

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**PERFIL PROTEÔMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
ANÁLISE ANTIGÊNICA DO VENENO DA SERPENTE
PERUANA *Bothriopsis bilineata smaragdina* (“LORO
MACHACO”)**

Carolina Rego Rodrigues



**Belo Horizonte
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**PERFIL PROTEÔMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
ANÁLISE ANTIGÊNICA DO VENENO DA SERPENTE
PERUANA *Bothriopsis bilineata smaragdina* (“LORO
MACHACO”)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências para obtenção do título de mestre

Orientada: Carolina Rego Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui

Coorientadora: Dra. Clara Guerra Duarte

Belo Horizonte

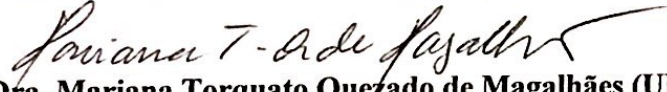
2018




ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CAROLINA REGO RODRIGUES. Aos vinte e nove dias do mês de junho de 2018 às 09h30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Perfil proteômico, atividades biológicas e análise antigênica do veneno da serpente peruana *Bothriopsis bilineata smaragdina*("LORO MACHACO")", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chavez Olortegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Marília Martins Melo (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Clara Guerra Duarte - Coordenadora (Fundação Ezequiel Dias - FUNED), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:


APROVADA
 REPROVADA


O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de junho de 2018.


 Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (UFMG)


 Dra. Marília Martins Melo (UFMG)


 Dra. Clara Guerra Duarte - Coordenadora (Fundação Ezequiel Dias - FUNED)


 Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (UFMG)


 Prof^a Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Agradecimentos

A Deus por me guiar nesta caminhada e pela força para concluí-la.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui, que me deu a oportunidade de realizar o projeto em seu laboratório, por dividir seu conhecimento e principalmente por depositar em mim confiança para a concretização deste trabalho. Essa dissertação não teria sido feita com tanto cuidado teórico e dedicação se não fosse por você.

À minha coorientadora, Dra. Clara Guerra Duarte pelo apoio, sugestões, correções e seu incansável e permanente encorajamento, que me ajudaram a amadurecer como pesquisadora e crescer cientificamente. Obrigada pela disponibilidade e apoio prestado mesmo durante seu período de licença.

À Dra. Fernanda Costal Oliveira pela disponibilidade, incentivo, amizade e paciência. Suas discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Obrigada por contribuir com meu crescimento como pessoa e pesquisadora.

À Letícia pela amizade, importantes experiências compartilhadas e apoio experimental.

À todos os colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas que me acolheram com carinho e muita prestatividade. Obrigada pela agradável convivência do dia-a-dia.

Ao Dr. Eládio Sacher e à Siléia pela ajuda nos experimentos de neutralização e por me receberem tão bem.

Aos membros da banca pelas correções e contribuições com esta dissertação.

Aos meus pais, Lourena e Ricardo, pelo amor incondicional, pelos sacrifícios que fizeram para que eu pudesse completar meu percurso acadêmico e por sempre estarem ao meu lado, incentivando meu crescimento pessoal e profissional. Também ao meu irmão Gabriel pelo o auxílio, amizade e companheirismo durante esta jornada.

Aos meus familiares (tios, primos e avó) pelo exemplo de vida. Obrigada pelo apoio e carinho na realização deste projeto. Especialmente minha tia Simone pela leitura crítica deste trabalho.

Ao Lucas pelo companheirismo, paciência, compreensão e por ter dividido comigo esta etapa da minha vida.

Às agências de fomento CNPq, Fapemig e Capes, por possibilitarem a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta dissertação o meu muito obrigada.

Índice

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumo	xii
Abstract	xiii
1 Introdução	1
1.1 Ofidismo	1
1.2 O complexo <i>Bothrops</i>	2
1.3 O veneno botrópico	3
1.3.1 Metaloproteinases (SVMPs)	4
1.3.2 Serino-proteinases (SVSP)	5
1.3.3 Fosfolipases A₂ (PLA₂)	6
1.3.4 Hialuronidases (Hyal)	6
1.3.5 L- aminoácido oxidase (LAAO)	6
1.4 Tratamento do envenenamento botrópico	7
1.5 <i>Bothriopsis bilineata</i>	9
1.6 O estudo dos venenos e sua relevância	12
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 Material e Métodos	14
3.1 Veneno, soros e animais	14
3.3 Análise shotgun	14
3.3.1 Digestão trípica do veneno	14
3.3.2 Orbitrap MS	15
3.3.3 Pesquisa em bases de dados	16
3.3.4 Quantificação relativa das proteínas	16
3.4 Atividades enzimáticas	17
3.4.1 Ensaio de atividade hialuronidásica	17
3.4.3 Ensaio de atividade da L- aminoácido oxidase (LAAO)	18
3.4.4 Atividade proteolítica	18
3.5 Atividades <i>in vivo</i>	20
3.5.1 Atividade edematogênica	20
3.5.2 Atividade hemorrágica	20
3.5.3 Atividade Letal Mediana (DL₅₀)	21
3.6 Atividade citotóxica	21
3.7 Eletroforeses	22
3.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (unidimensional)	22
3.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (bidimensional)	22
3.8 Imunoensaios	23
3.8.1 ELISA	23
3.8.2 Western Blot	24
3.9 Análise estatística	24
4 Resultados	25
4.1 Análise shotgun	25
4.2 Atividades enzimáticas	26

4.2.1	Atividade hialuronidásica.....	26
4.2.2	Atividade de PLA ₂	27
4.2.3	Atividade de LAAO.....	28
4.2.4	Atividades proteolíticas.....	29
4.3	Atividades <i>in vivo</i>	32
4.3.1	Atividade edematogênica.....	32
4.3.2	Atividade hemorrágica.....	34
4.3.3	Atividade Letal.....	37
4.4	Atividade citotóxica	38
4.5	Eletroforeses	39
4.5.1	Eletroforese unidimensional (1D).....	39
4.5.2	Eletroforese bidimensional (2D).....	40
4.6	Imunoensaios	41
4.6.1	ELISA.....	41
4.6.2	Western Blot.....	42
5	Discussão	44
6	Conclusão	51
7	Perspectivas	52
8	Referências	53
9	Anexo	65

