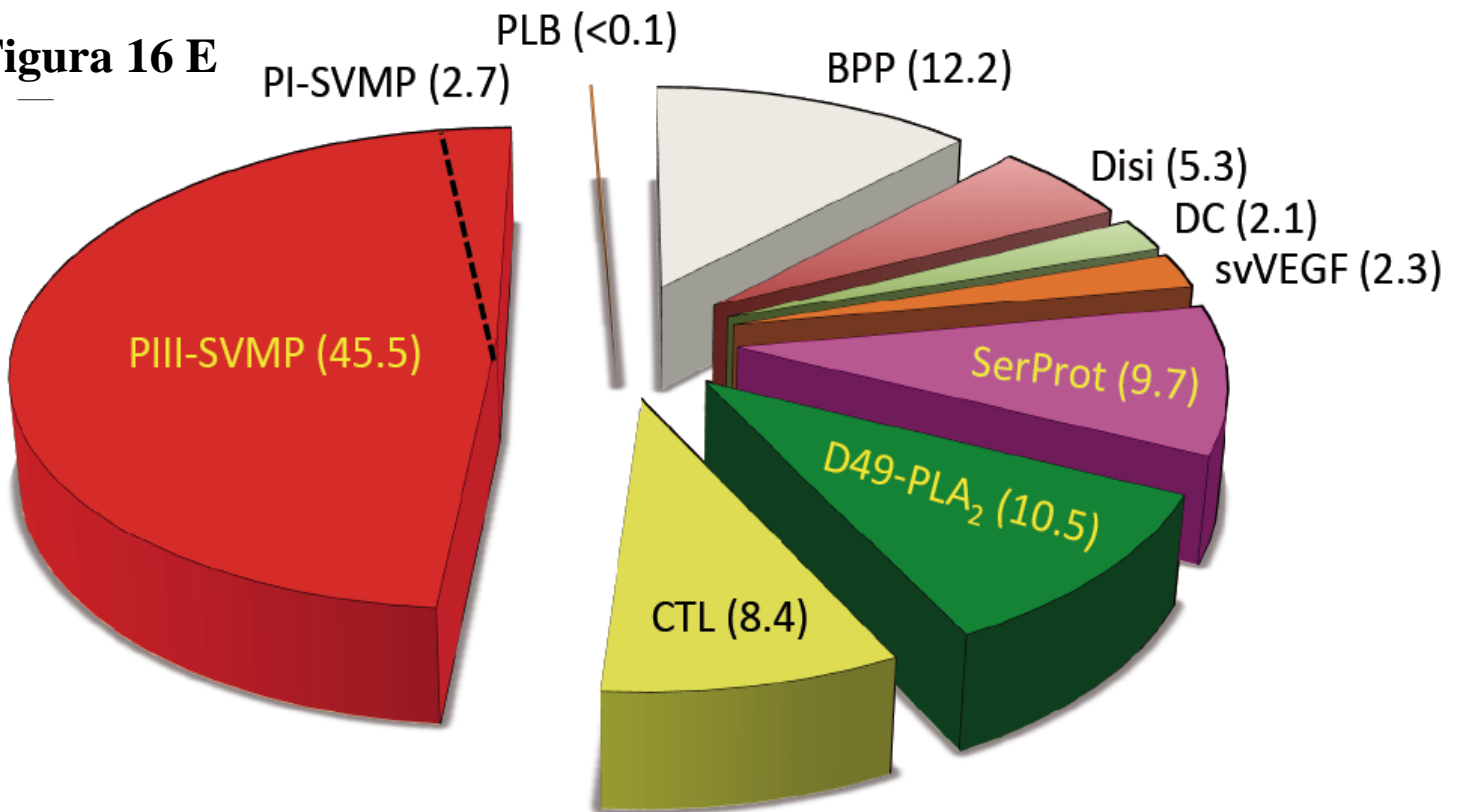
					528,7	2	QCVDVTTAY			
40▼	38	38	38	38	664,4	2	YIELVIVADHR	75	<i>P. jerdonii</i> P83912	PIII-SVMP
					969,3	2	GDEPDDCCNGXSADCPR	dn	<i>B. neuwiedi</i> ADO21507	PIII-SVMP
					844,4	2	XAXVGVEXWSSGEXSK	dn	<i>C. atrox</i> C9E1R7	PIII-SVMP
					851,4	2	XAXVGXEXWSSGEXSK	dn	<i>C. atrox</i> C9E1R7	PIII-SVMP
18▼	38	38	38	38	858,9	2	(199.1)SDYSSVSYENLVR	dn	<i>B. jararaca</i> Q9PSM6	CTL
14▼	38	38	38	38	907,9	2	VNYNAWASESECVASK	66	<i>B. jararaca</i> Q9PSM5	CTL
					597,3	2	TTDNQWWSR	57	<i>V. stejneri</i> Q71RQ0	CTL
					773,8	2	VFNEPQNWADA EK	55	<i>V. albolabris</i> P81114	CTL
7628.3		39	39	39	753,6	3	IARGDDMoxDDYCNGISAGCPR	101	<i>G. brevicaudus</i> Q698K8	Disi
					959,8	2	GDDMoxDDYCNGISAGCPR			
28■		40			769,3	2	MEWYPEAAANAER	158	<i>C. horridus</i> ACE73560	CRISP
					635,7	3	KPEIQNEIVDLHNSLR			
					569,8	2	SVDFDSESPR	70	<i>D. russelii</i> P86537	CRISP
34▼/28■		41	41	41	504,8	3	VIGGDECNINEHR	153	<i>G. ussuriensis</i> Q7SZE2	SerProt
					756,8	2	VIGGDECNINEHR			
					616,3	2	KVLNEDEQTR			
					552,3	2	VLNEDEQTR			
					559,8	2	TLCAGILEGGK			
31▼/26■		41	41	41	722,3	2	VLNEDEQTRDPK	62	<i>B. asper</i> Q072L6	SerProt
					826,4	3	VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR			
					685,7	2	ZGGWPRPGPQIPP			BPP
31▼		43	43	43	535,3	2	FLVALYTSR	404	<i>B. jararacussu</i> Q7T229	SerProt
					831,4	3	FHCSGTLINQEWVLTAA NCDR			
					909,5	3	RPVNDSPHIAPISLPSSPPSVGSVCR			
					595,8	2	IMGWGTISPTK			
					845,4	3	VSYDPVPHCANINLLDYEVCR			
					519,3	2	AAHGGLPATSR			
					559,8	2	TLCAGILEGGK			
					1130,2	3	DSCQGDSGGPLICNGQFQGILSWG VHPGQR			



			453,3	2	LKPGVYTK			
23▼	44		547,8	2	YNSNLNTIR	180	<i>B. insularis</i> Q5XUW8	PI-SVMP
			866,5	2	SVNVDasLANLEVWSK			
			930,5	2	SVNVDasLANLEVWSKK			
			548,8	2	TLTSFGEWR			
			449,8	2	ERDLLPR			
27▼		45	897,4	2	LIPGAQCEDGECCER	73	<i>C.d.cascavella</i> C5H5D1	DC
			622,3	2	KQNGVTIPCAR			
			558,3	2	QNGVTIPCAR			

**Figura 16 A****Figura 16 B**

**Figura 16 C****Figura 16 D**

**Figura 16 E**

Composição geral dos venenos de *B. erythromelas*. O gráfico expressa a ocorrência relativa (em percentual de proteínas totais de veneno) de toxinas de diferentes famílias de proteínas nos pools das populações do Ceará (A), Pernambuco (B), Juazeiro (C), Paraíba (D) e Ilha de Itaparica (E). PI- e PIII-SMVP: são respectivamente as metaloproteinases da classe PI e PIII; PLA<sub>2</sub>, fosfolipase A<sub>2</sub>; Ser-Prot: serinoproteinase; svVEGF, fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente; DC: desintegrina-like / cisteína-domínio rico; Disi: desintegrina; PLB: fosfolipase B; PDE: fosfodiesterase; 5'NT: 5'-nucleotidase; BPP: peptídeo potencializador da bradicinina; CRISP, proteína de secretória rica em cisteína; CTL: lectina do tipo C - símile.

#### 6.4 Análise dos venenos de *B. erythromelas* através da segunda geração da antivenômica

Tendo em vista o protocolo da antivenômica, a fração recuperada após a incubação do veneno com a coluna de imunoafinidade corresponde ao que não foi reconhecido pelos anticorpos unidos à matriz (não retido). O que fica retido é o que permaneceu unido aos anticorpos e essa união antígeno-anticorpo é posteriormente desfeita em pH ácido (eluído). Os resultados da antivenômica mostraram que a imunorreatividade do soro pentavalente antibotrópico (SAB) é similar frente às cinco populações (Figura 17: 17.1 -

17.10) e mais eficiente em relação ao BCL. No entanto, nos *pools* de veneno das diferentes populações do Nordeste, pode-se observar em especial a região das frações de baixo peso molecular que não são reconhecidas pelos dois antivenenos de forma eficiente. Ainda se pode observar diferenças entre o reconhecimento dos antivenenos à proteínas específicas, as quais são discutidas adiante.

Figura 17.1

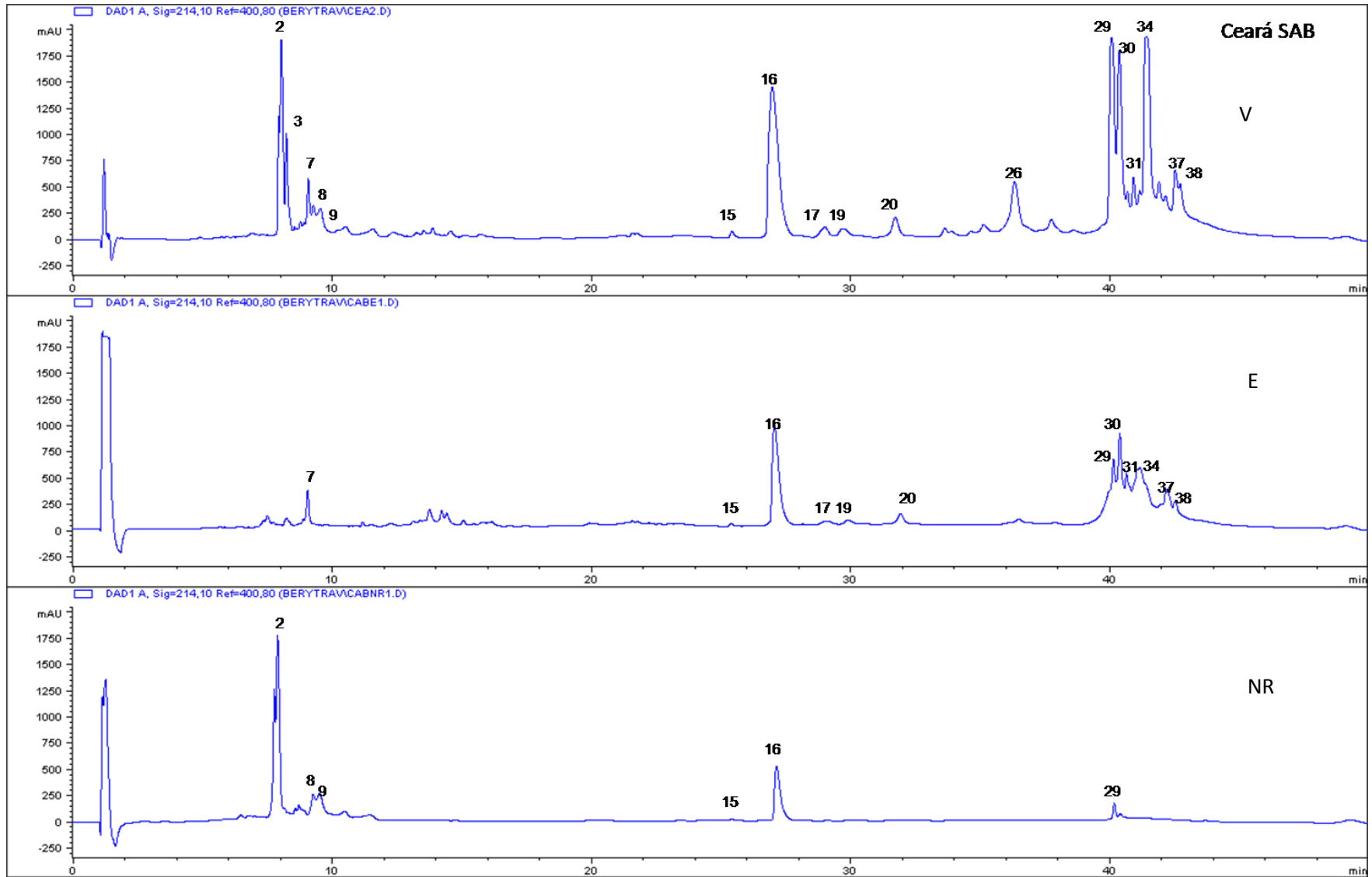


Figura 17.2

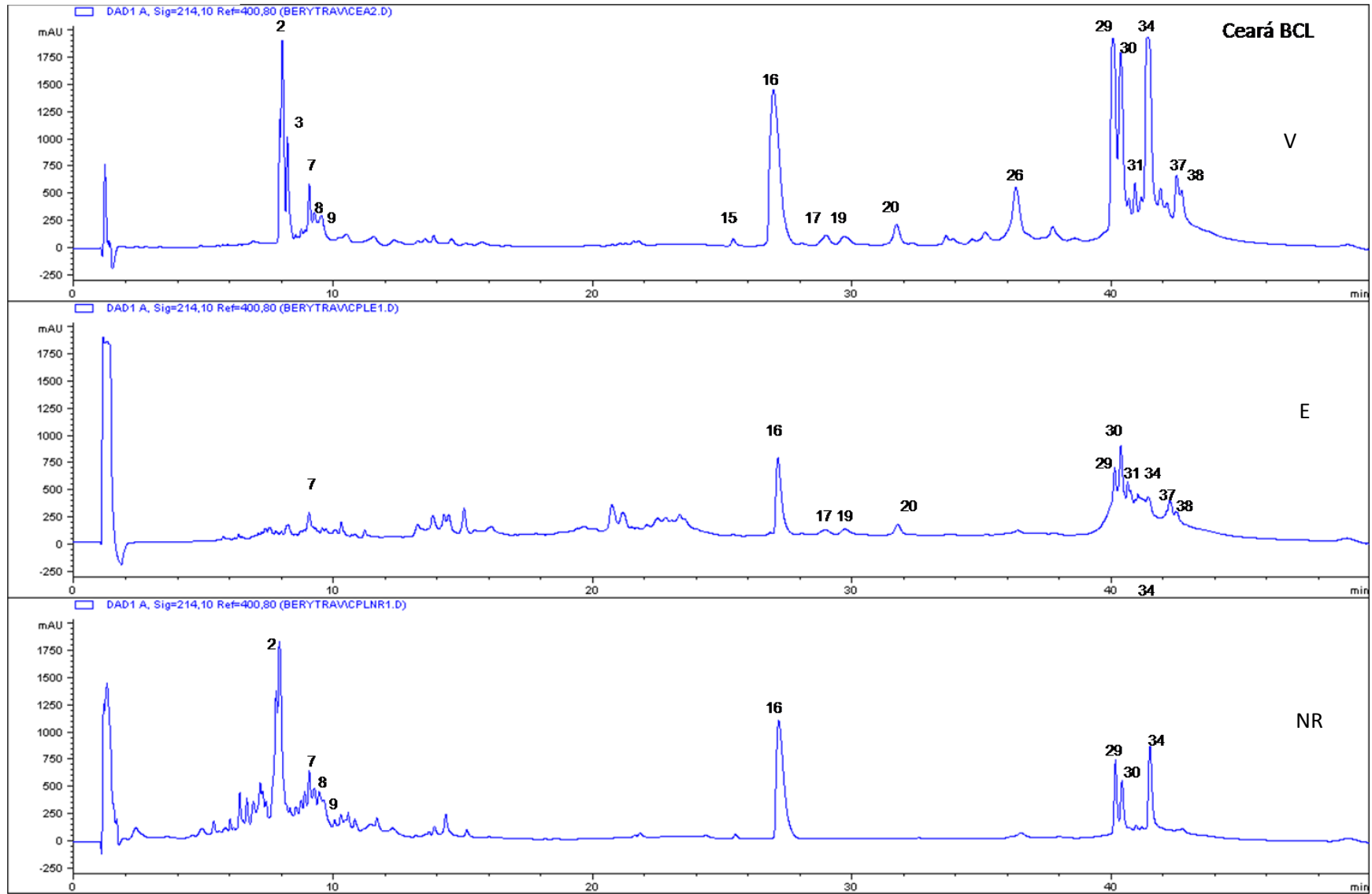


Figura 17.3

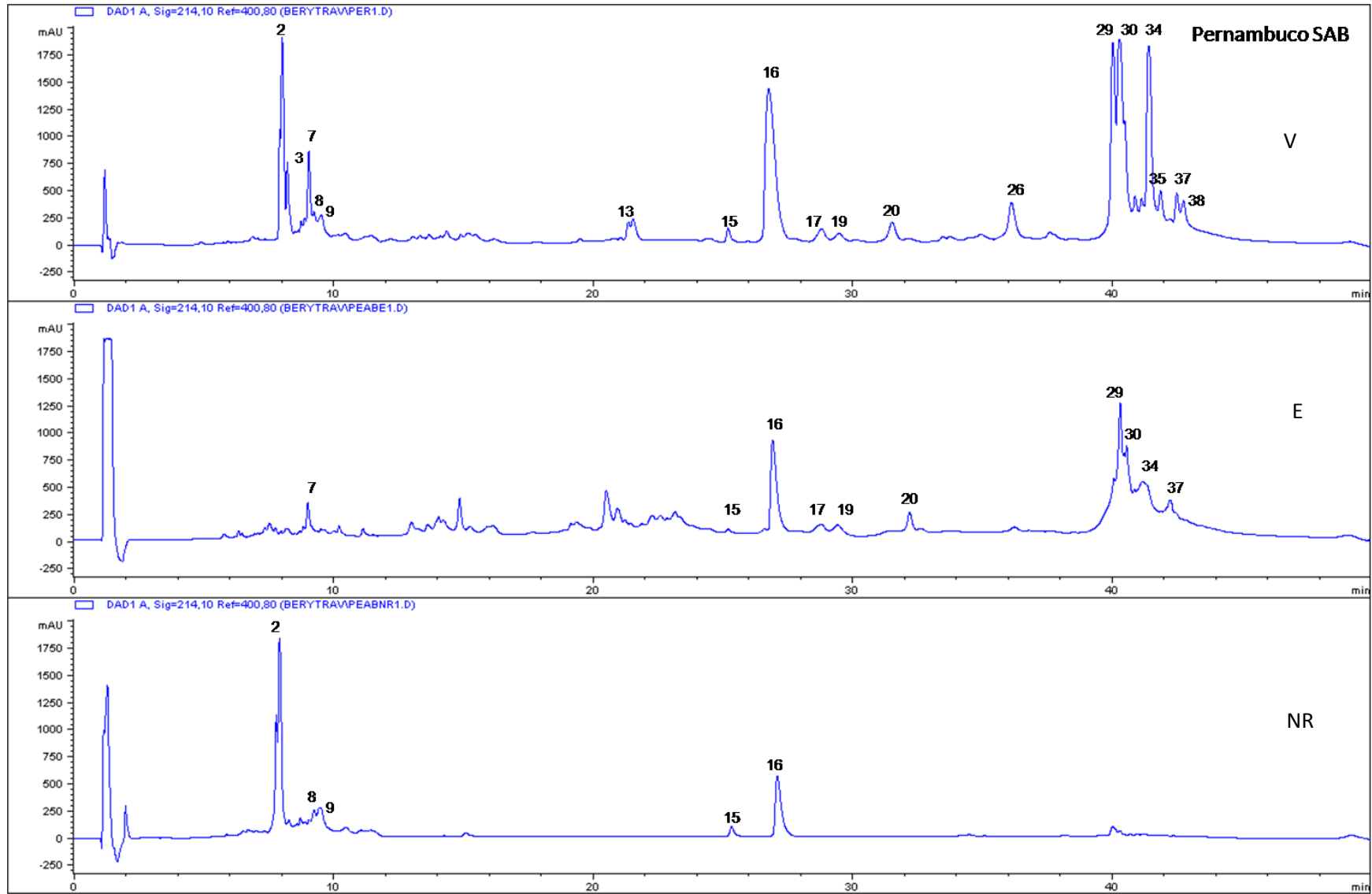




Figura 17.4

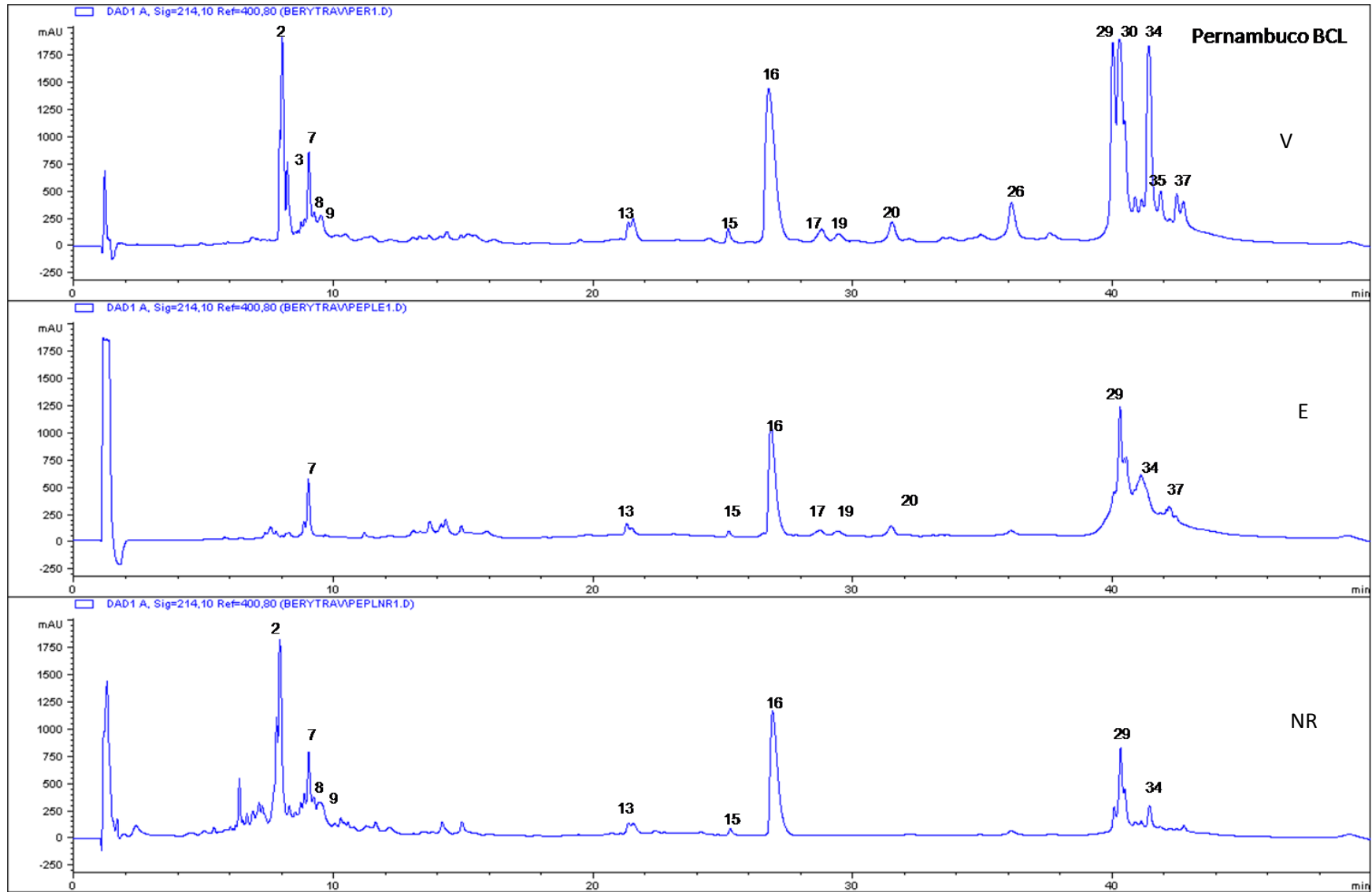


Figura 17.5

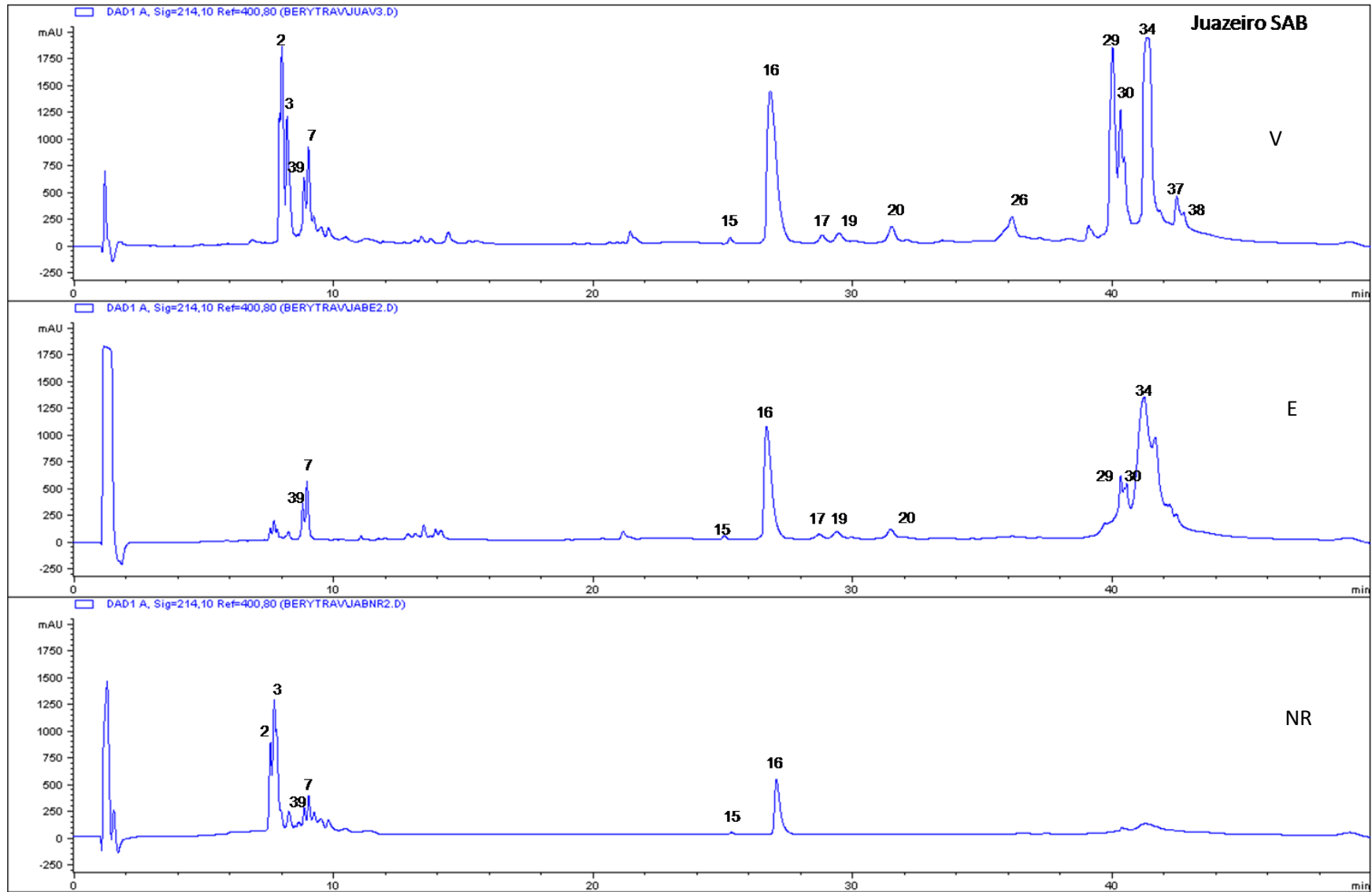


Figura 17.6

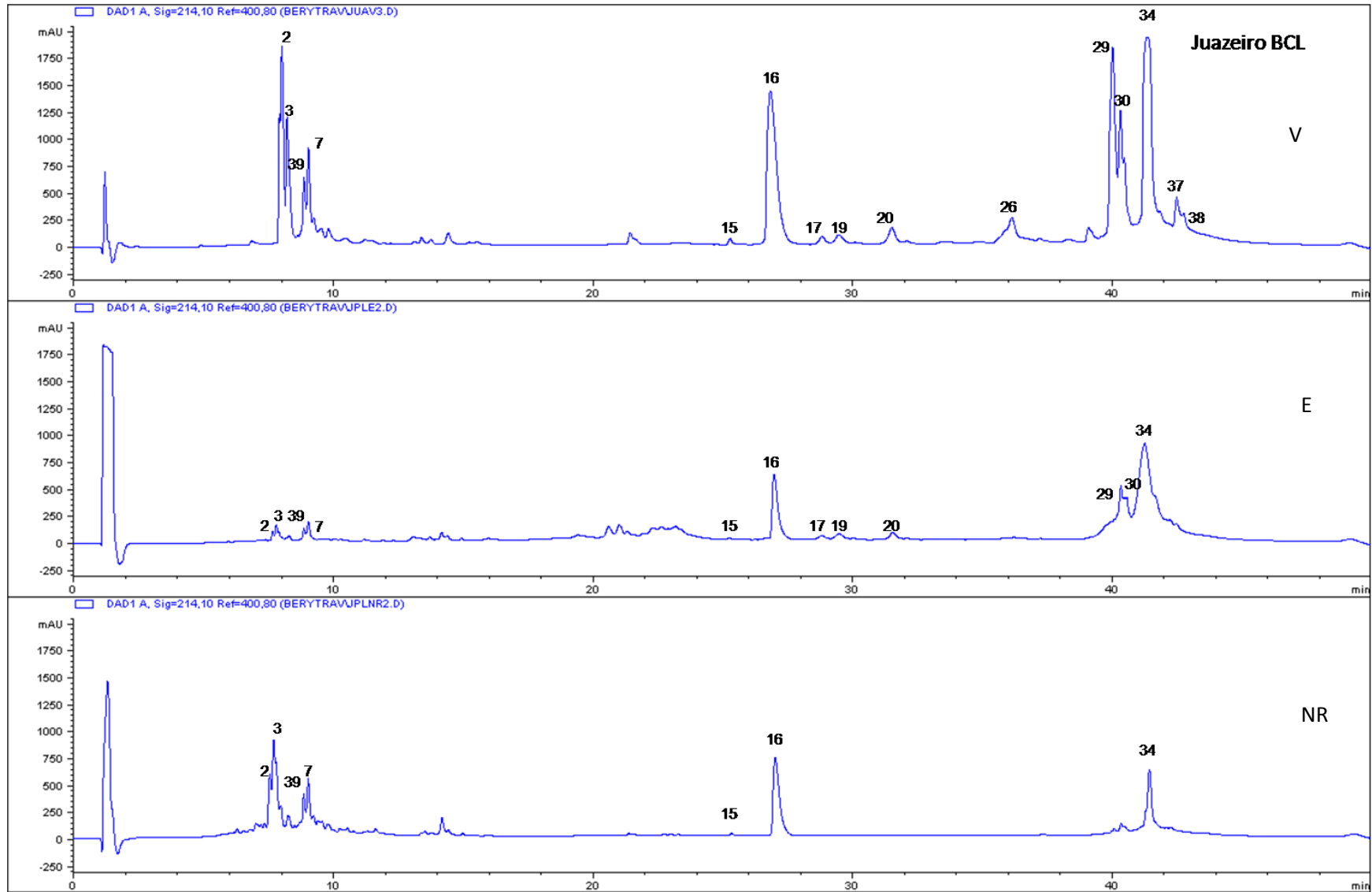


Figura 17.7

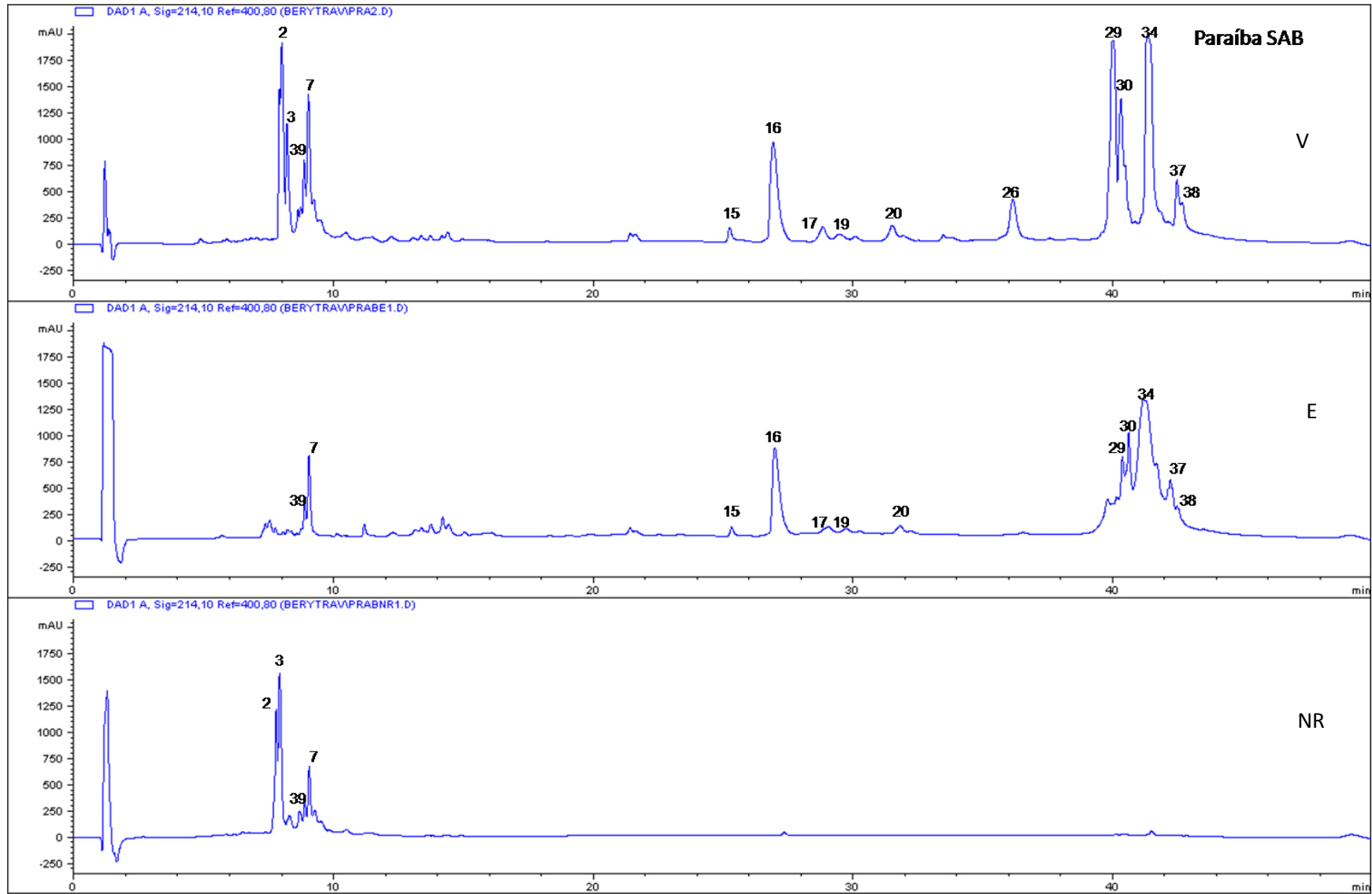


Figura 17.8

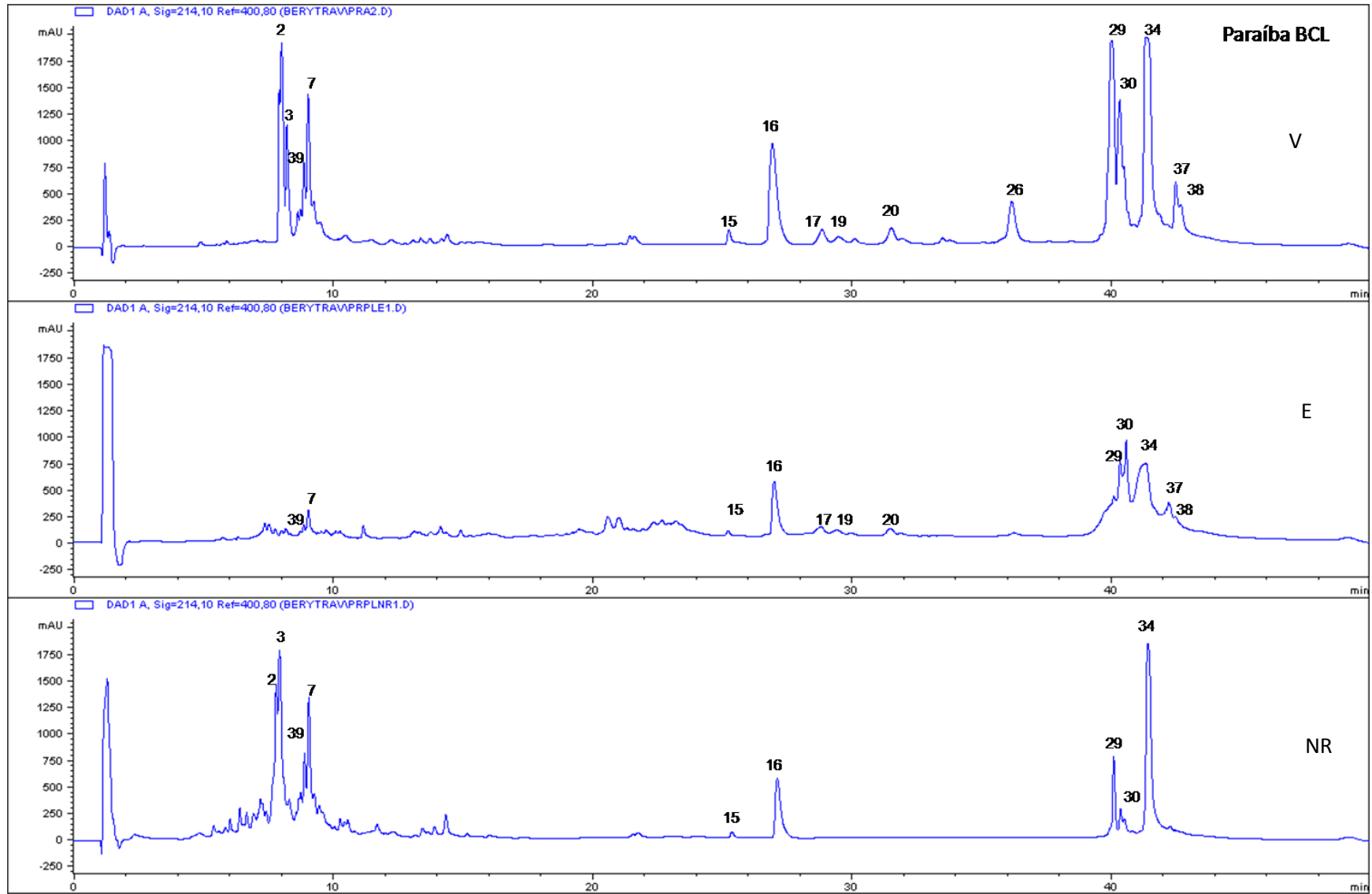


Figura 17.9

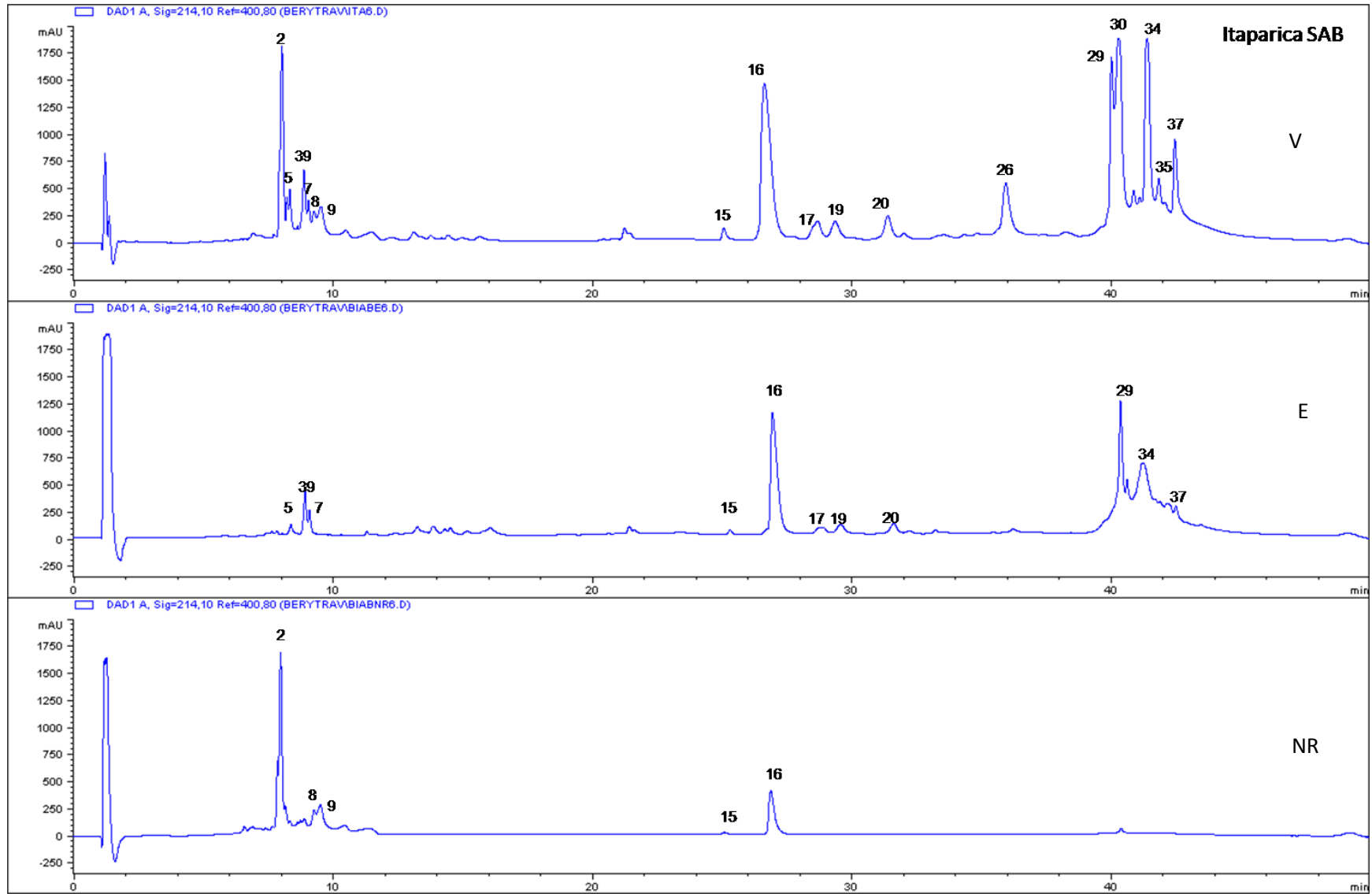
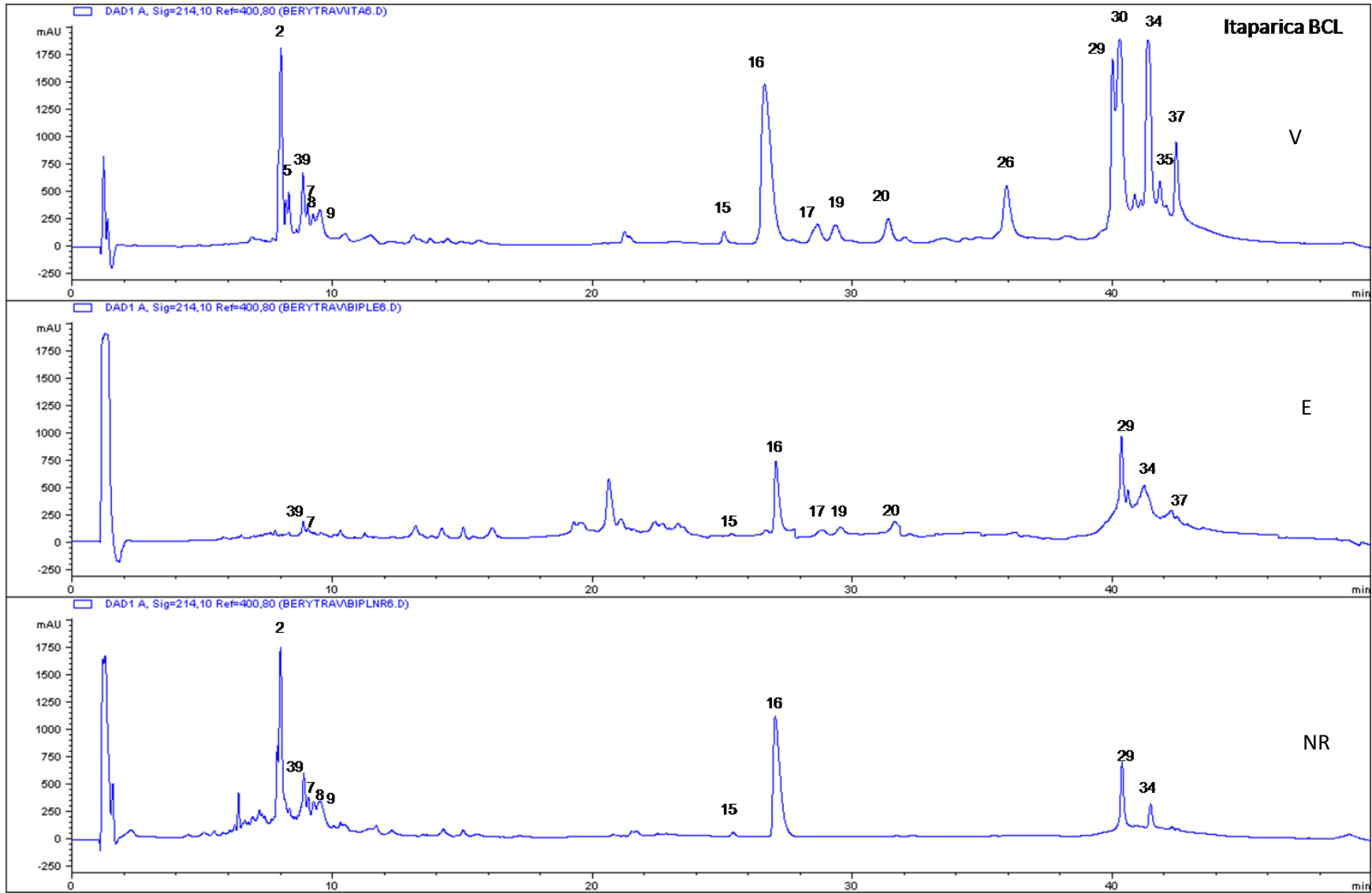
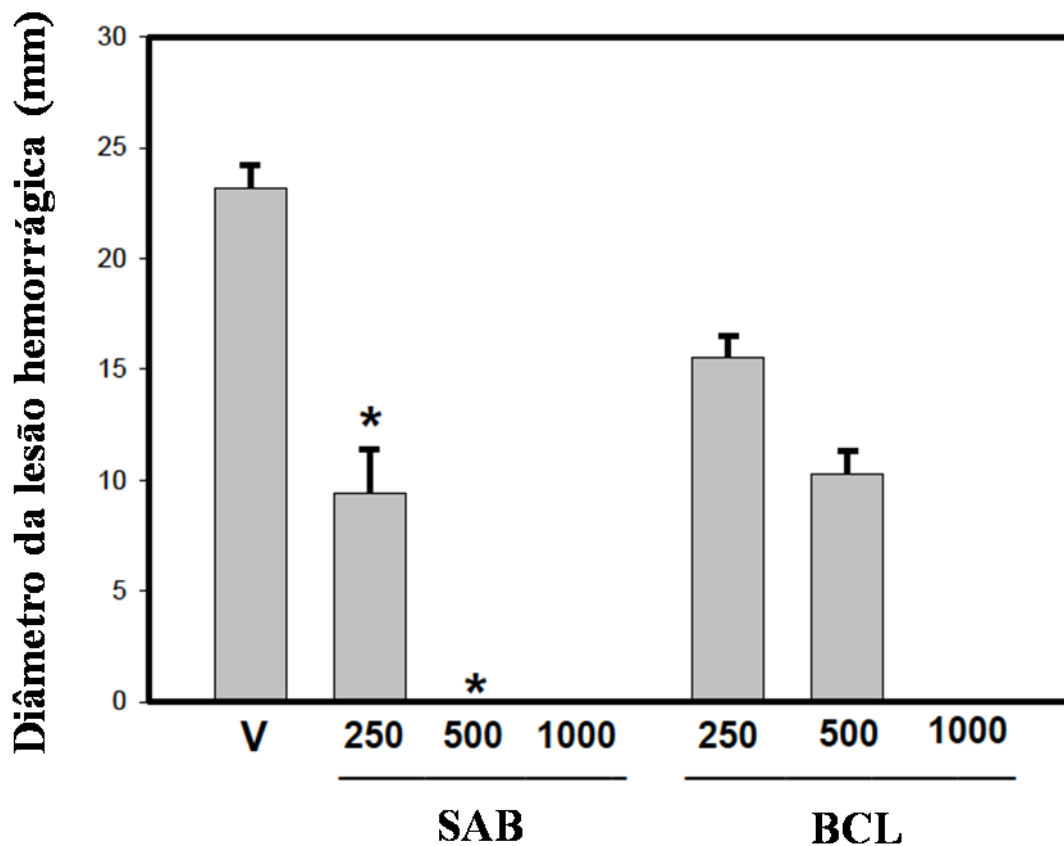


Figura 17.10



A figura 17 mostra a análise antivenômica de segunda geração do veneno de *B. erythromelas*. Picos de proteínas são marcados como na figura 15. Neste método, 50 µg de veneno foram incubados com 200 µL de antiveneno immobilizado por Sepharose. V: veneno. E: fração eluída (imunocapturada). NR: fração não retida. As numerações 17.1-17.10 exibem o perfil de reconhecimento dos antivenenos através da separação por HPLC de fase reversa. Pode-se visualizar a imunoafinidade de SAB do Ceará (17.1), Pernambuco (17.3), Juazeiro (17.5), Paraíba (17.7) e Ilha de Itaparica (17.9). E de BCL do Ceará (17.2), Pernambuco (17.4), Juazeiro (17.6), Paraíba (17.8) e Ilha de Itaparica (17.10).

**Figura 18** - Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *B. erythromelas* pelos antivenenos SAB e BCL.



Uma quantidade fixa de veneno (a partir da população Pernambuco) foi incubada com várias diluições de cada utilização do soro. Controles foram realizados com o veneno incubado com PBS. As incubações foram realizadas durante 30 min a 37 °C. Em seguida, alíquotas de 100 µl de cada mistura, contendo cinco Doses Hemorrágicas Mínimas de veneno (25 µg), foram injectadas por via intradérmica em ratos. Após 2 horas, os animais foram sacrificados e os diâmetros das lesões hemorrágicas no lado interior da pele foram medidas. V: Veneno incubadas com PBS; SAB e BCL se referem aos dois antivenenos testados; 250, 500 e 1000 correspondem às três proporções de µL antiveneno / mg de veneno testados. A hemorragia foi significativamente reduzida ou eliminada quando ( $p < 0,05$ ) em relação aos dois antivenenos e aos três doses testadas. \* Indica  $p < 0,05$  quando comparados os antivenenos SAB e BCL e uma relação antiveneno / veneno em particular.