Lista de Figuras

Fig.1 <i>Bothriopsis bilineata</i> ingerindo um roedor e um lagarto	10
Fig. 2 Foto da serpente <i>Bothriopsis bilineata smaragdina</i>	11
Fig. 3 Agrupamento de classes das diferentes proteínas identificadas por proteômica e sua contribuição relativa na composição proteica de <i>BbsV</i>	26
Fig. 4 Ensaio de atividade hialuronidásica de <i>BbsV</i>	27
Fig. 5 Ensaio de atividade fosfolipásica A₂ de <i>BbsV</i>	28
Fig. 6 Ensaio de atividade da L-aminoácido oxidase de <i>BbsV</i>	29
Fig. 7 Ensaio de atividade metaloproteinásica de <i>BbsV</i>	30
Fig. 8 Ensaio de atividade serino-proteinásica de <i>BbsV</i>	31
Fig. 9 Atividade fibrinogenolítica de <i>BbsV</i>	32
Fig. 10 Ensaio de atividade edematogênica de <i>BbsV</i>	33
Fig. 11 Hemorragia macroscópica da atividade edematogênica	33
Fig. 12 Neutralização do edema	34
Fig. 13 Atividade hemorrágica de <i>BbsV</i>	35
Fig. 14 Lesões hemorrágicas	35
Fig. 15 Neutralização da atividade hemorrágica de <i>BbsV</i>	36
Fig. 16 Lesões hemorrágicas na presença de antivenenos	37
Fig. 17 Atividade citotóxica do veneno de <i>BbsV</i>	39
Fig. 18 Perfil proteico do veneno bruto de <i>BbsV</i> por SDS-PAGE unidimensional	40
Fig. 19 Perfil proteico do veneno bruto de <i>BbsV</i> por SDS-PAGE bidimensional	41
Fig. 20 Reação imunoenzimática de <i>BbsV</i> frente aos soros antibotrópicos	42
Fig. 21 Western Blots dos géis 1D	43
Fig. 22 Western Blots dos géis 2D	43

Lista de Tabelas

Tabela 1 Características clínicas do acidente botrópico.....	8
Tabela 2 Atividade letal intraperitonal de <i>BbsV</i>	38
Tabela 3 Comparação entre as atividades de <i>Bothrops spp</i>	45

Lista de abreviaturas

1 DE	Eletroforese unidimensional
2 DE	Eletroforese bidimensional
ACN	Acetonitrila
Asp	Aspartato
BbsV	Veneno de <i>Bothriopsis bilineata smaragdina</i>
BAV	Antiveneno botrópico
B-BAV	Antiveneno botrópico brasileiro
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CEUA	Comissão ética no uso de animais
CID	Dissociação Induzida por Colisão, do inglês, <i>Collision induced dissociation</i>
CTAB	Cetiltrimetilamônio
CRISP	Proteína secretada rica em cisteína, do inglês, <i>Cysteine-rich secretory protein</i>
DL₅₀	Dose Letal Mediana
DME	Dose mínima edematogênica
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMH	Dose mínima hemorrágica
DP	Desvio Padrão
DTN	Doença Tropical Negligenciada
DTT	Ditiotreitol
EC₅₀	Concentração efetiva 50, do inglês, <i>Effective concentration 50</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>

FDR	Taxa de descobertas falsas, do inglês, <i>False Discovery Rate</i>
FRET	Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência, do inglês, <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
HA	Ácido hialurônico, do inglês, <i>Hyaluronic acid</i>
HYAL	Hialuronidase, do inglês, <i>Hyaluronidase</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IgG	Imunoglobulinas G
INS	Instituto Nacional de Salud
LAAO	L-aminoácido oxidase
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa, do inglês, <i>Liquid Chromatography- Mass Spectrometry</i>
LTQ	do inglês, <i>Linear Trap Quadrupole</i>
MS	Espectrometria de massa, do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massa sequencial
m/z	Razão massa/carga
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de acrilamida, do inglês, <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
P-BAV	Antiveneno botrópicos peruano
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogênioônico
PLA₂	Fosfolipase A ₂ , do inglês, <i>Phospholipase A₂</i>
ppm	Partes por milhão
p/v	Peso/ volume
QPCT	Glutaminil-peptídeo ciclotransferase
RP	Fase reversa, do inglês, <i>Reverse- phase</i>
SDS	Dodecilsulfato de Sódio, do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfate</i>

Snaclec	Lectina do tipo C de veneno de serpentes, do inglês, <i>Snake C-type lectin</i>
SVMP	Metaloproteinase de veneno de serpentes, do inglês, <i>Snake venom metalloproteinase</i>
svNGF	Fator de crescimento neural de veneno de serpente, do inglês, <i>Snake venom nerve growth factor</i>
SVSP	Serino-proteinase de veneno de serpentes, do inglês, Snake venom serine proteinase
TC	Tempo de coagulação
TEMED	N,M,N',N-tetrametilenodiamina
Tris	Tris(Hidroximetil)aminometano

Resumo

Os venenos de serpentes são constituídos por uma complexa mistura de substâncias que apresentam diferentes ações e atividades. Essas substâncias são de grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos devido ao seu potencial biotecnológico. Além disso, o estudo dos venenos é importante para a compreensão da variabilidade, patofisiologia e antigênicidade inerente a eles. De acordo com essas propriedades dos venenos de serpentes, o presente estudo procurou caracterizar o veneno de *Bothriopsis bilineata smaragdina*, uma serpente arbórea da família Viperidae, cuja composição do veneno ainda é pouco conhecida. Para isso, foram avaliados o perfil proteômico do veneno e suas atividades biológicas e antigênicas. Os resultados obtidos identificaram um total de 122 proteínas, divididas em 22 subgrupos. Dentre elas estão as metaloproteinases de veneno de serpentes (SVMPs, 45,93%), lectinas do tipo C (Snaclecs, 22,37%), serino-proteinases de veneno de serpentes (SVSPs, 11,11 %), L-aminoácido oxidases (LAAOs, 6,62 %), fosfolipases B (2,69 %), 5' nucleotidases (2,37 %), fosfolipases A₂ (PLA₂, 2,22 %), fosfodiesterases (2,2 %), proteínas do veneno ricas em cisteína (1,97 %) e outras proteínas. Experimentalmente, os ensaios *in vitro* demonstraram que o veneno possui atividade de enzimas pertencentes às famílias das SVMP, SVSP, Hialuronidase (Hyal), PLA₂ e LAAO, corroborando os achados proteômicos. O veneno também foi capaz de causar edema, hemorragia e letalidade *in vivo*. Além disso, as atividades de hemorragia e edema foram neutralizadas pelos soros antibotrópicos peruano e brasileiro, indicando a presença de anticorpos com reatividade cruzada em ambos os soros comerciais utilizados. Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para uma melhor compreensão do veneno de *Bothriopsis bilineata smaragdina* e das toxinas que o compõe.