## **DISCUSSÃO**

## 7 DISCUSSÃO

A discussão dos resultados foi organizada em duas seções principais: Proteômica do veneno das populações de *B. erythromelas* e Antivenômica e neutralização da atividade hemorrágica de *B. erythromelas* por antivenenos comerciais. A primeira seção encontra-se dividida em três: Componentes relacionados aos efeitos hipotensores na vítima de acidente ofídico, componentes majoritários e principalmente envolvidos na patogênese do envenenamento e componentes minoritários e ainda pouco estudados.

### Proteômica do veneno das populações de *B. erythromelas*

#### 1-Componentes relacionados aos efeitos hipotensores na vítima de acidente ofídico

*Peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) e o fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente (svVEGF)*

Peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) e o fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente (svVEGF) atuam de maneiras distintas no efeito hipotensor arterial do envenenamento ofídico. Nos proteomas de *B. erythromelas*, os BPPs representaram  $11,68 \pm 0,9\%$  do proteoma total e o já conhecido BBP de *B. erythromelas* [P0C7R8] de acordo com o pico 8 da tabela 1, correspondeu a  $1,1 \pm 0,3 \%$  do total de peptídeos. Enquanto que o também já conhecido svVEGF de *B.erythromelas* [Q6J936] de 14 kDa teve uma presença de  $2,1 \pm 3\%$  (pico 14, tabela 1).

Os BPPs são oligopeptídeos ricos em prolina que variam de 5 a 14 resíduos de aminoácidos (IANZER *et al.*, 2004). Estes peptídeos foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina (ECA) descritos pelo pesquisador brasileiro Sergio Ferreira, tendo sido isolados do veneno de *B. jararaca* (FERREIRA *et al.*, 1970). O BPP foi essencial para o desenvolvimento do primeiro medicamento para o tratamento da hipertensão humana, o captopril® (ONDETTI; CUSHMAN, 1981; MCCLEARY; KINI, 2013). A hipotensão frequentemente verificada após o envenenamento botrópico é em grande parte decorrente da ação inibitória destes peptídeos vasoativos (BPPs) sobre a ECA, característica que impede a geração do peptídeo vasoconstritor angiotensina II e inativação do peptídeo hipotensor, a bradicinina.