Abstract

Snake venoms are a complex mixture of substances with different actions and activities. These substances are of great interest in research and development of new drugs, due to their biotechnological potential. In addition, venom studies are important for understanding the variability, pathology and antigenicity inherent in them. According to these snake venom properties, the aim of the present study was to characterize *Bothriopsis bilineata smaragdina* venom, an arboreal snake from the Viperidae family, whose venom still little known. To this end, the proteomic profile of the venom and its biological and antigenic activities were analysed. The results identified a total of 122 proteins, divided into 16 different subgroups. Among them are metalloproteinases (SVMPs, 45.93%), snake C-type lectins (Snaclecs, 22.37%), snake venom serine proteinases (SVSPs, 11.11%), L-amino acid oxidases (LAAOs, 6.62%), phospholipases B (2.69%), 5'nucleotidases (2.37%), phospholipases A₂ (PLA₂, 2.22%), phosphodiesterase (PDE, 2.20%), cystein-rich venom proteins (1.97%) and other proteins. Experimentally, the *in vitro* enzymatic assays showed that the venom has SVMP, SVSP, Hyaluronidase (Hyal), PLA₂ and LAAO activities. The venom was also capable of causing edema, haemorrhage and lethality *in vivo*. Furthermore, the edema and hemorrhage activities were neutralized by the Peruvian and Brazilian antiothropic serum, indicating the presence of cross-reactive antibodies in both commercial antivenoms. The results of this study contributed to a better understanding of *Bothriopsis bilineata smaragdina* venom and its toxins.

1 Introdução

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata a ocorrência de aproximadamente 5 milhões de acidentes ofídicos a cada ano no mundo. Dentre estes acidentes, 2,4 milhões levam a um quadro clínico relevante de envenenamento, resultando em 94.000 – 125.000 óbitos e 400.000 amputações (WHO, 2017). Em 2009 a OMS passou a considerar os acidentes ofídicos como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), uma vez que a maioria da população afetada tem pouca influência política e, conseqüentemente, o problema não é priorizado na agenda da saúde pública.

A distribuição das DTNs está associada a fatores socioeconômicos e, por não possuírem uma transmissão rápida e de longo alcance, dificilmente afetam populações com maior poder econômico ou habitantes de países desenvolvidos (WHO, 2016a). Em Junho de 2017 a OMS passou a incluir os envenenamentos ofídicos na categoria A das DTNs (GUTIÉRREZ et al., 2017). Para ser classificada nesta categoria é necessário que a doença cause morbidade e mortalidade e que afete predominantemente populações pobres que vivem em regiões tropicais e subtropicais. Além disso, a doença deve ser amplamente controlada, eliminada ou erradicada através da aplicação de estratégias de saúde pública adotadas pelo Departamento para Controle de DNTs e serem relativamente negligenciadas em pesquisas (WHO, 2016a).

1.1 Ofidismo

Os acidentes ofídicos (ou ofidismo) ocorrem quando há a inoculação de secreções tóxicas por uma serpente peçonhenta (SVS, 2014) e são considerados um risco ocupacional e ambiental, uma vez que afetam principalmente trabalhadores rurais e populações indígenas (STAHEL, 1980; WARRELL, 1999; WARRELL et al., 1986; WILLIAMS et al., 2005). Os valores de incidência dos acidentes ofídicos são obtidos por meio de notificações

hospitalares. No entanto, devido ao difícil acesso e a preferência por terapias alternativas, os acidentados muitas vezes não procuram tratamento em hospitais, levando a uma considerável subestimação dos acidentes e dos dados epidemiológicos disponíveis (GUTIÉRREZ et al., 2010).

Até Dezembro de 2015 eram conhecidas 392 espécies de serpentes no Brasil (COSTA; BÉRNILS, 2015). Porém, apenas quatro gêneros de serpentes peçonhentas são considerados de importância médica: *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca, comboia), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca) e *Micrurus* (coral-verdadeira). O gênero *Bothrops* é responsável por 81% dos acidentes ofídicos registrados no país (SINAN, 2016). No Peru, os acidentes ofídicos também constituem um problema de saúde pública sobretudo ao leste dos Andes, na região de floresta tropical, onde são reportados mais de 2.000 acidentes por ano, dos quais 77% são atribuídos ao complexo *Bothrops* (INS, 2013).

1.2 O complexo *Bothrops*

As serpentes que compõem o complexo *Bothrops* pertencem a família Viperidae, apresentam fosseta loreal, cauda lisa e afilada, corpo fino de aproximadamente um metro de comprimento, grande variedade de coloração, com padrões de desenhos que assemelham um “V” invertido (FUNDACENTRO, 2001). Elas podem ser encontradas em um amplo espectro de habitats e possuem uma grande diversidade morfológica (MARTINS et al., 2001). Por causa dessa diversidade, a classificação taxonômica do complexo *Bothrops* ainda é muito debatida e já sofreu inúmeras alterações ao longo dos anos. A classificação mais frequentemente utilizada é a que identifica o complexo compreendendo três gêneros: *Bothrops*, *Bothrocophias* e *Bothriopsis* (CARRASCO et al., 2016). Após este arranjo taxonômico, proposto há mais de uma década atrás, vários outros foram adotados, alguns inclusive propondo a sinonimização de *Bothriopsis* e *Bothrops* (WÜSTER et al., 2002). No entanto, até hoje, a relação filogenética do complexo não é totalmente resolvida. Por isso, os termos “botrópico” e “*Bothrops*” utilizados no presente trabalho irão abranger

também o gênero *Bothriopsis*.

As *Bothrops* são encontradas por todo o território brasileiro, principalmente nas regiões rurais e nas periferias das grandes cidades, preferindo locais úmidos e onde há grande presença de roedores. Elas possuem hábitos noturnos e são agressivas quando ameaçadas (BRASIL, 2001).

1.3 O veneno botrópico

Secreções tóxicas produzidas pelas serpentes são inoculadas através de dentes modificados, conectados a glândula de veneno por um ducto (SVS, 2014). As glândulas de veneno ofídicas evoluíram a partir das glândulas salivares de ancestrais não venenosos, contribuindo para o sucesso ecológico destes animais (KOCHVA; GANS, 1970). A principal função das glândulas veneníferas é secretar veneno, o que auxilia na captura e digestão de presas. Deste modo, os venenos possuem substâncias capazes de influenciar os processos vitais, podendo atuar nos sistemas cardiovascular, nervoso, locomotor, hemostático além de interferir na migração celular e na permeabilidade de membranas (KARLSSON, 1979).

Apesar de possuírem substâncias orgânicas e inorgânicas na sua composição, 90 a 95% do peso seco dos venenos de serpentes são peptídeos e proteínas (BIEBER, 1979; BON, 2003; TASOULIS; ISBISTER, 2017). As características e proporções dessas substâncias podem variar tanto inter como intraespecificamente, de acordo com a idade, sexo, sazonalidade, localização geográfica e alimentação da serpente (BARLOW et al., 2009; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991). Geralmente, compostos enzimáticos estão associados com digestão da presa, enquanto os não enzimáticos agem principalmente na imobilização (KINI; FOX, 2013).

O veneno botrópico é conhecido pelos seus efeitos coagulante, hemorrágico e proteolítico, podendo causar complicações locais e sistêmicas (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003). Esses efeitos estão associados a ação

integrada de vários compostos do veneno. Dentre os compostos estão: as metaloproteinases (SVMPs), serino-proteinases (SVSPs), L-aminoácido oxidases (LAAO), lectinas do tipo C (Snaclecs), fosfodiesterase (PDE), fosfolipases B, 5' nucleotidases, fosfolipases A₂ (PLA₂), proteína secretada rica em cisteína (CRISP), hialuronidases (Hyal) e outros (SOUSA et al., 2013).