Os membros da família dos VEGF são proteínas diméricas que se ligam a receptores do tipo tirosina-quinase e estão envolvidos em uma série de processos de neovascularização como vasculogênese e angiogênese (YAMAZAKI; MORITA, 2006; (YAMAZAKI *et al.*, 2009). O indício de moléculas semelhantes ao VEGF em veneno de

serpentes (svVEGF) foi primeiramente relatado por (Komori e Sugihara, 1990) no veneno da serpente *Vipera aspis*. Estes autores verificaram uma atividade hipotensora da molécula que fora então denominada HF (Hipotensive Factor). Em seguida, a estrutura primária deste fator foi resolvida, e observou-se grande similaridade com proteínas da família dos VEGFs humanos (KOMORI *et al.*, 1999). Outros pesquisadores a partir de uma biblioteca de cDNA das glândulas de veneno da serpente *Bothrops insularis* clonaram e expressaram uma forma ativa de svVEGF capaz de promover um aumento da permeabilidade vascular (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2001). Assim, acredita-se que os svVEGFs atuem potencializando a atividade de outros componentes tóxicos dos venenos, bem como sendo coadjuvantes da atividade hipotensora verificada em alguns venenos, podendo estar envolvido na resposta local e sistêmica no envenenamento, assim como no efeito primário de imobilização da presa.

## **2-Componentes majoritários e principalmente envolvidos na patogênese do envenenamento ofídico**

### *Fosfolipase A<sub>2</sub>*

Identificou-se nos proteomas de *B. erythromelas* uma fosfolipase ácida Asp49 (D49) com massa molecular de 13652,1 Da e apresentando uma abundância relativa de 12,6 % + 2,1 (Tabela 1). Esta fosfolipase foi isolada, clonada e caracterizada há quase uma década e nomeada BE-I-PLA2, a qual apresenta alta similaridade com as PLA2 de serpentes do gênero *Bothrops*, revelando-se um potente antiplaquetário e indutor da liberação de prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) por células endoteliais (DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006). Flores e colaboradores (1993) demonstraram que o veneno de *B.erythromelas* possuía significativa atividade de FLA2 causando migração neutrofílica *in vivo* por efeito indireto, via liberação de mediadores quimiotáticos derivados do ácido araquidônico.

As enzimas Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) catalizam a hidrólise de glicerofosfolípídios na posição *sn*-2 da cadeia principal do glicerol liberando lisofosfolípídios e ácido araquidônico. O metabolismo deste último, pelas ciclooxigenases COX-1 e COX-2, origina prostaglandinas, importantes segundos mensageiros fisiológicos e mediadores de processos inflamatórios (BURKE; DENNIS, 2009). As PLA<sub>2</sub>s de veneno de serpentes do gênero *Bothrops* apresentam homologia estrutural com a PLA<sub>2</sub> secretada em mamíferos. Contudo, a grande variedade de isoformas das famílias protéicas presentes nos venenos de serpentes justifica a variedade de massas moleculares e principalmente nos efeitos biológicos encontrados. Portanto, diferentes isoenzimas das fosfolipasas A<sub>2</sub> são reportadas por causarem

hemólise, miotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, edema e atividades anti- ou procoagulante (MONTECUCCO *et al.*, 2008; DOLEY; KINI, 2009).

Venenos de viperídeos, a exemplo dos botrópicos, são ricos em fosfolipases ácidas e básicas. Dentre as fosfolipases dos venenos são reconhecidas três tipos diferentes, as clássicas, com ácido aspártico no carbono 49 (Asp49), as quais apresentam atividade catalítica, e variantes (homólogas) contendo lisina ou serina no carbono 49 (Lys49 e Ser49, respectivamente), sendo essas duas últimas enzimaticamente inativas. Independentemente de possuírem ou não atividade enzimática, as PLA<sub>2</sub> desestabilizam os fosfolipídios das membranas celulares, permitindo um influxo descontrolado de íons cálcio e sódio que promovem alterações intracelulares irreversíveis, culminando com a morte celular (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003).

As PLA<sub>2</sub>s ácidas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* têm sido pouco exploradas e ainda não estão claramente caracterizadas. Em geral, PLA<sub>2</sub> ácidas apresentam atividade miotóxica, mas esta atividade é reduzida, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em comparação com outras PLA<sub>2</sub> básicas, altamente miotóxicas (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008). As PLA<sub>2</sub> básicas têm sido comumente referidas como PLA<sub>2</sub> miotóxicas, por mostrarem dano local no músculo esquelético com drásticas alterações degenerativas e mionecróticas dentro de poucos minutos após sua injeção intramuscular em animais experimentais (GUTIERREZ; LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

Outros estudos evidenciam que a hidrólise de fosfolipídios promovida por PLA<sub>2</sub>s ácidas e básicas na membrana plasmática de células musculares esqueléticas, resulta em um influxo de cálcio, que inicia uma série de mecanismos degenerativos, como alterações no citoesqueleto, danos mitocondriais, ativação de proteases e fosfolipases dependentes de cálcio e hipercontração de miofibras, que conseqüentemente, causa mais danos celulares, levando à necrose de fibras musculares (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; 2013). Porém, consoante a um estudo anterior, o veneno de *B. erythromelas* mostrou baixa capacidade de ligação ao tecido muscular, sugerindo baixa miotoxicidade para a BE-I-PLA<sub>2</sub> (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991). Contudo, o mecanismo da miotoxicidade relatada carece de elucidação.

### *Serinoproteases*

As proteases do veneno de serpente são muito abundantes nos venenos de viperídeos, são classificadas em serinoproteases e metaloproteases, sendo os principais grupos de enzimas que levam ao desequilíbrio hemostático desempenhando um papel significativo nos efeitos patológicos observados no envenenamento de mamífero (SERRANO, 2013).

Estão presentes serinoproteases (SerProt), com massa molecular de aproximadamente 28 kDa em gel SDS-PAGE não reduzido e de 31 kDa em gel reduzido, em todos os proteomas de *B. erythromelas*, como se pode observar principalmente nos picos 17 a 21 (figura 15 e tabela 1), e identificados juntamente com outras proteínas de um mesmo pico (15 e 37) ou de maneira restrita em proteomas de algumas regiões (41 e 43). As serinoproteases de venenos de serpentes alteram os mecanismos fisiológicos do sistema hemostático incluindo alterações no sistema calicreína-cinina, no sistema complemento, na coagulação sanguínea, na agregação plaquetária e na fibrinólise. As SerProt's têm papel importante na atividade coagulante mostrada em muitos venenos de serpentes (CASTRO *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2005). O principal mecanismo das SerProt's, que contribui para a coagulação do sangue, é a degradação proteolítica do fibrinogênio para formar monômeros de fibrina, estes monômeros polimerizam parcialmente formando um coágulo instável de fibrina com a qual as plaquetas não interagem para formar o tampão plaquetário. Este mecanismo de formação de fibrina apresentado pelas SerProt's tem muitas similaridades com o mecanismo da trombina, pelo qual são denominadas *Thrombin-like* ou trombina-símile (BRAUD *et al.*, 2000; MATSUI *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2004).

As enzimas trombina-símile possuem algumas propriedades físico-químicas em comum com as serinoproteases. São proteínas de cadeia simples que apresentam uma banda de proteína única em eletroforese de gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio, sob condições redutoras, com massa molecular variando geralmente entre 26 e 67 kDa, dependendo do seu teor de hidratos de carbono. Apresentam-se ativas em substratos sintéticos específicos de trombina e compartilham similaridades com esta última. Possuem ainda diferenças na clivagem das ligações peptídicas, variações na sua sequência de aminoácidos, níveis de glicosilação e nas atividades sobre os fatores da coagulação e das plaquetas, o que poderia explicar as diferenças de massa entre as diferentes enzimas trombina símile (SERRANO; MAROUN, 2005; SERRANO, 2013).

O mecanismo da coagulopatia no envenenamento ofídico, anteriormente relatado, é atribuído à atividade desfibrinante de serinoproteases trombina-símile e/ou pela geração de trombina intravascular promovida pela protrombina e o fator X da coagulação (KINI *et al.*, 2001; ISBISTER, 2009). O veneno de *B. erythromelas* é particularmente interessante porque a atividade trombina-like não está presente (NAHAS *et al.*, 1979; MARUYAMA *et al.*, 1992), sugerindo uma maior investigação do papel farmacológico e funcional destas serinoproteases no acidente ofídico.

*Metaloproteases, Desintegrinas e Domínios tipo desintegrina e rico em cisteínas*

As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) compreendem uma subfamília de enzimas zinco-dependentes de massas moleculares variáveis (20 e 100 kDa), que têm mostrado uma variedade de papéis na patogênese do envenenamento ofídico, muitas das quais estão associadas com coagulopatia e necrose (BJÄRNASON; FOX, 1994; ZINGALI, 2004; GUTIERREZ *et al.*, 2005).

Os venenos botrópicos contêm muitas enzimas proteolíticas que degradam uma variedade de substratos naturais tais como caseína, fibrinogênio, colágeno e outros substratos sintéticos. Toxinas hemorrágicas estão entre estas enzimas que são responsáveis pela degradação proteolítica a partir da matriz extracelular ou alterações na coagulação sanguínea e precisam de um íon metálico bivalente para sua atividade. Sabe-se que as SMVP são as principais toxinas envolvidas no sangramento e necrose da pele, relacionadas com a capacidade destas em degradar as proteínas da matriz extracelular e da membrana basal (ESCALANTE *et al.*, 2011). Além das atividades hemorrágicas clássicas das SMVP em muitos Viperidae, várias outras funções também estão sendo estudadas como as atividades fibrinogenolítica, ativação de protrombina, ativação do fator X da coagulação, inibição da agregação plaquetária, atividades pro-inflamatórias, apoptose, inibição da atividade de serinoprotease (MARKLAND; SWENSON, 2013) e promoção de efeitos miotóxico e mionecrótico secundários a hipóxia tissular devido a hemorragia (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As SMVPs são agrupadas em três classes e várias subclasses, com base na adição de domínios na região C-terminal. P-I SVMPs (20-30 kDa) apresentam somente o domínio metaloprotease, comum a todas classes, com pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. P-II-SVMPs (30-60 kDa) apresentam além do domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, que esta frequentemente associado à ação proteolítica. P-III SVMPs (60-100 kDa) são consideradas como a de maior atividade hemorrágica, apresentando um domínio metaloprotease, domínio tipo desintegrina (desintegrina-símilie) e um domínio rico em cisteína (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000). Contudo, algumas SVMPs com domínios tipo desintegrina, rico em cisteína e lectina tipo-C, foram anteriormente classificadas na classe P-IV. Posteriormente identificou-se que as subunidades de sua lectina tipo-C encontravam-se ligadas por pontes de dissulfeto a uma SMVP P-III, e estas agora são classificadas como uma subclasse de enzimas P-III (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b; BALDO *et al.*, 2010). Vale ressaltar que as desintegrinas são polipeptídeos (41-100 aminoácidos) de baixo peso molecular, não enzimáticas que apresentam em geral capacidade de interação com integrinas da membrana

celular (CALVETE *et al.* 2005; MCLANE *et al.* 1998; 2004; (MARKLAND e SWENSON, 2013).

As metaloproteinases identificadas no proteoma de *B. erythromelas* foram dos tipos I e III. As PI-SMVP variaram entre 2,7% (Ilha de Itaparica) até 14,4% no proteoma da Paraíba. Enquanto que, entre as P-III SMVP identificadas, encontramos a já caracterizada Berythactivase [Q8UVG0] com curiosa atividade potente sobre a protrombina, sem apresentar atividade hemorrágica (SILVA *et al.*, 2003), a qual se apresentou como componente majoritário em todas as regiões estudadas, representando de 29,8 a 45,5% (Figuras 3 e 4) do total do proteoma e sendo mais abundante no veneno de *B. erythromelas* da Ilha de Itaparica (Figura 15E). Berythactivase [Q8UVG0] com uma massa de aproximadamente 55 kDa, exibiu alta similaridade com as moléculas identificadas nas frações 29 (66kDa) e pico 34 (52 kDa) de *B. jararaca* [Q0NZY0] e *B. jararaca* [P30431], respectivamente (Tabela 1).

Não se identificou no proteoma de *B. erythromelas* metaloproteinases da classe II. Vários autores concordam que as PII-SMVP e algumas PIII-SMVP sofrem processamento proteolítico liberando dois domínios: o domínio catalítico do tipo SMVP-PI e o de desintegrina ou de domínios tipo disintegrina e rico em cisteínas, este último de chamado de DC (KINI e EVANS 1992) e de atividade biológica pouco esclarecida. Em relação às desintegrinas derivadas das metaloproteinases da classe II, estas representam um grupo de antagonistas de receptores da família das Integrinas, (como por exemplo, ao receptor  $\alpha IIb\beta 3$  (CALVETE 2005; CALVETE *et al.* 2005; RÁDIS-BAPTISTA, 2005) e estão relacionadas com as atividades inibidoras de agregação plaquetária (KINI; EVANS 1992; CALVETE 2005). Recentemente, a clonagem de uma desintegrina recombinante (RTS-jerdostatin) a partir de veneno da glândula mRNA de *Protothrops jerdonii* permitiu que Bolás e colaboradores (2014) demonstrassem seu efeito inibidor na função da integrina  $\alpha 1\beta 1$  (altamente expressa em células de músculo liso) durante adesão, migração e proliferação de células da aorta de músculo liso de rato e angiogênese, ampliando dessa forma as possibilidades para aprofundar pesquisas relacionadas a terapia do câncer.

Seguindo a linha de raciocínio supracitada, o achado de moléculas de desintegrina (Figura 15: frações 7 e 10) indica que PII-SMVP mRNAs foram traduzidas e proteoliticamente processada na glândula de veneno (KINI; EVANS, 1992). Embora tenham representado  $5,3 \pm 1,9\%$  das proteínas totais de veneno, nenhuma prova foi recolhida no proteoma dos venenos estudados para a presença de PII-SVMPS, o que permanece obscuro. No entanto, é importante referir que esta classe de metaloproteinases raramente ocorre em

venenos de serpente e, assim, a possibilidade de que o processamento proteolítico dá origem a um domínio de proteinase instável e um domínio desintegrina estável (Fox e Serrano, 2008) merece mais investigação. Reforçando esta hipótese, todos os proteomas dos venenos de *B. erythromelas* continham conservado o fragmento DC [Q8UVG0], ou seja, a desintegrina-símile com domínio rico em cisteína isolado da PIII- SMVP berythreactivase [Q8UVG0], como se pode ver na Tabela 1 e Figura 15 em relação as frações 11 e 30, respectivamente.

### *Lectinas do tipo C*

Lectinas têm sido encontradas nas peçonhas de diversas serpentes da família Viperidae, Elapidae and Crotalidae (DOLEY; KIN, 2009). Conforme características estruturais e atividades biológicas, essas proteínas contém um domínio de reconhecimento de carboidratos e que se ligam especificamente à lactose/galactose, chamadas de lectinas tipo-C (LTC), ou as que não reconhecem carboidratos por apresentarem domínio de reconhecimento incompleto ou ausente, mas apresentam grande conservação estrutural, sendo assim classificadas como LTC-símile; lectinas tipo-C-símile (semelhantes ou relacionadas) (MORITA *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2005). Em recente nomenclatura, LTC-símile de venenos de serpentes são conhecidas por Snaclecs (lectinas tipo-C de venenos de serpentes) (CLEMETSON *et al.*, 2010; ARLINGHAUS e EBLE, 2012).

Em contraste com as LTC, que são proteínas homodiméricas, as Snaclecs apresentam estruturas quaternárias (dímeros  $\alpha\beta$ , dímeros de dímeros  $(\alpha\beta)_2$ , tetrâmeros de dímeros  $(\alpha\beta)_4$ ) (MORITA, 2004; 2005; ARLINGHAUS; EBLE, 2012). Geralmente possuem uma estrutura básica de heterodímeros  $(\alpha\beta)$ , de massa variável 14-15 kDa para a cadeia A/subunidade  $\alpha$  e 13-14 kDa para a cadeia B/subunidade  $\beta$ , ligadas covalentemente por pontes dissulfeto ou oligômeros de heterodímeros (MORITA, 2004, 2005) e não apresentam o clássico *loop* de ligação a açúcar/cálcio e possuem a habilidade de interagir com fatores de coagulação e receptores de membranas nas plaquetas (LU *et al.*, 2005; CLEMETSON, 2010).

Snaclecs de *B. erythromelas* exibem uma estrutura heterodímeros  $(\alpha\beta)$  e são abundantes particularmente nas populações do Ceará (21,6%), Pernambuco (18%) e Juazeiro (17,2%) (Figura 16; Tabela 1). Estas toxinas, que não apresentam atividade enzimática, apresentam uma diversidade de atividades biológicas pro ou anti - agregante de plaquetas independente de cálcio, podendo agir nos fatores da cascata de coagulação IX/X das vítimas do envenenamento, alterando a hemostasia e utilizando para isso diversos mecanismos (LU *et al.*, 2005; MATSUI; HAMAKO, 2005, GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b). Promovem eventos que levam a trombocitopenia, pois reduzem a função plaquetária por inibição de receptores de



superfície, através da ligação aos receptores de von Willebrand, às glicoproteínas GPIb e aos receptores de colágeno do tipo integrina  $\alpha 2\beta 1$  ou ativam de forma maciça plaquetas com interação ao receptor do colágeno GPVI, após ativação estas plaquetas são removidas da circulação por um mecanismo não elucidado (LU *et al.*, 2005; MATSUI; HAMAKO, 005, GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b).