1.3.1 Metaloproteinases (SVMPs)

As metaloproteinases são enzimas que utilizam um metal, geralmente o zinco, para influenciar a velocidade de uma reação (MESH, 2007). Estudos demonstram que esse tipo de protease está relacionada as ações fibrinolíticas, hemorrágicas e inibidoras de agregação plaquetária (BERNARDES et al., 2008; BJARNASON; FOX, 1994; ZHOU; SMITH; GROSSMAN, 1995) do veneno.

As SVMPs atuam digerindo proteínas do mecanismo de coagulação do sangue, da membrana basal do endotélio dos vasos e da matriz extracelular, sendo as principais responsáveis pelos efeitos hemorrágicos locais e sistêmicos dos venenos (BARAMOVA et al., 1990; KAMIGUTI et al., 1991). Devido as suas ações no sistema hemostático, as SVMPs tem atraído grande atenção de pesquisadores que buscam aplicações clínicas associadas ao desenvolvimento de novas drogas (BRAUD; BON; WISNER, 2000; FOX; SERRANO, 2009; WHITE, 2005).

As SVMPs são divididas em quatro classes distintas com base em seus domínios estruturais: Classe P-I: enzimas que apresentam apenas um domínio catalítico; Classe P-II: enzimas que apresentam um domínio catalítico e um domínio desintegrina; Classe P-III: enzimas formadas por um domínio catalítico, um domínio desintegrina e um domínio rico em cisteína; Classe P-IV: enzimas que apresentam, além dos três domínios da classe das P-III, dois domínios tipo-lectina ligados por pontes dissulfeto (FOX; SERRANO, 2005). Outra classificação proposta sugere que as SVMPs P-IV sejam incorporadas a uma subclasse das P-III, uma vez que nenhum precursor específico contendo todos os domínios dessas proteinases (catalítico, desintegrina, rico em cisteína e tipo-lectina) foi

reportado, o que indica que as SVMPs classificadas como P-IV provavelmente são geradas através de modificações pós-traducionais de um precursor P-III (FOX; SERRANO, 2008).

1.3.2 Serino-proteinases (SVSPs)

As serino-proteinases presentes nos venenos de serpentes são enzimas glicoproteicas, que possuem uma região de sítio catalítico bem conservada (Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ e Asp¹⁰²) (BARRETT; RAWLINGS, 1995; SERRANO; MAROUN, 2005). Essas proteases são encontradas em diversas isoformas e alterações estruturais podem influenciar sua atividade.

As SVSPs tem massa molecular entre 26 e 67 kDa, dependendo da quantidade de glicosilações presentes (SERRANO; MAROUN, 2005). Essas enzimas agem na agregação de plaquetas, coagulação sanguínea e fibrinólise (LU; CLEMETSON; CLEMETSON, 2005), sendo frequentemente associadas a distúrbios hemostáticos.

As SVSPs possuem diferentes formas de ação. As do tipo *thrombin-like* por exemplo clivam o fibrinogênio no mesmo local que a trombina, levando a uma diminuição do fibrinogênio de forma rápida e a um efeito anticoagulante (MARKLAND, 1998; MARSH; WILLIAMS, 2005; SWENSON; MARKLAND, 2005). Algumas SVSP *thrombin-like* podem clivar duas cadeias do fibrinogênio (A α e B β), mas a maioria atua apenas sobre uma (A α ou B β) (MARKLAND, 1998; PIRKLE, 1998). Já as SVSP do tipo *Kallikrein-like* levam a uma liberação de bradicinina e a degradação de angiotensina, causando uma diminuição da pressão sanguínea (KOMORI; NIKAI, 1998). Por causa dos seus efeitos no sistema hemostático estas enzimas tem sido alvo de muitos estudos que buscam aplicações clínicas e biotecnológicas (WATANABE et al., 2009; YOU et al., 2004).

1.3.3 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas de 14 a 18 kDa que hidrolisam os fosfolípidios de membrana, gerando mediadores envolvidos nos processos inflamatórios locais e sistêmicos (CHISARI et al., 1998).

Existem diferentes grupos de PLA₂, de forma que essas enzimas são encontradas tanto em células e fluidos biológicos quanto em venenos. O veneno de *Bothrops* possui PLA₂ estruturalmente semelhantes àsquelas presentes nos mamíferos (MOREIRA, 2007). Vários efeitos fisiológicos tem sido relacionados a ação dessas enzimas, como a hemorragia interna, miotoxicidade, neurotoxicidade, hipotensão, atividade anticoagulante, antiplaquetária, inflamatória e edematogênica (KINI, 2006; TAN; SAIFUDDIN; YONG, 1991; TEIXEIRA et al., 2003).

1.3.4 Hialuronidases (Hyal)

As hialuronidases são enzimas capazes de degradar o ácido hialurônico, importante componente dos tecidos e fluidos corporais dos vertebrados, facilitando assim a difusão e disseminação de outros componentes do veneno (BORDON, 2012) e contribuindo para o envenenamento local ou sistêmico. Por causa dessa propriedade, a hialuronidase, que não é considerada tóxica (GIRISH et al., 2004), potencializa a toxicidade do veneno e age como um “fator de espalhamento” (PUKRITTAYAKAMEE et al., 1988).

Essa enzima é encontrada em todos os venenos ofídicos, mas sua atividade pode variar entre as espécies de serpentes, inclusive entre as do mesmo gênero (SOUZA et al., 2015). Nos venenos viperídeos, a massa molecular descrita para as hialuronidases varia entre 50-70 kDa (BORDON, 2012; HARRISON et al., 2007).

1.3.5 L- aminoácido oxidase (LAAO)

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são encontradas em vários organismos e

em venenos de serpentes (GEUEKE; HUMMEL, 2002; SOUSA et al., 2013; YANG et al., 2011). Essas flavoenzimas catalisam a desaminação oxidativa de um L- aminoácido a α -ceto ácido, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia (NH_3) (DU; CLEMETSON, 2002).

Várias atividades biológicas da LAAO tem sido relacionadas com o H_2O_2 produzido durante a reação catalisada por esta enzima. Entre elas estão a indução de apoptose (SUHR; KIM, 1999), inibição e indução de agregação plaquetária (STÁBELI et al., 2004) atividade anticoagulante (SAKURAI et al., 2003) atividade anti-viral, anti- parasitária e hemolítica (ALI et al., 2000; TEMPONE et al., 2001; ZHANG et al., 2003). A ação biológica do H_2O_2 pode ser inibida pela adição de um antioxidante, como por exemplo, a catalase, que reage com o peróxido de hidrogênio produzindo água (H_2O) e oxigênio (O_2) (NAUMANN et al., 2011).

Outras proteínas como as Snaclecs, que atuam sobre a função plaquetária (BRINKHOUS et al., 1983), as fosfodiesterases, capazes de atacar os ácidos nucleicos (MAMILLAPALLI et al., 1998), as fosfolipases B, conhecidas por atuar na lise de eritrócitos e causar citotoxicidade em células musculares (BERNHEIMER et al., 1987), as 5' nucleotidases, que hidrolisam 5' mononucleotídeos (SULKOWSKI, 1963) e as CRISPs que podem se ligar a canais de cátion não específicos dependentes de nucleotídeos cíclicos (CNG) (BROWN et al., 2003), também são encontradas nos venenos de serpentes e contribuem com os sintomas do envenenamento.

1.4 Tratamento do envenenamento botrópico

O tratamento geral para o envenenamento botrópico consiste em manter o local da picada elevado e estendido, tomar analgésicos para o alívio da dor, manter a hidratação (diurese entre 30 a 40 mL/hora nos adultos, e 1 a 2 mL/kg/hora nas crianças) e usar antibióticos em caso de infecção (BRASIL, 2001).

Para um tratamento mais específico, a primeira medida a ser tomada é, se possível, reconhecer o animal, uma vez que a intervenção é baseada no tipo de serpente responsável pelo envenenamento. Posteriormente, um soro hiperimune heterólogo específico é administrado por via intravenosa. Esses soros consistem de anticorpos de animais previamente imunizados e, por isso, em humanos podem causar reações adversas do tipo alérgico em diferentes graus. As reações mais frequentes são: prurido/rubor cutâneo, urticária, tosse seca/rouquidão, náuseas/vômito e crise asmática. Reações mais graves também podem ocorrer e o choque anafilático foi relatado em 1:50.000 pacientes que receberam soro equino (BRASIL, 2001).

No caso de acidente com serpentes do complexo *Bothrops* é recomendado o uso precoce de antiveneno botrópico (BAV), de acordo com a avaliação da gravidade (Tabela 1). Isso deve ser suficiente para reverter as alterações da coagulação e parar os sangramentos dentro de 12 a 36 horas, caso contrário, a dose administrada pode ter sido insuficiente, sendo necessária a administração adicional de soro (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

Tabela 1 Características clínicas do acidente botrópico

Manifestações e Tratamento	Classificação (Avaliação Clínica Inicial)		
	Leve	Moderada	Grave
Locais: Dor, Edema, Equimose	Ausentes ou discretas	Evidentes	Intensas **
Sistêmicas: Hemorragia grave, Choque, Anúria	Ausentes	Ausentes	Presentes
Tempo de coagulação (TC)*	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia (quantidade de ampolas)	2 a 4	4 a 8	12
Via de administração	Intravenosa		

*TC normal até 10 minutos; TC alterado: prolongado de 10 a 30 minutos e incoagulável maior que 30 minutos. ** Manifestações locais intensas podem ser o único critério para classificação de gravidade (Brasil, 2001).

O *pool* de venenos utilizado para a produção do soro antiofídico varia de acordo com as principais espécies responsáveis pelos acidentes de cada região. Para o preparo do soro antiofídico peruano (P-BAV), cavalos são imunizados com um *pool* antigênico composto pelos venenos de *Bothrops atrox* (50%), *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti*, *Bothrops brazili* e *Bothrocophias hyoprora* (12,5% cada) (LAING et al., 2004; ROJAS et al., 2005; THEAKSTON; WARRELL, 1991). Já para o preparo do soro antiofídico brasileiro (B-BAV) os venenos de *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacuçu*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops moojeni* (12,5% cada) são utilizados na imunização (BRASIL, 1996).

1.5 *Bothriopsis bilineata*

O gênero *Bothriopsis* possui pelo menos quatro espécies conhecidas: *B. chloromelas* (BOULENGER, 1911), *B. taeniata* (SPIX; WAGLER, 1824), *B. pulchra* (PETERS, 1862) e *B. bilineata* (WIED-NEUWIED, 1825). A *Bothriopsis bilineata* (também classificada como: *Bothrops bilineata* ou *Bothriopsis bilineatus*, conhecida popularmente no Peru por Loro machaco e por Jararaca-verde no Brasil) é uma serpente de comprimento médio (aproximadamente 70 cm quando adulta), que possui um corpo relativamente fino e uma cauda preênsil curta. Sua coloração verde pálida característica e as manchas escuras presentes no dorso atuam como uma camuflagem com a vegetação, o que a torna difícil de ser encontrada. A alimentação desta serpente consiste em roedores, anuros, lagartos e outras serpentes (Fig. 1) (DIXON; SOINI, 1986; MARTINS et al., 2001). A ingestão de pequenos pássaros também já foi relatada (DIXON; SOINI, 1986)



Fig.1 *Bothriopsis bilineata* ingerindo um roedor e um lagarto. Fonte: Cardoso e colaboradores (2003).

A *B. bilineata* possui hábitos noturnos e é encontrada ao leste da Mata Atlântica brasileira (CAMPBELL; LAMAR, 2004) a nordeste do Estado de Minas Gerais (BERNARDE et al., 2011; FEIO; CARAMASCHI, 2002) e nas regiões

amazônicas da Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Brasil (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Por ser uma serpente arbórea, a maioria dos acidentes com *B. bilineata* envolvendo humanos ocorrem na parte superior do corpo, incluindo os pulsos, mãos, braços, pescoço e até mesmo o rosto e a cabeça. Os aspectos clínicos relacionados ao envenenamento por essa espécie, da mesma forma que por outras serpentes do complexo *Bothrops*, envolvem respostas locais como inchaço, dor e hematomas e respostas sistêmicas como a coagulopatia e hemorragia espontânea (TORREZ et al., 2014).

Duas subespécies de *B. bilineata* são reconhecidas atualmente: *B. bilineata bilineata* (WIED-NEUWIED, 1821) e *B. bilineata smaragdina* (HOGE, 1966). A subespécie *B. bilineata smaragdina* (Fig. 2) habita as regiões de floresta amazônica do Peru, Bolívia, Equador, Colômbia, Venezuela e os estados brasileiros do Acre, Amazonas e Rondônia (CAMPBELL; LAMAR, 2004; HOGE, 1966; TURCI et al., 2009). Esta subespécie já foi descrita como uma das principais responsáveis por acidentes no Peru (LOJA et al., 2000) e apesar de sua importância médica, o veneno da *B. b. smaragdina* não está incluso no *pool* de venenos utilizados na produção do soro antiofídico peruano ou do soro antiofídico brasileiro.



Fig. 2 Serpente *Bothriopsis bilineata smaragdina*. Foto: Diego Meneghelli.