### 3-Componentes minoritários e ainda pouco estudados

#### Nucleotidases

Nucleotidases (5'-nucleotidase, ATPase, ADPase), nucleases (fosfodiesterase PDE, DNases, RNases), fosfotases (fosfomonoesterase ácidas e alcalinas) são hidrolases relatadas como precursores endógenos envolvidos na geração de purinas implicadas no envenenamento, as quais podem também ter sua origem no próprio veneno fazendo parte de sua composição como purinas livres (adenosina, guanosina e isosina) (AIRD 2002; FERREIRA, 2006; SALES; SANTORO, 2008). As purinas aparentemente ligam-se a outras toxinas que então servem como “acompanhantes” orientando e depositando-as a um subtipo específico de receptor purinérgico (AIRD, 2002; 2005).

Apesar de suas atividades farmacológicas não estarem claramente definidas, as nucleotidases são encontradas na maioria dos venenos de serpentes e podem atuar como inibidores da agregação plaquetária (OUYANG; HUANG, 1983; MITRA e BHATTACHARYYA, 2014), sendo uma metaloproteína zinco-dependente (FINI, *et al.*, 1990).

Fosfodiesterase (PDE), identificada com massa molecular de 97 kDa nos venenos de *B. erythromelas* da população do Ceará (0,4%) e de Pernambuco (0,4%) (fração 27, Tabela 1, Figuras 15/16 A e B), é um componente que remove 5'-mononucleotídeos sucessivos da cadeia de polinucleotídeos começando pelo terminal 3'-hidroxila e fornece uma constante de substrato para a 5'-nucleotidase endógena de venenos (MITRA; BHATTACHARYYA *et al.*, 2014). Essa exonuclease é uma das enzimas mais estudadas, amplamente distribuída entre os venenos de serpentes peçonhentas como componentes minoritários. Geralmente é usada para estudos da degradação de ácidos nucléicos e tem papel na regulação da concentração de nucleótidos cíclicos de cAMP e cGMP nas células, catalisam a hidrólise de DNA e RNA, adenosinatrifosfato (ATP) e adenosinadifosfato (ADP). No entanto seu papel na patogênese do envenenamento não está claramente compreendido (TRUMMAL *et al.*, 2014).

Em relação a 5'-nucleotidase, esta foi caracterizada apenas no proteoma do veneno de *B. erythromelas* de Juazeiro (fração 24, Tabela 1, Figuras 15/16 C), com uma massa de 66

kDa e assim como a PDE representa um componente minoritário (0,5%). É uma fosfomonoesterase específica de massa molecular variável entre 53-82 kDa, que hidrolisa fosfato monoéster que se liga na posição 5' de DNA e RNA. Diferentes mononucleotídeos podem ser hidrolisados, mas 5'-AMP é o substrato mais susceptível. A enzima não hidrolisa 3'-AMP, p-nitrofenilfosfato e ribose-5'-fosfato, que são substratos de fosfomonoesterases não-específicas (IWANAGA; SUZUKI, 1979).

Em uma revisão realizada por Aird (2002) foi relatado que as purinas da peçonha poderiam estar envolvidas nas três estratégias fundamentais de envenenamento ofídico e que parecem ser empregadas por todas as serpentes venenosas e que operam simultaneamente. Postulando que os componentes individuais do veneno freqüentemente participam em mais de um desses processos que consistem em hipotensiva, paralisante e digestiva. As duas primeiras são estratégias de imobilização da presa. Ambas têm por objetivo impedir a fuga da presa (a maioria dos Viperidae), ou superar a resistência da presa (muitos Elapidae e todos os Colubridae). A terceira estratégia promove a degradação dos tecidos da presa que começa a partir da inoculação do veneno, antes mesmo que a presa tenha sido engolida.

Purinas como a adenosina são relatadas para um efeito hipotensor (DRURY; SZENT-GYÖRGYI, 1929; FISCHER; DORFEL, 1954), atuando sobre o coração, causando vasodilatação, e aumento da permeabilidade microvascular através da indução da libertação do conteúdo de mastócitos (COLLIS, 1989; OLSSON, PEARSON, 1990; GAWLOWSKI; DURÁN, 1986; BIAGGIONI, 2004). Além de exercer efeito sobre neurônios periféricos e centrais com a inibição da liberação de neurotransmissores (AIRD, 2002; DHANANJAYA; SOUZA, 2010; SILINSKY, 1984; 2004) o que poderia contribuir juntamente com a sensação de dor forte, para a imobilização da presa. A adenosina é um potente inibidor de agregação plaquetária, provavelmente atuando em A<sub>2A</sub> e de A<sub>2B</sub> (JOHNSTON *et al.*, 2011) contribuindo para desenvolvimento de hemorragia no local proeminente, que tem sido atribuída principalmente a um conjunto de metaloproteases presentes no veneno (GUTIÉRREZ *et al.*, 2011; ESCALANTE *et al.*, 2011).

Ferreira (1996) ao caracterizar nucleotidases de *B. jararaca* constatou o aumento na concentração de adenosina com conseqüente diminuição das concentrações de ATP e ADP, promovido pelo sistema de nucleotidases, sugerindo que pode estar relacionado com o desenvolvimento de edema e disfunção plaquetária observada na região da picada durante o envenenamento, levando a um aumento de difusão dos componentes do veneno causado pelo aumento na permeabilidade vascular, contribuindo para o efeito sistêmico do envenenamento.

Essa relação das purinas na patogênese do envenenamento é reforçada por estudo recente realizado por Caccin e colaboradores (2014) que sugeriram a coexistência evolutivamente conservada no mesmo veneno de *B. asper* de miotoxinas e nucleotidasas, pois com a ação de PLA<sub>2</sub> miotóxica ocorria liberação de ATP no músculo esquelético, o qual constituía um sinal para difundir a lesão muscular causada pelas miotoxinas e dor. A hidrólise do ATP por nucleotidasas (ATPases) age produzindo adenosina que irá estimular os receptores purinérgicos, exercendo em seguida uma variedade de efeitos, incluindo: hipotensão, inibição da liberação de neurotransmissor com paralisia periférica, hipotensão através de uma ação sobre o coração e aumento das dimensões e da vasculatura, permeabilidade, e inibição da agregação de plaquetas que favorece a hemorragia. Além de ocorrer liberação mitocondrial de mediadores pro-inflamatórios “alarmins”, reportados por Zornetta e colaboradores (2012) da resposta imunitária inata promovidos pelas miotoxinas.

#### Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP)

As proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP) dos venenos de serpentes contêm 16 resíduos de cisteínas que formam oito pontes dissulfeto e possuem massa molecular de 20-30 kDa (MACKESSY, 2002; YAMAZAKI; MORITA, 2004; ROKITA *et al.*, 2011). Estão amplamente distribuídas nos venenos de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae de diferentes continentes (YAMAZAKI *et al.* 2003), inclusive no veneno de lagartos (FRY *et al.* 2002; 2010) e serpentes do gênero *Bothrops* (CARDOSO *et al.*, 2010; CIDADE *et al.*, 2006; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO & HO, 2002; VALENTE *et al.*, 2009). No entanto, no proteoma de *B. erythromelas*, CRISP (pico 40, Fig 15B, Tabela 1) foi identificada somente na população dos espécimes de Pernambuco, com uma massa de 28 kDa e com uma baixa abundância relativa (0,4%).

Apesar das propriedades funcionais das CRISPs no envenenamento estarem pouco compreendidas, em investigação recente realizada por Adade e colaboradores (2014), demonstraram pela primeira vez atividade antiprotozoária de uma CRISP isolada da serpente *Crotalus viridis viridis*, chamada de crovirin, a qual inibiu a proliferação das formas intracelulares amastigotas em *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, conduzindo pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes contra estes parasitas. Lecht e colaboradores (2015) isolaram uma CRISP de *Echis carinatus sochureki* (Viperidae) com atividade anti-angiogênica, por inibir alguns fatores reguladores da angiogênese (fator de crescimento transformante- $\beta$ ; TGF- $\beta$  ; trombospondina 1; TSP-1), estudo esse que pode ser

útil para a concepção de uma terapia angiostática no tratamento de câncer, bem como para a compreensão de alguns dos mecanismos envolvidos na progressão dependente da angiogênese do tumor.

Estudos sobre o papel das CRISPs de venenos de animais as reportam como bloqueadoras de canais iônicos e inibidoras da contração muscular (YAMAZAKI; MORITA, 2004; MATSUNAGA *et al.*, 2009). CRISPs de venenos de serpentes atuam afetando a contratilidade muscular através do bloqueio da atividade de canais de cálcio do tipo L e de canais de potássio voltagem-dependentes. E ainda promovem o bloqueio de canais iônicos cíclicos de nucleotídeos fechados, estes últimos conhecidos por canais de GNV são canais iônicos que funcionam em resposta à ligação de nucleotídeos cíclicos (YAMAZAKI *et al.*, 2002a; 2002b; 2003; BROW *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2004; 2005).

### Fosfolipase B

Fosfolipases B (PLB) representam enzimas da superfamília das fosfolipases capazes de realizar a clivagem das ligações *sn-1* e *sn-2* de glicerofosfolipídios, apresentando ação fosfolipídica e lisofosfolipídica, desacilando completamente os seus substratos. Doery e Pearson (1964) foram os primeiros a reportarem a ocorrência de PLB em venenos de serpentes nas formas monoméricas e diméricas com massas moleculares de cerca de 16 kDa e 35 kDa, respectivamente, no entanto suas estruturas não estão descritas. Segundo estudos realizados por Takasaki e Tamiya (1982) e Bernheimer e colaboradores (1986; 1987) com venenos de serpentes Elapidae australianas, caracterizam a PLB como responsável pela alta atividade hemolítica direta. Estas enzimas (pico 28) foram encontradas no proteoma de *B. erythromelas* de Ceará (<0,1%), Juazeiro (0,5%) e Ilha de Itaparica (<0,1%), como se pode verificar nas figuras 15 ou 16 (A, C e E) com massas moleculares aparentes respectivamente de 100, 80, e 48 kDa (Tabela 1).

O primeiro membro de uma família de PLB de alto peso molecular, aproximadamente 60 kDa, foi descrito em uma serpente australianas, *Drysdalia coronoides*, da família Elapidae (CHATRATH *et al.*, 1987). Estas enzimas, exibiram maior semelhança com a PLB [F8S101] identificada, tanto no transcriptoma da glândula de veneno conforme Rokyta e colaboradores (2011), quanto no proteoma do veneno, de acordo com Margres e colaboradores (2013) da cascavel de *Crotalus adamanteus*. Assim como para os demais componentes minoritários do veneno de *B. erythromelas*, 5'-NT e PDE, que exibiram maior similaridades com as nucleotidasas caracterizadas nesta serpente (Tabela 1).

Nessa mesma linha de pensamento, a análise proteômica comparativa recente dos venenos de *B. atrox*, *B. jararacussu*, *B. jararaca*, *B. neuwiedi*, *B. alternatus* e *B. cotiara*, identificaram moléculas de PLB nestas seis espécies (SOUSA *et al.*, 2013), o que sugere fortemente que esta classe de toxinas pode ser mais amplamente distribuído na Viperidae do que se pensava. A participação desta nova classe de proteínas nos envenenamentos, causando hemólise e, eventualmente, contribui para a insuficiência renal aguda, exige futuros estudos detalhados.

### **Antivenômica e neutralização da atividade hemorrágica de *B. erythromelas* por antivenenos comerciais.**

A antivenômica é uma metodologia que vem sendo aperfeiçoada para estudar a imunoreatividade entre venenos e antivenenos. Essa necessidade cresceu em consequência das limitações de metodologias pré-existentes para esse tipo de análise como o Western Blot e protocolos de ELISA (PLA *et al.*, 2012). A reatividade imunológica das toxinas do veneno de *B. erythromelas* para o antiveneno antibotrópico (SAB) produzido pelo Instituto Vital Brasil (IVB), Niterói- RJ (RAW, 1991) e para o antiveneno polivalente (BCL) do Instituto Clodomiro Picado (ICP), San José - Costa Rica (ANGULO *et al.*, 1997; ROJAS *et al.*, 1994) foi avaliada por cromatografia de imunoafinidade combinada com técnicas proteômicas (CALVETE, 2011) que constitui a segunda geração da antivenômica (PLA *et al.*, 2012).

Perdas na quantidade total de veneno final em relação à inicial (veneno total) são previstas pela técnica, por motivos de manipulação da amostra. A quantificação realizada para o protocolo da segunda geração da antivenômica, consta da porcentagem de uma fração retida (R) ou não retida (NR). É calculada por sua razão com a soma da área do mesmo pico em questão nas duas frações provenientes da coluna ( $R/[R+NR]$  ou  $NR/[R+NR]$ ). Ou seja, a área total de um pico não é considerada como a área do pico que aparece no cromatograma do veneno total, e sim da soma das áreas do mesmo que aparecem nas frações não retidas e eluída da coluna, compensando assim as possíveis perdas que em teoria acontecem de forma proporcional em ambas as frações (PLA *et al.*, 2012; GONÇALVES-MACHADO, 2014). O cromatograma do veneno total é exposto apenas para comparação dos resultados.

O reconhecimento dos antivenenos SAB ou BCL frente às cinco populações foi similar, mas demonstrou algumas diferenças no reconhecimento de moléculas específicas. A coluna de afinidade contendo o anti-botrópico F(ab')<sub>2</sub> fornecido pelo Instituto Vital Brasil imunocapturou a maioria das toxinas do veneno de *B. erythromelas* (Fig. 17.1), mas não

apresentou imunorreatividade contra os BPPs das frações eluídas (retidas) 1-3, 8 e 9, reconhecimento parcial ( $71,2 \pm 4,7\%$ ) frente a fração 16 da PLA2-D49 ácida [Q2HZ28] (fração 16). A fração 29, que provavelmente corresponde a uma PI-SVMP mostrou reconhecimento de  $93 \pm 4\%$ , e reconhecimento de quase a totalidade da maioria das metaloproteases e lectinas do tipo C entre os picos 29-38. No entanto a fração 26, que corresponde em sua maioria de PIII-SVMP, parece ter ficado retida na coluna, pois não foi visualizada nos cromatogramas das frações retidas que foram eluídas e tampouco no da não retida (Figuras 17.1). Em contrapartida, o antiveneno polivalente da Costa Rica mostrou a mesma falta de reatividade contra BPPs, além disso, a imunorreatividade não foi eficiente para: desintegrina (pico 7,  $33 \pm 11\%$  retido), [Q2HZ28] (fração 16,  $37,4 \pm 12,9\%$  retido), PI-SMVP (fracção 29;  $61,2 \pm 3,8\%$  retido), e PIII-SVMPs eluidos nas frações 30 ( $62,8 \pm 8,5\%$  retido) e 34 ( $60,3 \pm 12,5\%$  retido) (Fig.17.2). Estes resultados estão em concordância com um estudo de Queiroz e colaboradores (2008), em que o soro antibotrópico do Instituto Butantan foi avaliado para sua capacidade de neutralizar as atividades letais e tóxicas dos venenos de 19 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. Este estudo relatou que o soro anti-botrópico apresentou títulos intermediários de anticorpos para o veneno de *B. erythromelas*, entre outras *Bothrops*, e foi ineficiente para reduzir a atividade de sua PLA2. Além disso, por análise de transferência de Western, o SAB mostrou ligação prejudicada para as bandas das proteínas de 25 kDa da PI-SMVP) e 16 kDa da PLA2 (QUEIROZ *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram relatados por Sousa e colaboradores (2013) os quais evidenciaram que as SVMPs da classe III foram às toxinas mais antigênicas dos venenos de serpentes do complexo *Bothrops*, enquanto que as SVMPs da classe I, serinoproteínases, PLA2, desintegrinas e peptídeos potencializadores de bradicinina foram fracamente reativos com os anticorpos do SAB.

Em relação ao antiveneno poliespecífico costarriquenho, uma série de estudos realizados sobre a sua capacidade de neutralização pré-clínico contra várias atividades tóxicas e enzimáticas de venenos de serpentes da família Viperidae mostrou um padrão generalizado de reatividade imunológica contra venenos homólogos e heterólogos, incluindo *B. lanceolatus*, *B. caribbaeus*, *B. atrox* e *B. colombiensis* (GUTIERREZ *et al.*, 2008; CALVETE *et al.*, 2011; CALVETE *et al.*, 2009), que se correlaciona com a sua capacidade de neutralizar as atividades letal, hemorrágica, miotóxica, coagulante, desfibrinante, fosfolipase A2 e de proteases de venenos de um número de espécies de serpentes da América do Sul e Central. Em analogia com o antiveneno da Costa Rica, este exibiu somente o imunoreconhecimento parcial ou insignificante, para peptídeos vasoativos de baixa massa molecular, desintegrinas, e algumas fosfolipase A2, metaloproteínases PI e serineproteínases (GUTIERREZ *et al.*, 2014).

De acordo com o embasamento teórico, as frações peptídicas dos venenos possuem baixa imunogenicidade e por isso não são bem depletadas pelos antivenenos (LOMONTE *et al.*, 2008; PLA *et al.*, 2013), então era esperado que as primeiras frações do veneno não fossem bem reconhecidas, já que se sabe que. Vale ressaltar que, Pla e colaboradores (2013) afirmam que do ponto de vista fisiopatológico do envenenamento, o escape no reconhecimento desses tipos de frações não se manifestaram como relevantes em um estudo com o gênero *Lachesis*. Os resultados com as populações de *B. erythromelas*, indicam que componentes do veneno toxicologicamente relevantes são intrinsecamente pouco imunogênicos. A imunoreatividade do antiveneno da Costa Rica mostra-se ineficaz para as toxinas do veneno de *B. erythromelas* altamente imunogênicas, tais como PIII-SVMPs, indicando a existência de uma distância filogenética em *Bothrops* e limitando reconhecimento imune eficaz. Por outro lado, o protocolo do *pool* de imunização dos equinos para produção do soro antibotrópico no Brasil inclui as espécies de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* (RAW *et al.*, 1991). É muito provável que o fato dessa mistura de venenos ser utilizada no protocolo de imunização contribua para ampliar o espectro de abrangência do antiveneno. No entanto a imunoreatividade contra a PLA<sub>2</sub> (com exceção à da Paraíba, Figura 17.7) parece ainda não ser totalmente eficaz.