1.6 O estudo dos venenos e sua relevância

Desde a antiguidade, substâncias naturais vem sendo utilizadas como agentes terapêuticos e, apesar de possuírem efeitos tóxicos, os venenos tem muito a contribuir neste aspecto. Um exemplo disto é a utilização de componentes do veneno na pesquisa e tratamento da hipertensão (SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949), trombose (HUANG; HSU; KUO, 2016) e até mesmo câncer (SAMPAIO, 2016). Somente através do estudo dos venenos é possível conhecer a patologia associada ao envenenamento e buscar a melhor linha terapêutica a ser empregada. Pesquisas sobre a composição dos venenos são, portanto, fundamentais, não somente pelo seu potencial na biotecnologia/farmacologia, como também para o desenvolvimento de soros mais efetivos e seguros na neutralização das toxinas da serpente.

Muitos dos estudos sobre os venenos consistem no isolamento e caracterização bioquímica e farmacológica de toxinas selecionadas, havendo uma maior prevalência de pesquisas sobre toxinas que são abundantes nos venenos e que estão presentes em espécies de serpentes mais comuns ou de relevância médica. Logo, os venenos de serpentes que são mais difíceis de serem encontradas e mantidas cativas são, conseqüentemente, menos explorados.

O surgimento de estudos de proteômica, técnica que permite caracterizar qualitativamente e quantitativamente as toxinas do veneno em uma escala muito maior que os métodos tradicionais de isolamento e identificação de biomoléculas, contribuiu para uma maior compreensão da composição dos venenos. Muitos venenos são caracterizados a partir desta técnica, o que proporciona uma grande plataforma de base de dados. Apesar disso, até o presente momento, existem poucas pesquisas sobre os componentes do veneno de *Bothriopsis bilineata* e os aspectos clínicos e epidemiológicos associados a ele (SETUBAL et al., 2013; SMALLIGAN et al., 2004; WALDEZ; VOGT, 2009). Portanto, faz-se necessário um estudo que vise a caracterização das ações e toxinas deste veneno.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o perfil proteômico, as atividades biológicas e a antigenicidade do veneno da *Bothriopsis bilineata smaragdina* (*BbsV*), utilizando métodos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil proteômico de *BbsV* por meio da técnica de espectrometria de massa.
- Analisar o perfil proteico de *BbsV* por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (uni e bidimensional).
- Avaliar, *in vitro*, a atividade citotóxica e as atividades enzimáticas de SVMP, SVSP, PLA₂, Hyal, LAAO e fibrinogenolítica de *BbsV*.
- Caracterizar as atividades biológicas de *BbsV*, *in vivo*, determinando a Dose Mínima Hemorrágica (DMH), Dose Mínima Edematogênica (DME) e Dose Letal Mediana (DL₅₀).
- Avaliar, por Western Blot e ELISA, a reatividade antigênica cruzada dos antivenenos botrópicos peruano e brasileiro frente a *BbsV*.
- Avaliar a capacidade neutralizante dos antivenenos botrópicos peruano e brasileiro frente as atividades *in vivo* de edema e hemorragia.

3 Material e Métodos

3.1 Veneno, soros e animais

O veneno liofilizado de *B. b. smaragdina* foi fornecido pelo Instituto Nacional de Salud (INS), localizado em Lima, Peru. O veneno foi dissolvido em 1mL de H₂O deionizada e o seu teor proteico medido pelo método de Lowry (1951), utilizando o kit DC *protein* da Biorad e albumina de soro bovino (BSA-Sigma) como padrão. O veneno ressuspendido foi mantido a -20°C até a sua utilização, seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016b). O antiveneno botrópico polivalente peruano (P-BAV) foi fornecido pelo INS e o antiveneno botrópico polivalente brasileiro (B-BAV) pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), localizada em Belo Horizonte, Brasil.

Camundongos Swiss fêmeas, pesando de 18 a 22g, foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com temperatura ambiente de aproximadamente 23°C, 12 horas de exposição a luz e com água e ração *ad libitum*, até o momento dos experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG 234/2017).

3.3 Análise proteômica por shotgun

3.3.1 Digestão triptica do veneno

A digestão por tripsina foi feita de acordo com Brunoro e colaboradores (2015) com modificações. Cem microgramas de *BbsV* liofilizado foi solubilizado em 20 µL de bicarbonato de amônia 0,4 M e ureia 8 M. A amostra foi então reduzida com 5 µL de DTT 100 mM e incubada a 56°C por 3 horas. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra foi alquilada com 5 µL de iodoacetamida 400 mM por 15 minutos no escuro e 130 µL de água foram adicionados para diluir a ureia a uma concentração final de 1 M.

O veneno foi digerido utilizando 10 μL de tripsina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em ácido acético 50 mM) em uma proporção de 1:50 (p/p) a 37°C por 16 h. A reação foi interrompida com 20 μL de ácido fórmico a 10% (v/v) em água deionizada até uma concentração final de 1% (v/v). A mistura de peptídeos trípticos foi feita em triplicata e dessalinizada utilizando um ZipTip C18/ P10 (Millipore) antes da corrida em NanoLC-MS.

3.3.2 Orbitrap MS

Os peptídeos trípticos foram fracionados no sistema Easy nLC II (Thermo Scientific) nanoflow HPLC conectado a um espectrômetro de massa (MS) LTQ Orbitrap XL (Thermo, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de íons nanoeletrospray. Os peptídeos foram colocados em uma coluna de 2 cm de comprimento (100 μm de diâmetro interno) contendo resina C18 (5 μm , poro de 100 Å, Magic C18 AQ, Bruker-Michrom, Auburn, CA) e fracionados em coluna RP-HPLC de 30 cm de comprimento (75 μm de diâmetro interno). As condições de gradiente foram: 2 a 40% de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) em solução de acetonitrila por 162 minutos e até 80% desta solução por 4 minutos. Essa concentração foi mantida por mais 2 minutos antes da coluna ser reequilibrada. Os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos no LTQ Orbitrap XL MS para análise. Varreduras precursoras foram feitas no detector de massas Orbitrap em uma resolução de 60.000 e em uma faixa de massa de 300 m/z a 1700 m/z, enquanto varreduras MS/MS foram adquiridas em um analisador trap linear. Com a exclusão de íons carregados individualmente, até 10 dos íons precursores mais intensos foram submetidos a varreduras iônicas de produto utilizando a dissociação induzida por colisão (CID) com uma energia de colisão normalizada de 35. Além disso, varreduras MS/MS só foram feitas para íons precursores que possuíam um limiar de sinal mínimo de 10.000 contagens. Os precursores selecionados para varreduras MS/MS foram excluídos por 30 segundos de uma varredura de íons repetidos dentro de um erro de massa de \pm 10 ppm.

3.3.3 Pesquisa em bases de dados

A base de dados utilizada na análise LTQ Orbitrap XL foi gentilmente fornecida por NICOLAU e colaboradores (2017). Todas as entradas que exibiram 100% de identidade de sequências e que eram uma parte de uma sequência mais longa, foram unidas em uma única entrada, usando a opção Generate Search DB do software PatternLab for Proteomics public domain (versão 4.0.0.27) (CARVALHO et al., 2016). Esta etapa excluiu 14.860 redundâncias, levando a um banco de dados contendo 92.955 entradas.

As buscas realizadas no banco de dados com os espectros de massa em tandem adquiridos pelo espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL foram feitas utilizando o programa Peaks Studio 8.0. Os parâmetros de busca para massas de peptídeos monoisotópicos permitiram duas falhas de clivagem enzimática. A carbamidometilação de resíduos de cisteína foi definida como modificação fixa e a oxidação (M), carbamilação (K, N-term), Piro-glu de Q (N-term) como modificações variáveis. Foi utilizada uma tolerância de massa de fragmentos de íons de 0,60 Da e uma tolerância de íon parental de 20 ppm. Para escolher dentre as modificações variáveis, a ferramenta PEAKS PTM algorithm WARE foi usada seguindo os mesmos parâmetros descritos acima e modificações com AScore 1000 foram selecionadas para as pesquisas. As taxas de descobertas falsas (FDR) foram estimadas pelo método PEAKS decoy fusion. Os critérios utilizados para estabelecer os valores de FDR no nível de peptídeo e proteína $\leq 1\%$ foram: FDR de 0,1% para a combinação peptídeo espectro e uma identificação de proteína com pelo menos um peptídeo único.

3.3.4 Quantificação relativa das proteínas

A quantificação foi feita através da contagem espectral de peptídeos a fim de estimar a proporção relativa de proteínas do veneno. Dentre os peptídeos identificados para cada entrada, apenas peptídeos que tiveram pelo menos um peptídeo único foram selecionados. Todas as entradas que apresentaram o mesmo conjunto de peptídeos foram removidas, evitando redundância na contagem espectral e a superestimação da quantidade de proteínas, especialmente para aquelas que apresentam um grande número de isoformas

nos bancos de dados. Após essa seleção, as proteínas foram classificadas por família e suas quantidades relativas estimadas.

3.4 Atividades enzimáticas

3.4.1 Ensaio de atividade hialuronidásica

Para quantificar a atividade hialuronidásica, 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 µg do veneno foram incubados com tampão acetato 0,2 M, NaCl 15 M, pH 6 e ácido hialurônico (HA) 2,5 mg/mL em uma placa para microtitulação de 96 poços (HORTA et al., 2014 com modificações). Uma curva com diferentes concentrações do ácido hialurônico foi utilizada como controle, correspondendo a valores de 100%, 75%, 50%, 25% e 0% de atividade do HA. A placa foi incubada a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, 200 µL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram adicionados aos poços para que houvesse a precipitação do ácido hialurônico. A turbidez produzida foi medida a 405 nm.

Quatro ensaios independentes foram realizados em duplicata e a média destes ensaios representada em um gráfico. Valores de 50% de atividade foram então calculados.

3.4.2 Ensaio de atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂)

Os ensaios de atividade fosfolipásica A₂ foram feitos utilizando o EnzChek[®] Phospholipase A₂ Assay Kit (Life Technologies) em placas de microtitulação de 96 poços. Dois microgramas do veneno foram colocados em tampão de reação (volume final de 50 µL). Posteriormente, foi preparado o *Lipid mix* (3 µL de Dioleoilfosfatidilcolina 10 mM; 3 µL de Dioleoilfosfatidilglicerol 10 mM e 3 µL de substrato de PLA₂ 1mM) e 5 µL desta mistura foram adicionados ao tampão de reação (volume final 500 µL) durante um minuto sobre agitação. Cinquenta microlitros dessa solução foram colocados em cada poço utilizado.

Como controle positivo, utilizou-se uma solução contendo PLA₂ do veneno de abelha (controle positivo fornecido pelo kit) em tampão de reação e somente o

tampão como controle negativo. Os ensaios foram realizados em duplicata e, após uma incubação de 10 minutos a 25°C, as fluorescências foram medidas a 460 nm de excitação e a 515 nm de emissão. A média de dois ensaios independentes foram calculadas e representadas como porcentagem de atividade em relação ao controle positivo.

3.4.3 Ensaio de atividade da L- aminoácido oxidase (LAAO)

Esse ensaio é baseado no H₂O₂ gerado durante a reação de desaminação oxidativa da L-leucina pela LAAO. O equivalente a 2 µg de *BbsV* foi colocado em uma solução de 10 mL contendo tampão Tris- HCl 0,1 M, pH 8,5; peroxidase 5 U/mL, L- Leucina 5 mM e o-fenilenediamina 2 mM (Pastilha Sigma diluída em 10 mL de água). Essa solução foi colocada em placa para microtitulação de 96 poços e incubada por uma hora a 37°C. A solução sem veneno foi utilizada como controle negativo e o veneno de *Bothrops moojeni* como controle positivo. Quando presente, o H₂O₂ oxida a o-fenilenediamina, produzindo um radical cátion possível de ser detectado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 490 nm. A reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 2 M e a absorbância determinada a 490 nm.

Três ensaios independentes foram realizados em duplicata e a unidade de atividade de LAAO foi considerada como a quantidade de veneno que produz um µmol de H₂O₂ por minuto, sob estas condições (BREGGE-SILVA et al., 2012).

3.4.4 Atividade proteolítica

3.4.4.1 Ensaio de atividade metaloproteinásica (SVMP)

A atividade de SVMP foi mensurada utilizando um peptídeo fluorescente do tipo FRET (Abz-LVEALYQ -EDDnp), que contém um sítio de clivagem específico para as metaloproteinases. Vinte microlitros deste peptídeo, anteriormente produzido por (SCHNEIDER et al., 2014) foram diluídos em 60 µL de tampão Tris-HCl 100 nM / NaCl 50 nM e incubados com 1 µg de *BbsV*. Após 30 minutos de incubação, a placa foi lida em um fluorímetro a 340 nm de excitação e 440 nm de emissão.

A média de três ensaios independentes, realizados em duplicata, foi representada em um gráfico em unidades arbitrárias de fluorescência.

3.4.4.2 Ensaio de atividade serino-proteinásica (SVSP)

Para medir a atividade de SVSP, *BbsV* foi pré-incubado com um inibidor de metaloproteinase (ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,2 μ M -Labsinth) durante 1 hora. O EDTA é um agente quelante que remove o zinco das metaloproteinases, inativando-as. Em seguida, o mesmo protocolo descrito para as SVMP foi empregado, mas, dessa vez, utilizando um peptídeo FRET com um sítio de clivagem específico para as serino-proteinases (Abz-FLPRSFRQ - EDDnp). A média de três ensaios independentes, realizados em duplicata, foi representada em unidades arbitrárias de fluorescência.