Apesar do anteriormente exposto, ambos os antivenenos foram eficazes na neutralização da atividade hemorrágica, através da Dose Mínima Hemorrágica (5X DMH: estimada em 5 µg) do veneno de *B. erythromelas*, embora tenham mostrado diferenças na sua eficácia de neutralização. SAB mostrou uma maior eficácia, uma vez que a neutralização completa foi atingida com uma relação antiveneno / veneno de 500 µL/mg, enquanto que uma proporção de 1000 µL antiveneno / mg de veneno foi necessária para o antiveneno BCL para neutralizar completamente esta atividade (Figura 18). Em relação ao supracitado, mesmo uma capacidade de imunocaptura moderada das moléculas do veneno (de proximadamente 20-25%) correlacionar-se com um bom resultado em *in vivo* em testes de neutralização (GUTIERREZ *et al.*, 2014), a comparação dos níveis de reconhecimento imunológicos a partir de estudos com antivenômica e com a capacidade de neutralização *in vivo* de um antiveneno não é simples, já que ambos os experimentos envolvem protocolos radicalmente diferentes. No entanto, a combinação das informações da neutralização *in vivo* e estudo de antivenômica pode ser útil para a concepção de misturas de imunização adequada de veneno, e estratégias para aumentar a resposta de anticorpo de cavalos contra componentes do veneno, toxicologicamente relevantes fracamente imunogênicos, a fim de gerar melhores antivenenos poliespecíficos.

## **CONCLUSÕES**



## 8 CONCLUSÕES

Através desse trabalho foi demonstrado que os proteomas dos venenos das *Bothrops erythromelas* das diferentes regiões do Nordeste são similares e parecem ser bastante conservados de acordo com sua distribuição geográfica, embora contenham diferenças peculiares, tais como a presença de CRISP detectadas apenas nos venenos de Pernambuco e da 5ª NT na população de Juazeiro. Assim como PDEs nos proteomas das populações de Ceará e Pernambuco e PLB em Ceará, Juazeiro e Ilha de Itaparica. Comparando as cinco populações, pode-se visualizar uma maior quantidade de peptídeos potencializadores de bradicinina no proteoma da Paraíba, fosfolipase A2 ácida (Asp49/D49) em Juazeiro, serinoprotease na Ilha de Itaparica, Lectina do Tipo- C no Ceará, metaloproteinase da classe I na Paraíba, metaloproteinase da classe III na Ilha de Itaparica.

Observando-se individualmente, tem-se a metaloproteinase da classe III predominante em todos os proteomas, seguida da lectina do tipo C (Ceará, Pernambuco e Juazeiro) ou em alguns casos (Paraíba e Ilha de Itaparica) dos peptídeos potencializadores de bradicinina, seguindo como terceiro componente mais abundante em todos a fosfolipase A2.

O reconhecimento dos antivenenos SAB ou BCL frente às cinco populações foi similar, mas demonstrou algumas diferenças no reconhecimento de moléculas específicas. Ambos os antivenenos não apresentaram imunorreatividade contra os BPPs e mostraram reconhecimento parcial da PLA2, com exceção para o veneno da Paraíba na coluna de SAB. Além disso, a imunorreatividade não foi eficiente para desintegrina em relação ao antiveneno da BCL. No entanto, no estudo da neutralização da atividade hemorrágica de *B. erythromelas*, os antivenenos foram eficazes na neutralização dessa atividade independente das diferenças na sua eficácia de neutralização.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Variação composicional intraespecífica de venenos entre espécimes de diferentes regiões geográficas tem sido muito apreciada por herpetologistas e toxinologistas como uma característica geral das espécies de serpentes altamente adaptáveis e amplamente distribuídas (VELLARD, 1937;1939; CHIPPAUX *et al.*, 1991; CALVETE, 2013). Essas variações podem resultar em diferentes sintomatologias, após o envenenamento, exigindo diferentes cuidados (GLENN e STRAIGHT, 1978) e a tecnologia da proteômica é importante para traçar as diferenças do perfil do conteúdo protéico e peptídico a nível molecular (MASSEY *et al.*, 2012).

Estudos proteômicos permitem o conhecimento da composição e possíveis variações interespecie e intraespecie o que é relevante para a pesquisa básica, implicações na evolução de espécies, nos efeitos do envenenamento e na seleção dos antissoros e de espécimes para a produção destes últimos.

*B. erythromelas* é um exemplo de espécie de importância médica no Nordeste, e apesar de esta em uma abrangente área geográfica, as cinco populações estudadas apresentaram composição semelhante, exibindo um perfil altamente conservado das classes das proteínas representativas do veneno. Além de mostrar reconhecimento imunogênico similar. A paraspecificidade exibida pelo SAB brasileiro e pelo BCL da Costa Rica contra as toxinas do veneno de *B. erythromelas*, e contra uma série de venenos botrópicos da América do Sul e Central (BOGARÍN *et al.*, 2000) indica grande conservação dos epítomos imunoreativos dos venenos de *Bothrops*.

Portanto, este estudo evidenciou as proteínas de *B. erythromelas* já caracterizadas na literatura (BPP, PLA2 Asp49, Berytracvase e VEGF) e forneceu informações adicionais para a presença de serinoproteases e lectinas do tipo C e de outros componentes minoritários ou específicos (PDE, 5'NT, PLB, CRISP), o que também reforça as chances de explorar farmacologicamente estes constituintes e quiçá abrir a possibilidade de gerar antiveneno anti-botrópico de amplo espectro, com uma cobertura representativa para todas as classes de toxinas clinicamente relevantes.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**. v. 40, p, 335–93, 2002.

AIRD, S. D. Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. Part B, Biochem. Mol. Biol.** v. 140, n. 1, p.109-26, 2005.

AIRD, S. D. The role of purine and pyrimidies nucleosides in snake venoms. In: Mackessy SP, editor. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, Florida, USA: **CRC Press, Taylor and Francis**, p. 393–422, 2010.

ALAPE-GIRON , A, FLORES-DIAZ, M, SANZ, L, MADRIGAL, M, ESCOLANO, J, SASA, M, CALVETE J. J. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. **Toxicon**, v. 1, n. 54, p. 968-48, 2009.

ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; JACINTO, C. N.; JUNIOR, G. B. S.; LIMA, J. B.; VERAS, M. S. B.; DAHER, E. F. **Rev. Inst. Med. Trop.Sao Paulo**. v. 55, n. 5, p. 295-301, 2013.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignmentsearchtool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-10, 1990.

AMARAL, A. New Genera and Species of Snakes. **Proceedings of the New EnglandZoological Club**, v.8, p.85-105, 1923.

ANGULO, Y.; EESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Clinical and laboratoryalterations in horsesduringimmunizationwithsnakevenomsforthe production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. **Toxicon**, v. 35, p.81-90, 1997.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**. v. 54, n. 7, p. 949–957, 2009.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 512-9, 2012.

BARBOSA, P.S.; HAVT, A.; FACO P.E.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I.S.; FONTELES, M.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MONTEIRO, H.S.. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**. V.40, nº10, p.1427-35, 2002.

BERNHEIMER, A. W.; LINDER, R.; WEINSTEIN, S. A.; KIM, K. S. Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of Collett's snake, *Pseudechis colletti*. **Toxicon**. v. 25, p.547-54, 1987.

BERNHEIMER, A. W.; WEINSTEIN, S. A.; LINDER, R. Isoelectric analysis of some Australian elapid snake venoms with special reference to phospholipase B and hemolysis. **Toxicon** v. 24, p. 841-9, 1986.

BÉRNILS, R.S. (org.). **Brazilian reptiles**. V List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2009. Disponível em:<<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em 23 de maio de 2010.

BEZERRA, M.M.P. **Comparação da capacidade neutralizante dos antisoros botrópicos comercial e mono específico frente a peçonha de *B. erythromelas***. 2000. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2000.

BIAGGIONI, I. Clinical and molecular pharmacologic characteristics of adenosine- induced vasodilation, **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 75, p. 137–139, 2004.

BIASI, P.; BELLUOMINI, H.E; HOGE, A.R.; PUORTO, G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 40/41, p.167-172, 1976/77.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BOECHAT, A.L; PAIVA, C.S.; FRANCA, F.O.; DOS-SANTOS, M.C. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.43, n.1, p.7-14, 2001.

BOGARIN, G.; ROMERO, M.; ROJAS, G., LUTSCH, C., CASADAMONT, M.; LANG, J.; OTERO, R.; GUTIERREZ, J.M. Neutralization by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.37, n. 3, p. 551-557, 1999.

BOGARIN, G.; MORAIS, J.F.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; NISHIKAWA, A.K.; GUIDOLIN, R.; ROJAS, G.; HIGASHI, H.G., GUTIERREZ, J. M. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**, v. 38, n. 10, p.1429-1441, 2000.

BOLÁS, G.; DE REZENDE, F. F.; LORENTE, C.; SANZ, L.; EBLE, J. A.; CALVETE, J. J. Inhibitory effects of recombinant RTS-jerdostatin on integrin  $\alpha 1\beta 1$  function during adhesion, migration and proliferation of rat aortic smooth muscle cells and angiogenesis. **Toxicon**, v. 79, p. 45-54, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas de Produção e Controle de Qualidade de Soros Antiofídicos. Diário Oficial da União, p. 23491-512, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos: serpentes**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/12-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 05 fev. 2014.

BRAUD, S.; BON, C., WISNE, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie.**, V. 82, p. 851–859, 2000.

BROWN, R. L.; HALEY, T. L.; WEST, K. A.; CRABB, J. W. Pseudechetoxin: a peptide blocker of cyclic nucleotide-gated ion channels. **Proc Natl Acad Sci.** v. 96, p.754–59, 1999.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2009.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. **Acta Physiol.** v.195, p. 415–47, 2009.

CACCIN, P.; PELLEGGATTI, P.; FERNANDEZ, J.; VONO, M.; CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; DI VIRGILIO, F.; MONTECUCCO, C. Why myotoxin-containing snake venoms possess powerful nucleotidases? **Biochem Biophys Res Commun.** v 430, p. 1289-93, 2013.

CALKOSIŃSKI, I.; SEWERYN, E.; ZASADOWSKI, A.; MAŁOLEPSZA-JARMOŁOWSKA, K.; DZIERZBA, K.; BRONOWICKA-SZYDEŁKO, A.; MIERZCHAŁA, M.; CEREMUGA, I.; ROSIŃCZUK-TONDERYS, J.; DOBRZYŃSKI M.; GAMIAN, A. The composition, biochemical properties and toxicity of snake venoms. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, v. 28, n. 64, p. 262-272, 2010.

CALVETE J.J, MARCINKIEWICZ C, MONLEÓN D, ESTEVE V, CELDA B, JUÁREZ P, SANZ L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, n.8, p.1063-74, 2005.

CALVETE J.J, SANZ L, ANGULO Y, LOMONTE B, GUTIÉRREZ J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v.583, n.11, p.1736-43, 2009.

CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Rev. Proteomics**, v. 8, p.739-58, 2011.

CALVETE, J. J.; BORGES, A.; SEGURO, A.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J. G.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **J. Proteomics.**, v.72,p.227-40, 2009.

CALVETE, J. J. Structure-function correlations of snake venom disintegrins. **Curr Pharm Des.** v. 11, p.829–835, 2005.

CALVETE, J. J. Next-generation snake venomics: protein-locus resolution through venom proteome decomplexation. **Exp. Rev. Proteomics**, v. 11, p. 315-29, 2014.

CALVETE, J. J. Snake venomics: from the inventory of toxins to biology., **Toxicon**, v. 75, p.44-62, 2013.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, p. 1063-1074, 2005.

CALVETE, J. J.; MORENO-MURCIANO, M. P.; THEAKSTON, R. D. G.; KISIEL, D. G., MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulfide bond engineering. **Biochem J.** v. 372, p. 725-734, 2003.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PEREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B, ANGULO, Y.; GUTIERREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURAO R. H, FURTADO, M. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteome Research**, v. 74, n. 4, p. 510-527, 2011.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock (Cornell University Press). New York: Ithaca, 2004. 2 vols, 962 p.

CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. *The Venomous Reptiles of Latin America*. Comstock Publishing/Cornell University Press, Ithaca, 1989, 425p.

CARDOSO, J. L. C. Bothropic accidents. Mem. **Inst. Butantan**, v. 52, p. 43-44, 1990.

CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANCA, F. O.; JORGE, M. T, LEITE, R. P, NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C, SANTORO M. L. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. **An International Journal of Medicine**, v. 86, n. 5, p. 315–325, 1993.

CARDOSO, K. C.; SILVA, M. J.; COSTA, G. G. L.; TORRES, T. T. ; DEL BEM, L. E. V. ; VIDAL, R. O. ; MENOSSI, M. ; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, p. 605, 2010.

CARON, E. J.; MANOCK, S. R.; MAUDLIN, J.; KOLESKI, J.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A.; SMALLIGAN, R. D. Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: was it prophylaxis or method of administration?. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 779-83, 2009.

CARRASCO, P.A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American *bothropoid pitvipers* (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, p.1–15, p.109-24, 2012.

CASTANHEIRA, L. E.; NUNES, D. C.; CARDOSO, T. M.; SANTOS, Pde S, GOULART, L. R.,; RODRIGUES, R. S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; YONEYAMA, K. A.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Int J Biol Macromol.** p. 54-64, nov 23, 2013.

CASTOE, T. A.; PARKINSON, C. L. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 39, p.91-110, 2006.

CASTRO JUNIOR, N.C. **Comparação do potencial neutralizante dos soros antibotrópico comercial e experimental frente as atividades biológicas dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas***. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, 2008.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. C.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences.**, v. 61, p. 843-856, 2004.

CHATRATH, S. T.; CHAPEAUROUGE, A.; LIN, Q.; LIM, T. K.; DUNSTAN, N.; MIRTSCHIN, P.; KUMAR, P. P.; KINI RM. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides* by a combined transcriptomics and proteomics approach. **J. Proteome Res.** v. 10, p. 739-50, 2011.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29: 1279-1303, 1991.



CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, Venoms, Antivenoms and Immunotherapy, **Toxicon**, v, 36, n. 6, 1998.

CIDADE, D.A.P. *et al.*, *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**: official journal of the International Society on Toxinology, v.48, n.4, p.437-461, 15 set, 2006.

COLLIS, M. G. The vasodilator role of adenosine, **Pharmacol. Ther.** v. 41, p. 143–162, 1989.

CORREA-NETTO, C.; TEIXEIRA-ARAUJO, R.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; DE-SIMONE, S. G.; SOARES, M. R.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R. B. Immunome and venom of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1222-1235, 2010.

CRUZ, L. S, VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in developing world. **EthnicityandDisease**, v. 19, n. 1, p. 42- 46, 2009.

DALTRY, J. C.; WUSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n.6565, p. 537-40, 1996.

DALTRY, J.C.; WUSTER, W. & THORPE, R.S. Diet and venom evolution. **Nature**, v. 379, p. 537-540, 1996.

DE SOUZA, A. L.; MALAQUE, C. M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C.. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v.51, n.1: p.151-156, 2008.

DHANANJAYA, B. L , D'SOUZA, C. J. M., The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms, **Cell Biochem. Funct.** v. 28 , p. 171–177, 2010.

DOERY, H. M. Purine compounds in snake venoms. **Nature**. v. 177, n. 4504, p. 381- 382, 1956.

DOERY, H. M.; PEARSON, J. E. Phospholipase B in snake venoms and bee venom. **Biochem. J.** v. 92, p. 599-602, 1964.

DOLEY, R, KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of some adenosine compounds via special reference to their action upon the mammalian heart. **J Physiol Lond.** v. 68:213–37, 1929.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases, **Journal Proteomics**. v. 74, p. 1781–1794, 2011.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIANO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

FAN, H. W.; MARCOPITO, L. F.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S.; FERRARI, R. A.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Sequential randomised and double blind trial of promethazine prophylaxis against early anaphylactic reactions to antivenom for Bothrops snake bites. **British Medical Journal**, v. 318, n. 29, p: 1451-1453, 1999.

FENWICK, A. M.; GREENE, H. W.; PARKINSON, C. L. Theserpent and theeegg: unidirectionalevolution of reproductivemode in vipers? **J. Zool. Syst. Evol. Res.**, v. 50, p. 59-66, 2011.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, RONALD L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n.3, p.617-640, 2009.

FERNÁNDEZ, J.; CACCIN, P.; KOSTER, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C.; POSTLE, A. D. Muscle phospholipid hydrolysis by *Bothrops asper* Asp49 and Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins-distinct mechanisms of action. **Febs J.**, v.16, n. 280, p.3878-86, 2013.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; ÂNGULO. Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE B. Isolation of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **An International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 3, p. 273-283, 2010.

FERREIRA, A. T. S. **Caracterização das nucleotídeos presentes no veneno da serpente bothrops jararaca – ênfase para as atividades atpase e adpase.** Universidade estadual do norte fluminense campos dos goytacazes- RJ, julho - 2006.

FINI, C.; PALMERINI, C. A.; DAMIANI, P.; STOCHAJ, U.; MANNHERZ, H. G.; FLORIDI, A. 5'-nucleotidase from bull seminal plasma, chicken gizzard and snake venom is a zinc metalloprotein. **Biochim Biophys Acta.** v. 1038, n. 1, p.18-22, 1990.

FISCHER, F. G.; DORFEL, H. Adenosine in the venom of puffadder Bitis arietans. Snake venoms I. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem.** v. 296, n. 5-6, p. 232-238, 1954.

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesteraseS. **Toxicon**, v. 62, p. 75-82, 2013.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal.** v. 275, p. 3016-30, 2008b.

FRANCIS, S.; MARKLAND Jr.; SWENSON, S. Review Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.62, p.3-18, 2013.

FREITAS, M.A.; VERÍSSIMO, D.; UHLIG, V. Squamate Reptiles of the central Chapada Diamantina, with a focus on the municipality of Mucugê, state of Bahia, Brazil. **Check List**, v. 8, n.1, p.16-22, 2012.

FRY, B. G.; WINTER, K.; NORMAN, J. A.; ROELANTS, K.; NABUURS, R. J. A VAN OSCH, M. J. P.; TEEUWISSE, W. M.; WEERD, L. V. D.; MCNAUGHTAN, J. E.; KWOK, H. F.; SCHEIB, H.; GREISMAN, L.; KOCHVA, E.; MILLER, L. J.; GAO, F.; KARAS, J.; SCANLON, D.; LIN, F.; KURUPPU, S.; SHAW, C.; WONG, L.; HODGSON, W. C.

Functional and Structural Diversification of the Anguimorpha Lizard Venom System. **Mol Cell Proteomics**. v. 9, n. 11, p. 2369–2390, 2010.

FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S. F.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, M. K.; HODGSON, W. C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**. v. 439, p. 584–8, 2005.

FURTADO, M. F. **Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (Hogem 1965) em função da idade das serpentes.** (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, 1987.

FURTADO, M.F.D., MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S. & ANTONIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29: 219-226, 1991.

GARDA, A.A.; COSTA, T.B.; SANTOS-SILVA, C.R.; MESQUITA, D.O.; FARIA, R.G.; CONCEIÇÃO, B.M.; SILVA, I.R.S. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga I: Raso da Catarina Ecological Station (Bahia, Brazil). **Check List**, v. 9 n. 2, p. 405-414, 2013.

GAWLOWSKI, D. M.; DURAN, W. N. Dose-related effects of adenosine and bradykinin on microvascular permselectivity to macromolecules in the hamster cheek pouch. **Circ. Res.** v. 58, p. 348–355, 1986.

GIBBS, H.L., SANZ, L. AND CALVETE, J.J. Snake population venomomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus rattlesnakes*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, p.113-125, 2009.

GLENN, J. L.; STRAIGHT, R. C. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. **Toxicon**, v. 16, p.81-4, 1978.

GOMES, A; RINKU DAS, SS; MISHRA, R; MUKHERJEE, SM; BHATTACHARYA, S GOMES, A. Herbs and herbal constituents active against snake bite. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 865-878, 2010.

GRAHAM, R. L.; MCCLEAN, S.; O’KANE E. J.; THEAKSTON, D.; SHAW, C. Adenosine in the venoms from viperinae snakes of the genus *Bitis*: identification and quantitation using LC/MS and CE/MS. **Biochem Biophys Res Commun**. V. 333, p. 88-94, 2005.

GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A.. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, v.48, nº1, p.44-54, 2006.

GULLAN, J. M.; JACKSON, E. M. 5-Nucleotidase. **Biochem J**. v. 32, p.597–601, 1938.

GUO, M.; TENG, M.; NIU, L.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K<sup>+</sup> channel inhibitor-like fold. **J Biol Chem**. v. 280, p.12405-12, 2005.

GUTIERREZ JM, LOMONTE B, LEON G, ALAPE-GIRON A, FLORES-DIAZ M, SANZ L, ANGULO Y, CALVETE JJ. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the

design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 72, n.2, p.165-182, 2009d.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Immunological profile of antivenoms: preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. **J. Proteomics**, v. 105, p.340-50, 2014.

GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, p. 887-93, 1985.

GUTIERREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 976-987, 2009a.

GUTIÉRREZ, J. M.; FAN, H. W.; SILVERA, C. L. M.; ANGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 625-630, 2009c.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GENÉ, J. A.; CHAVES, F.; ESTRADA, R.; ALVARADO, J.; ROJAS, E.; ROBLES, A. El suero antiofídico polivalente producido em Costa Rica: estabilidade y capacidade neutralizante/Polivalent antiophidic sérum produced in Costa Rica: stability and neutralizing capacity. **Rev. Costarric. Cienc. Méd.**, v. 9, n. 2, p. 155-69, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon**, v.51, n. 1, p.80-92, 2008.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; WARREL, D. A.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. **J. Proteome Res.**, v. 7, p. 4396-408, 2008.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom. **Memórias do Instituto Butantan**, v.33, p. 1405-1474, 1995.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n.1, p.1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; WARRELL, D.A.; CALVETE, J. J. Snake venomics of the lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*. Correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. **Journal of Proteome Research**. v.7, p.4396–4408, 2008.

HAMDAN, B. & LIRA-DA-SILVA, R. M. The snakes of Bahia State, northeastern Brazil: species richness, composition and biogeographical notes. **Salamandra**, v.48, n.1, p.31-50, 2012.

HARRISON, R.A., HARGREAVES, A., WAGSTAFF, S.C., FARAGHER, B., LALLOO, D.G. Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n.12, p. e569, 2009.

HAVT, F.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF. **Toxicon**, v.39, n.12, p.1841-1846, 2001.

ISBISTER, G. K. Procoagulant snake toxins: laboratory studies, diagnosis, and understanding snakebite coagulopathy. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 35, p.93-103.

JIMÉNEZ, N.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Skin Pathology Induced by Snake Venom Metalloproteinase: Acute Damage, Revascularization, and Re-epithelization in a Mouse Ear Model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2421-2428, 2008.

JOHNSTON-COX, H. A.; YANG, D.; RAVID, K. Physiological implications of adenosine receptor-mediated platelet aggregation, **J. Cell. Physiol.** v. 226, p. 46-51, 2011.

JOHNSTONE, A. Thorpe R. *Immunochemistry in practice*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1987.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Molecular cloning and expression of functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. **J. Biol.Chem.**, v. 276, p. 39836-39842, 2001.

KAMIGUTI, A. S. *Atividades coagulante, inflamatória e proteolítica dos venenos de Bothrops jararaca recém-nascidos e adulta*. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, 1988.

KAMIGUTI, A. S. CARDOSO, J. L. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon** 1989; v. 27, n.9, p.955-63, 1989.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochemical Journal**, v. 320 (Pt 2), p. 635-641, 1996b.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**v. 31, p. 853-62, 1998.

KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I. South American Snake Venoms Affecting Haemostasis. **Journal of Toxicology - Toxin Reviews**, v. 14, p. 359-374. 1995.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAM, I.M. T.; SINHA, M.; KUMAR R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; MANJUNATHA, K. R. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v.6, p.1-33, 2011.

KAR, D. M., MAHARANA, L., PATTAIK, S. & DASH, G. K. Studies on hypoglycaemic activity of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. fruit extract in rats, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2 p. 251- 256, 2006.

KIM, M.; LEE, K. Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. **Journal of Ethnopharmacology**, 105: 342-345. 2006.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**. v. 30, p.265-93, 1992.

KINI, R. M.; RAO, V. S.; JOSEPH, J. S. Procoagulant proteins from snake venoms. **Haemostasis**, v. 31, p.218-24.

KOH, D. C. I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p.3030-3041, 2006.

LAMBERTZ, M. Kommentierte Liste der squamaten Reptilien des Sanddünengebietes am mittleren Rio São Francisco (Bahia, Brasilien) unter besonderer Berücksichtigung endemischer Faunenelemente. **Ophidia**, v. 4, n.2, p.2-17, 2010.

LECHT, S.; CIAVERELLI, R. A.; GERSTENHABER, J.; CALVETE, J. J.; LAZAROVICI, P.; CASEWELL, N. R.; HARRISON, R.; LELKES, P. I.; MARCINKIEWICZ, C. Anti-angiogenic activities of snake venom CRISP isolated from *Echis carinatus sochureki*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, available online, 2015.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p.885-901, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J.R.; OHNO, M.; DANIELE, J.J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIERREZ, J.M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon**, v. 37, n.1, p. 145-158, 1999.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, J. Snake venom and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, p.1791-1799, 2005.

LU, Q.; NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. **Toxicon**. v. 45, n. 8, p. 1089-98. 2005.

GONÇALVES-MACHADO, L. **Caracterização dos venenos de diferentes populações de *bothrops jararaca* e análise das interações com antiveneno comercial**. 2014. 74 f. Monografia (Bacharelado em Biomedicina). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2014.

MACHADO, T.; SILVA, V. X.; SILVA, M. J. J. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.71, p.1-14, 2014.

MACKESSY, S.P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, n. 3-4, p. 147-159, 2006.

MACKESSY, S.P., **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**, 2010. 15p.

MARGRES, M. J.; MCGIVERN, J. J.; WRAY, K. P.; SEAVY, M.; CALVIN, K.; ROKYTA, D. R. Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **J. Proteomics**. V.96, p.145-158, 2013.

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

MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F et al. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v.46, p.595-599, 2005.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. "Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*," In: G. W. Schuett, M. Hoggren, M. E. Douglas, and H. W. Greene, Eds. *Biology of the Vipers*. Utah: Mountain Publishing, Eagle Mountain, 2002. p. 307-328.

MARUYAMA M, SUGIKI M, YOSHIDA E, MIHARA H, NAKAJIMA, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, v.30, p. 853-64, 1992.

MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; TOMY, S. C.; ANTONIO, L. C.; SUGIKI, M.; MIHARA, H. Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.86, p.549-56, 1992.

MASSEY, D. J.; CALVETE, J. J.; SÁNCHEZ, E. E.; SANZ, L.; RICHARDS, K.; CURTIS, R.; BOESEN, K. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. **J Proteomics**, v.75, p.2576-87, 2012.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta.**, v.1477, n. 1-2, p.146-56, 2000.

MATSUI, T.; HAMAKO, J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. **Toxicon**. v. 45, n. 8, p. 1075-87, 2005.

- MATSUNAGA, Y.; YAMAZAKI, Y.; HYODO, F.; SUGIYAMA, Y.; NOZAKI, M.; MORITA, T. Structural divergence of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms. **J Biochem.** v. 145, p.365-75, 2009.
- MCCLEARY, R. J.; KINI, R. M. Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. **Toxicon**, v. 62, p. 56-74, 2013.
- McDIARMID, R.W.; CAMPBELL, J.A. & TOURÉ, T. A. Snake species of the world. Vol. 1. Herpetologists' League, 1999. 511 p.
- MCLANE, M. A.; SANCHEZ, E. E.; WONG, A.; PAQUETTE-STRAUB, C.; PEREZ, J. C. Disintegrins. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.** v. 4, p.327-55, 2004.
- MCLANE, M.A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 219, p. 109–119, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL/FUNASA (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animaispeçonhentos. COMED/ASPLAN/FNS. Brasília, 1998; 131 p.
- MITRA, J.; BHATTACHARYYA, D. Phosphodiesterase from *Daboia russelli russelli* venom: purification, partial characterization and inhibition of platelet aggregation. **Toxicon. J.toxico**, jun 14, 2014.
- MONTECUCCO, C.; GUITIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 18, p. 2897-2912, 2008.
- MORAIS, V.; BARAIBAR, M.; CARREIRA, S. Intraspecific variation of *Bothrops pubescens* (cope, 1869) venom in Uruguay (serpentes: viperidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.4, p. 604-611, 2006.
- MORITA, T. C-type lectin-related proteins from snake venoms. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**, v. 4, n. 4, p. 357-73, 2004a.
- MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. **Toxicon.** v. 45, n. 8, p. 1099-114, 2005.
- MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LANG, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb Haemost**, v. 41, p.314-28, 1979.
- NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F. F, EBLE, J. A, SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.



OLIVEIRA, F. N.; BRITO, M. T.; MORAIS, I. C. O., FOOK, S. M. L.; ALBUQUERQUE, H. N. Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the state of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p.662-7, 2010.

OLIVEIRA, F. N. **Perfil Clínico e Epidemiológico dos Acidentes Ofídicos atendidos e notificados nos Centros de Assistência Toxicológica da Paraíba**. Monografia Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Brasil, 2008.

OLSSON, R. A.; PEARSON, J. D. Cardiovascular purinoceptors, **Physiol. Rev.** 70, p. 761-845, 1990.

OROPEZA, D. D. L.; GONZAGA, R. A.; VILLAFUERTE, Y. N.; VÁSQUEZ, M. V; TAPIA, J. C. Ofidismo por *Bothrops atrox*: Estudio clínico-epidemiológico. **Diagnostico**, v.38, n.5, 2000.

OUYANG, C., HUANG, T. F. Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Toxicon**, v. 21, n. 4, p. 491-501, 1983.

PANDURANGAN, A.; KHOSA, R. L.; HEMALATHA, S. Antinociceptive activity of steroid alkaloids isolated from *Solanum trilobatum* Linn. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.12, n.8, p. 691-695, 2010.

PARKINSON, C. L. Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Copeia**, v. 3, p. 576-586, 1999.

PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDIMANN, E. A. Atualização em Insuficiência Renal Aguda: insuficiência renal após acidente crotálico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 22(3), p.162-168, 2000.

PLA, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. **Toxicon**, v. 60, p.688-99, 2012.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C.; FURTADO, M. F.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-51, 2008.

RAFAEL, A. **Variação intraespecífica do veneno de *Bothrops jararacussu*: análises eletroforéticas, imunológicas e biológicas**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

RAW I, GUIDOLIN R, HIGASHI HG, KELEN EMA. **Antivenins in Brazil: preparation**. In: Tu A, editor. Handbook of Natural Toxins. New York: Marcel Dekker; p. 557-811, 1991. RAW, I.; GUIDOLIN, R.; HIGASHI, H.G.; KELEN, E. M. A. Antivenins in Brazil: Preparation, In: Marcel Dekker. *Handbook of Natural Toxins*. New York: Tu A. (Ed.), 1991. p. 557-811.

RIBEIRO, S. C., ROBERTO, I. J.; SALES, D. L.; ÁVILA, R. W.; ALMEIDA, W. O. Amphibians and reptiles from the Araripe bioregion, northeastern Brazil. **Salamandra**, v.48, n.3, p. 133-146, 2012.

RODRIGUES, M. T. "Herpetofauna da caatinga". In: I. R. Leal, M. Tabarelli e J. M. C. Silva, Eds. *Ecologia e conservação da caatinga*. Recife: Editora Universitaria da UFPE, 2003. p. 181-236.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J F.; BOLDRINI-FRANCA, J; FONSECA, F. P. P.; HAMAGUCHI, A; MAGRO, A J; BRAZ, A S K.; SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M R M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES,

- V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie** (Paris), v. 91, n. 4, p. 490-501, 2009.
- ROJAS, G.; JÍMENEZ, J. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. **Toxicon**, v.32, p.59-67, 1994.
- ROKYTA, D. R.; LEMMON, A. R.; MARGRES, M. J.; ARONOW, K. The venom gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC Genomics**, v.13, p. 312-312, 2012.
- SALES, P. B. V.; SANTORO, M. L. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C. v. 147, p. 85–95, 2008.
- SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COSTA, G. & DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from south american snakes. **Toxicon**, v.30, n.1, p. 95-103, 1992.
- SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L. C.; THEAKSTON, R. D. G.; WARREL, D. A.; BIASG. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, 2008.
- SANTOS FILHO, N.; SILVEIRA, L.; OLIVEIRA, C.; BERNARDES, C.; MENALDO, D.; FULY, A.; ARANTES, E.; SAMPAIO, S.; MAMEDE, C.; BELETTI, M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I<sub>2</sub> inducer phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908-917, 2008.
- SANTOS, J. C.; LEAL, I. R.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G. W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Trop. Conserv. Sci.**, v. 4, p.276-86, 2001.
- SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V.; GUEVARA, C.; LOPEZ, J.C.; CHAVES, E.; VELASQUEZ, R.; ROJAS, G.; GUTIERREZ, J.M. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. **Toxicon**, v.39, n. 2-3, p. 401-405, 2001.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.
- SERRANO e MAROUN. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p.1115-32, 2005.
- SERRANO, S. M. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19-26, 2013.
- SILINSKY, E. M. On the mechanism by which adenosine receptor activation inhibits the release of acetylcholine from motor nerve endings, **J. Physiol.** v. 346, p. 243–256, 1984.
- SILINSKY, E. M. Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction, **J. Physiol.** v. 558, p. 389-401, 2004.
- SILVA, M.B.; SCHATNER, M., RAMOS, C.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.; POZNER, R.G.; VENTURA, J.S., HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochemical Journal**, v. 369(Pt 1), p. 129-39, 2003.

- SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. F. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedii* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, p. 45-90, 2008.
- SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v.4, n.11, p.616-627, 2008.
- SOARES, A M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications on phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.
- SOUSA, F. C. M. Avaliação dos efeitos renais induzidos pelo veneno e PLA2 Lys 49 E Asp 49 da serpente *Bothropoides erythromelas* (Amaral, 1923): Análise dos mediadores envolvidos. 2010. 212 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2010.
- SOUSA, L.F.; NICOLAU, C.A.; PEIXOTO, P.S.; BERNARDONI, J.L.; OLIVEIRA, S.S.; ET AL. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.9, e2442, 2013.
- SUTO, K.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase- 1. **J Biol Chem**. v. 280, p.2126-31, 2005.
- TAKASAKI, C.; TAMIYA N. Isolation and properties of lysophospholipases from the venom of an Australian elapid snake, *Pseudechis australis*. **Biochem J**. v. 203, p.269-76, 1982.
- TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* Venom. **Toxicon**, v. 54, n.1, p. 67-76, 2009.
- TRUMMAL, K.; AASPÖLLU, A.; TÕNISMÄGI, K.; SAMEL, M.; SUBBI, J; J, SIIGUR, E. Phosphodiesterase from *Vipera lebetina* venom - structure and characterization. **Biochimie. J.biochi**, jul 28. 2014.
- UETZ, P; JAKOB HALLERMAN, J; HOSEK, J. The Reptile Database: *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923). Disponível em: <<http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=erythromelas>>. Acesso em 03 de fevereiro de 2015.
- VALENCA, R.C.; SILVA, L.B.; ARAUJO, L.M.; PAZ, S.T.; VASCONCELOS, C.M.L; MONTEIRO, W.O.; PONTES, M.M.; BRAZIL, T.K.; GUARNIERI, M.C. *Bothrops erythromelas* venom action: morphological observations of the experimental study in dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.3, n.1, p.170, 1997.
- VASCONCELOS, C.M.L.; VALENCA, R.C.; ARAUJO, E.A.; MODESTO, J.C.A.; PONTES, M.M.; BRAZIL, T.K.; GUARNIERI, M.C. Distribution of <sup>131</sup>I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.3, p.439-443, 1998.
- VELLARD, J. Variation géographique du venin de *Bothrops atrox*. **C. R. Acad. Sci.**, v. 204, p. 1369-71, 1937.

VELLARD, J. Variation géographique du venin de *Crotalus terrificus*. **C. R. Soc. Biol.** 1939; v.130, p.463-4.

WALLACH, V.; WILLIAMS, K. L.; BOUNDY, J. Snakes of the World: A Catalogue of Living and Extinct Species. Taylor and Francis, CRC Press, 2014. 1237 p.

WANG, F.; LI, H.; LIU, M. N.; SONG, H.; HAN, H. M. Structural and functional analysis of natrin, a venom protein that targets various ion channels. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 351, p. 443–8, 2006.

WANG, J.; SHEN, B.; GUO, M.; LOU, X.; DUAN, Y. Blocking effect and crystal structure of natrin toxin, a cysteine-rich secretory protein from *Naja atra* venom that targets the BKCa channel. **Biochem.** v. 44, p.10145–52, 2005.

WARELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.

WARRELL, D.A. **Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes.** Symposia of the Zoological Society of London, v. 70, p.189-203, 1997.

WARRELL, D. A. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes, **British Medical Journal** v. 26, n. 331, p. 1244-1247, 2005.

WUSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C.E.; WALKER, D. E. A nesting of vipers: phylogeny and historical phylogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.49, p. 445-59, 2008.

WUSTER, W.; SALOMÃO, Md. G; QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A.; THORPE, R. S.; BBBSP. Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: Schuett GW, Höggren M, Douglas ME, Greene HW. eds. **Biology of the vipers.** Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 111-28.

YAMAZAKI, Y.; BROWN, R. L.; MORITA, T. Purification and cloning of toxins from elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels. **Biochem.** v. 41, p.11331-7, 2002a.

YAMAZAKI, Y.; HYODO, F.; MORITA, T. Wide distribution of cysteine rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Arch Biochem Biophys.** v. 412, p.133-41, 2013.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon.** v. 44, p. 227–31, 2004.

YAMAZAKI, Y.; KOIKE, H.; SUGIYAMA, Y.; MOTOYOSHI, K.; WADA, T.; HISHINUMA, S.; MITA, M.; MORITA, T. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. **Eur J Biochem.** v. 269, n. 11, p.2708-15, 2002.

ZAMUNER, S.R.; DA CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P., HYSLOP, S. RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n.3, p.259-71, 2004.

ZAPPELLINI, A. **Estudos Bioquímicos e Farmacológicos da Peçonha de *Bothrops erythromelas***. 1991. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 1991.

ZENI, A. L. B.; BECKER, A.; KRUG, M.; ALBUQUERQUE, C. A. C. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. **Journal of Venom and Animal Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 664-676, 2007.

ZINGALI, R. B.; FERREIRA, M. S.; ASSAFIM, M.; FRATTANI, F. S.; MONTEIRO, R. Q. Bothrojaracin, a *Bothrops jararaca* snake venom-derived (pro)thrombin inhibitor, as an anti-thrombotic molecule. **Pathophysiol Haemost Thromb.**, v. 34, n.4-5,p.160-3, 2005.

ZORNETTA, I.; CACCIN, P.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.;GUTIÉRREZ, J. M & MONTECUCCO ,C. Envenomations by *Bothrops* and *Crotalus* snakes induce the release of mitochondrial alarmins, **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, p.1526, 2012.

**ANEXOS**

## Anexo 1: Autorização para coleta de espécimes de *Bothrops erythromelas*



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27617-3	Data da Emissão: 27/09/2013 10:31	Data para Revalidação*: 27/10/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE	CPF: 021.625.673-93
Título do Projeto: Variação ontogenética do veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>	
Nome da Instituição : UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	CNPJ: 07.272.636/0001-31

2	ANTONIO RAFAEL COELHO JORGE	Biólogo	960.476.823-91	-	Brasileira
3	Rafael Matos Ximenes	Pesquisador/Estudante de doutorado	046.795.254-01	6803793 SDS-PE	Brasileira
4	Marineta Dantas de Aquino Nery	Bióloga e co-orientadora	162.160.833-68	342517 SSP-CE	Brasileira
5	HELENA SERRA AZUL MONTEIRO	Orientadora	032.774.703-00	-	Brasileira
6	René Duarte Martins	Supervisor e Colaborador	024.774.134-57	1981056 ssp-PB	Brasileira
7	HELDER NEVES DE ALBUQUERQUE	Biólogo/ Colaborador	862.261.774-20	4477931 SSP-PE	Brasileira
8	JANAINA SERRA AZUL MONTEIRO EVANGELISTA	Veterinária	492.451.473-04	-	Brasileira
9	DIVA MARIA BORGES NOJOSA	Colaboradora	235.638.003-59	95002021265 SSP-CE	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	VITORIA DE SANTO ANTAO	PE	Centro da Região Nordeste	Fora de UC Federal
2	BATURITE	CE	Centro da Região Nordeste	Fora de UC Federal
3	MOSSORO	RN	Parte nordeste da região Nordeste	Fora de UC Federal
4	SAO LUIS	MA	Parte norte da região Nordeste	Fora de UC Federal
5	JUAZEIRO	BA	Centro da Região Nordeste	Fora de UC Federal
6		MG	Parte Norte de Minas Gerais	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Bothrops erythromelas</i> (*Qtde: 1)

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Répteis)	Laço de Lutz
---	------------------------------------	--------------

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 87718738





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27617-3	Data da Emissão: 27/09/2013 10:31	Data para Revalidação*: 27/10/2014
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

\* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

#### Dados do titular

Nome: ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE	CPF: 021.625.673-93
Título do Projeto: Variação ontogenética do veneno de Bothrops erythromelas	
Nome da Instituição : UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	CNPJ: 07.272.636/0001-31

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 87718738**



Página 3/3



## Anexo 2: Autorização para acesso de remessa de amostra de componente do patrimônio genético.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

### AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO Nº 002/2013

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN n.º 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, autoriza:

A Universidade Federal do Ceará, CNPJ n.º 07.272.636/0001-31, representado pelo pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação Gil de Aquino Farias, RG n.º 301.466 SPS/CE, CPF n.º 040.786.833-04, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético no âmbito do projeto de pesquisa "Proteômica e atividade farmacológica do veneno de *Bothropoides erythromelas*: Estado da variação intraespecífica", coordenado pela pesquisadora Helena Serra Azul Monteiro.

**Descrição da(s) amostra(s)**

**Gênero(s):** Bothropoides.

**Tipo(s) de material (is):** Veneno de serpente

**Uso pretendido:** Estudar a variação intraespecífica da peçonha de *Bothropoides erythromelas* a partir da caracterização proteômica e farmacológica/tóxica de peçonhas obtidas de espécimes oriundos de diferentes regiões geográficas do Nordeste brasileiro, bem como avaliar a neutralização dessas ações pelo soro antivenenoso comercial..

**Local de depósito de subamostra:** Coleção Herpetológica do Instituto Butantan.

**Validade da Autorização:** Abril de 2013 a março de 2015. Universidade Federal do Ceará deverá enviar ao Ibama relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto n.º. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do Processo n.º 02001.000711/2013-22. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.



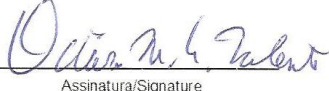
Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada por esta licença se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Ibama, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 03 de abril de 2013

**VOLNEY ZANARDI JÚNIOR**  
Presidente do IBAMA

### Anexo 3: Licença de Exportação de material biológico

 <b>REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL</b> MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - IBAMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70615-900 - Brasília/DF		 <b>INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE</b> E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA		<b>1) Pag. Nº 1/1</b>
<b>4) Licença nº/Permit nº:</b> <b>13BR010395/DF</b>		<b>6) Selo nº/Stamp nº:</b> *****	<b>8) Controle/Check :</b> N7AHMAAXGXF1RMCB	
<b>5) Licença de/Permit for</b> <b>Exportação</b>		<b>7) Selo/Stamp</b>  *****	<b>9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority</b>  Assinatura/Signature	
<b>10) Importador/Importer</b> Juan José Calvete Calle Jaime Roig 11 Valencia - 46010 fone: - Espanha - ES		<b>11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exportador)</b> ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE RUA CAUBI, 798 FORTALEZA - 60331100 fone: 8534852999 - robertajeane@hotmail.com Brasil - BR		
<b>12) País Importador/Country of Import</b> Espanha - ES		<b>13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export)</b> Brasil - BR		
<b>14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction</b> S - Científico/Fins científicos.				
<b>15) Condições Especiais/Special Conditions</b> For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations				
<b>16) Dados do Transporte/Transportation Data</b> Local/Place: ALF/Al Fortaleza Data Provável/Probable Date: 01/04/2013				
ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT				
<b>17) Item</b>		<b>18) Produto/Product</b>		<b>19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit</b>
<b>20) Espécie: nome científico</b> <b>nome vulgar/</b> <b>Species: scientific name</b> <b>common name</b>		<b>21) Anexo/Origem</b> <b>Appendix/Source</b>		<b>23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data</b> <b>Country of Origin-Permit-Date</b>
		<b>22) Descrição: Parte</b> <b>Description: Part</b> <b>Quantity-Unit-Mark</b>		<b>24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data</b> <b>Country reexportation-Certificate-Date</b>
17) I		18) Veneno/Venom		19) -- 10,00 G --
20) 1. Bothrops erythromelas		21) NC   W		22) tecido/tissue
				23) - -
				24) - -
17) II		18) Veneno/Venom		19) -- 10,00 G --
20) 1. Bothrops erythromelas		21) NC   W		22) veneno/posion
				23) - -
				24) - -

----- Fim dos Itens/Items End -----

"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fungico, microbiano ou animal: em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições in situ, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções ex situ, desde que coletados em condições in situ, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exportadora para identificar componentes do patrimônio genético e informações sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"

"This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge with potential commercial use."

<b>28) Endosso da Aduana/Customs Endorsement</b>													
Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty
ASSINATURA/SIGNATURE													

\* Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: [cites.sede@ibama.gov.br](mailto:cites.sede@ibama.gov.br)

1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil  
 2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country  
 3ª Via - Aduana | Customs  
 4ª Via - IBAMA

**Instruções e explicações**

(Os números das instruções correspondem aos do formulário)

- 1- Número da página / número de páginas.
- 2- Data de Emissão.
- 3- Data de Validade. O prazo de validade de uma licença não deve exceder 6 meses. Passado o último dia do prazo de validade, o documento torna-se nulo e sem qualquer valor jurídico, e o original e todas as cópias devem ser devolvidas pelo titular, à Autoridade Administrativa emissora. Uma licença de importação não é válida se o correspondente documento CITES do país de exportação/reexportação tiver sido utilizado para a (re)exportação após o último dia do respectivo prazo de validade.
- 4- Número único do documento atribuído pela Autoridade Administrativa emitente.
- 5- Tipo de documento expedido (licença de importação, de exportação, de reexportação ou outro).
- 6- Número do Selo de Segurança.
- 7- Selo de segurança deve ser validado com a rubrica da Autoridade Administrativa emitente. O número do selo deve estar claramente legível.
- 8- Código da Segurança. Este código juntamente com o número da licença permite verificar, via Internet (<http://verificar.ibama.gov.br/cites>), a validade do documento.
- 9- Dados e assinatura da Autoridade Administrativa responsável pela emissão da licença.
- 10- Nome e endereço completos do importador, inclusive o país.
- 11- Nome e endereço completos do exportador/reexportador, inclusive o país.
- 12- Nome completo do país importador.
- 13- Nome completo do país exportador.
- 14- Finalidade da operação, utilizar um dos seguintes códigos para indicar:  
B Criação em cativeiro ou reprodução artificial;  
E Fins educativos;  
G Jardim botânico;  
H Troféu de caça;  
M Pesquisa biomédica;  
N Reintrodução ou introdução no meio silvestre;  
P Uso pessoal;  
O Circo ou exposição itinerante;  
S Fins científicos;  
T Fins comerciais;  
Z Jardim zoológico.
- 15- As condições especiais podem referir-se à legislação brasileira ou condições especiais determinadas pela Autoridade Administrativa emitente. Este campo pode ser utilizado para justificar a omissão/falta de informações.
- 16- Data e local provável de entrada/saída no Brasil. Esta licença é válida somente para uma operação.
- 17- Numeração sequencial dos itens que serão importados/exportados/reexportados.
- 18- Tipo de produto (por exemplo: luva, animal vivo, mobiliário, acessórios).
- 19- Quantidade do produto e Unidade de medida. Não sendo possível determinar a quantidade deve-se especificar a unidade de medida utilizada, por exemplo o peso.
- 20- Nome científico (gênero, espécie e eventualmente sub-espécie) do animal ou planta tal como consta nos Anexos da Convenção ou nas listas de referência aprovadas na Conferência das Partes / Nome comum da espécie utilizado no Brasil.
- 21- Anexo (I, II ou III) no qual está incluída a espécie e Origem da espécie, utilizar os seguintes códigos:  
A - Planta reproduzida artificialmente (Art.VII, 5 e Res. Conf. 11.11)  
C - Animal reproduzido em cativeiro  
D - Espécime do Anexo I reproduzido em cativeiro ou artificialmente com finalidade comercial (Art. VII, 4 e Res. Conf. 11.14).  
F - Animal nascido em cativeiro (F1 ou gerações posteriores)  
Q - Espécime pré-convenção  
R - Espécime de criadouro com manejo semi-extensivo (ranching)  
U - Espécime com origem desconhecida  
W - Espécie com origem silvestre (coletado no meio silvestre)
- 22- Descrição mais exata possível da parte dos espécimes objeto do comércio (animal vivo, peles, planta, carteiras, sapatos, etc.), quantidade, unidade de medida, a marcação individual dos espécimes (lacs, anilhas, micro-chip), fração da cota de exportação (por exemplo: 500/1000) e se possível o sexo e a idade dos animais vivos.
- 23- País de origem em que o espécime foi retirado na natureza, reproduzido em cativeiro ou artificialmente. Informar o país de origem e o número da licença de exportação ou certificado de origem (tipo, número e data).
- 24- País da última reexportação, é o país de onde vem o espécime antes de entrar no país de destino deste documento. Informar o país de reexportador e o número de licença de reexportação (tipo, número e data). Para espécimes de espécies incluídas no Anexo I criados em cativeiro ou reproduzidos artificialmente deverá ser informado o número da operação. Para os espécimes pré-convenção deverá ser informado o certificado pré-convenção
- 25- Este campo deverá ser preenchido pelo funcionário da alfândega que inspeciona a remessa no momento da exportação/reexportação/importação, que deve anotar as quantidades efetivamente exportados/reexportados e anular os campos não utilizados.

**Instructions and Explanations**

(The listing numbers are equivalent to the forms)

- 1- Page Number/Number of pages
- 2- Issuing Date
- 3- Expiring date. The expiring date of the document should not exceed 6 months. After the expiring date the document is no longer valid, therefore, without any legal force, and the original document and all its copies must be returned by the titular to the Management Authority that issued the document. An Import CITES Permit is not valid if the corresponding document of the exporting country had been used for re-exportation after the expiring date.
- 4- Unique number issued by the Management Authority
- 5- Type of document issued (export permit, re-export certificate, import permit or other).
- 6- Number of the security stamp.
- 7- Security stamp - must be validated with the signature of the Management Authority Officer issuing the document. The security stamp must be clearly legible.
- 8- Security code. This code and the number of permit allow to check it at internet (<http://verificar.ibama.gov.br/cites>).
- 9- Management Authority information and signature.
- 10- Complete name and address of the importer, including the country.
- 11- Complete name and address of the exporter/re-exporter, including the country.
- 12- Complete name of the importer country.
- 13- Complete name of the exporter country.
- 14- Purpose of the transaction Codes  
B - Bred in captivity or artificial reproduction;  
E - Education purposes;  
G - Botanical Garden;  
H - Hunting trophy;  
M - Medical research;  
N - Reintroduction in the wild;  
P - Personal;  
O - Circus or itinerary exhibition;  
S - Scientific purposes;  
T - Commercial purposes;  
Z - Zoo
- 15- The special conditions may refer to the Brazilian Legislation or to the conditions established by the issuing management authority. This space can be used to justify the omission/lack of information.
- 16- Probable date and local of transportation in Brazil.
- 17- Sequential numbers of the items that will be imported/exported/re-exported. This permit or certificate is only valid for one trade.
- 18- Product (for example: glove, live animal, furniture, garment)
- 19- Quantity of the product and Unit, if it is not possible to estimate the quantity it should be specified the unit of measurement used, for example, the weight.
- 20- Scientific name (genus, species, and casually subspecies) of the animal or plant just as in the Appendices of the Convention or in the lists used of reference approved by the Convention of the Parties / Species' common name used in Brazil.
- 21- Appendix (I, II or III) in which is included the species and origin the species, it is used the following codes:  
A - Plant artificially reproduced (Art. VII, 5 and Res. Conf. 11.11)  
C - Animal bred in captivity  
D - Species of Appendix I, reproduced in captivity or artificially with commercial purposes (Art. VII 4 and Res. Conf. 11.14)  
F - Animal bred in captivity (F1 or later offspring)  
Q - Species pre-Convention  
R - Ranching species  
U - Unknown origin  
W - Wild origin (collected in wild)
- 22- Description of the part of the specimens that will be commercialised (alive animal, furs, plants, wallets, shoes, etc.), quantity, unit, the individual mark of the specimens (seal, leg band, microchip, etc), the current annual quota (for example 500/1000), and if possible the sex and age of the alive animals.
- 23- Country of origin is the country in which the specimens were taken from the wild, bred in captivity or artificially propagated. Indicate the country of origin and the number of the permit or certificate of the exporting country and the date of issuance. This block must only be completed in case of re-exports;
- 24- Country of last re-export is the country from which the specimens were re-exported before entering the country in which the present document is issued. Indicate the country of last re-export and the number of the re-export certificate of the country of last re-export and its date of issuance. This block must only be completed in case of re-export of specimens previously re-exported
- 25- To be completed by the official who inspects the shipment at the time of import / export / re-export. Enter the quantities of specimens actually. Strike out the unused blocks.