3.4.4.3 Ensaio da atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, seguindo o método descrito por Laemmli (1970) com modificações. Uma curva com diferentes concentrações de veneno diluído em tampão fosfato salino (PBS) foi preparada e 50 μ L de fibrinogênio bovino 2,5 mg/mL em tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 foi adicionado a essas amostras. Após incubação na estufa a 37°C por 30 minutos, 50 μ L de solução desnaturante (ureia 10M, β -mercaptoetanol 4% v/v e SDS 4% p/v) foi adicionada e mantida a temperatura ambiente por 18 horas. Ao término deste período, as amostras foram desnaturadas por ebulição durante 5 minutos em tampão de redução (Tris-HCl 0,7 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,25% p/v e glicerol 10% na presença de β -mercaptoetanol) e a corrida realizada a 200 V. Em seguida, a coloração foi feita pelo método de azul de Coomassie, no qual adiciona-se ao gel uma solução de Coomassie Blue R250 diluída em etanol 50% (v/v) e ácido fosfórico 10%. As bandas foram reveladas por sucessivas lavagens com solução descolorante (ácido acético 10%, metanol 50% e água destilada 40% v/v).

Para analisar a influência das metaloproteinases nessa atividade, o mesmo procedimento foi feito utilizando veneno previamente incubado com 50 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA- Labsinth) 2 mM.

3.5 Atividades *in vivo*

3.5.1 Atividade edematogênica

Para a análise da atividade edematogênica, 50 µL de uma solução contendo diferentes concentrações de veneno diluído em PBS (2,5 e 5 µg) foram injetados na pata direita de dois grupos de quatro camundongos fêmeas. A pata esquerda, usada como controle negativo, foi injetada com 50µl de solução salina (PBS, pH 7,4). O edema foi medido com o auxílio de paquímetro após 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos (1 hora), 180 minutos (3 horas), 360 minutos (6 horas) e 1440 minutos (24 horas) da injeção do veneno. A diferença de espessura das patas injetadas com veneno e com salina foi expressa, em porcentagem, de acordo com a fórmula:

$$E\% = \frac{P_v - P_s}{P_s} \times 100$$

Sendo P_v = pata injetada com veneno, P_s = pata injetada com salina e $E\%$ = porcentagem de edema.

Para os ensaios de neutralização desta atividade, 5 µg de *BbsV* foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C com P-BAV ou B- BAV em uma proporção de 1 µg de veneno para 10 µL de soro. O mesmo volume de cada soro foi utilizado como controle negativo.

3.5.2 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi analisada calculando-se a Dose Mínima Hemorrágica (DMH) como descrito por GUTIÉRREZ e colaboradores (1985). Seis grupos de quatro animais foram injetados subcutâneamente (s.c.) com diferentes concentrações de veneno diluído em PBS (0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg) na região dorsal. Duas horas depois, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. A pele do dorso foi então retirada e a área hemorrágica

da região injetada foi medida utilizando o software de análise de imagem Image J. PBS foi utilizado como controle negativo. A DMH foi definida como a quantidade de veneno (μg) necessária para produzir um halo hemorrágico com 10mm de diâmetro.

A neutralização da atividade hemorrágica foi realizada através de injeções subcutâneas de 20 μg de veneno previamente incubados com P-BAV ou B-BAV por 30 minutos a 37°C. A lesão gerada por 20 μg do veneno foi considerada como 100% da atividade hemorrágica e a porcentagem de neutralização foi calculada a partir da redução desta lesão.

3.5.3 Atividade Letal Mediana (DL₅₀)

A DL₅₀ foi definida como a dose mínima necessária para matar 50% dos animais e foi calculada de acordo com o método PROBITO (FINNEY, 1971). Camundongos fêmeas da linhagem Swiss foram divididos em cinco grupos de quatro animais. Os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal contendo diferentes concentrações de veneno (48; 60; 75; 93,75; 117,18 e 146,48 μg) diluídas em PBS (volume final 0,5 mL). Após 48 horas, o número de animais mortos para cada dose foi registrado.

3.6 Atividade citotóxica

Para realização da atividade citotóxica de *BbsV*, a linhagem celular VERO, proveniente de células epiteliais de rim de macaco verde africano, foram utilizadas. Todas as células foram cultivadas em Meio Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino (Thermo Scientific- HyClone) e 0,2% de gentamicina (Gibco by Life Technologies). Durante a cultura, as células foram mantidas em um ambiente a 37°C, com 10% de gás carbônico (CO₂).

A citotoxicidade foi avaliada pelo método descrito por Damico e colaboradores (2007) com modificações. Antes da realização do ensaio, as células foram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços e incubadas a 37°C e 10% de CO₂. Após 24 horas, uma curva de diluição com diferentes

concentrações de *BbsV* (1,25 µg/mL a 80 µg/mL) foi feita e a placa novamente incubada por 24h sob as mesmas condições. Em seguida, foi feita uma diluição de Alamar Blue® em DMEM (10% v/v). Essa solução foi então adicionada aos poços e a placa incubada por mais 3 horas. Após este período, os valores foram medidos por um fluorímetro a 540 nm de excitação e 590 nm de emissão.

3.7 Eletroforeses

3.7.1 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida com SDS

Para analisar o perfil proteico do veneno, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS), como descrito por Laemmli (1970). Para a preparação do gel de separação de 12%, foram utilizados acrilamida 30% (p/v), bis-acrilamida 0,8% (p/v), SDS 10% (p/v), persulfato de amônio 10% (p/v), TEMED (1:2000 v/v) e Tris-HCl 1,5 M pH 6,6. Para o gel de concentração de 4% as mesmas soluções foram utilizadas em menores volumes, exceto pelo Tris-HCl que foi usado em menor concentração (0,5 M ao invés de 1,5 M). Quantidades equivalentes a 10, 15, 20 e 25 µg do veneno foram solubilizadas em tampão de amostra. A corrida foi feita a voltagem de 200 V e, em seguida, o gel foi corado pelo método da prata. Para a coloração, houve a fixação em metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,04% (v/v) em água, por uma hora. Após a fixação, o gel foi incubado por um minuto em tiosulfato de sódio 0,04% (p/v) e depois por 20 minutos em solução de prata (nitrato de prata 0,1% (p/v) e formaldeído 0,075% (v/v)). Ao final desse processo, foi feita incubação com carbonato de sódio 6% (p/v), formaldeído 0,05% (v/v) e 2 mL da solução de tiosulfato de sódio até a sua revelação. A reação foi parada com uma solução de metanol 50% e ácido acético 12% (v/v). Entre cada incubação o gel foi lavado três vezes com água destilada durante 7 minutos.

3.7.2 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com SDS

Para a eletroforese bidimensional, 40 µg do veneno foram diluídos em 125 µL de um tampão contendo 0,5% de IPG buffer pH 4-7, 50mM de DTT, 1% de inibidor de protease e solução de reidratação (GE Healthcare). Uma IPG *strip* de

7cm com pH linear entre 4-7 (GE Healthcare) foi incubada *overnight* com esse tampão (anteriormente foi utilizada uma strip de pH linear entre 3-10 para avaliar a faixa de distribuição das proteínas). A primeira dimensão foi feita em um aparelho Ettan™ IPGphor™ 3 (GE Healthcare Life) conforme descrito pelo fabricante. Nele, as *strips* foram isofocalizadas a 20°C utilizando-se um programa de eletroforese de 5 fases (100 V por 1h, 200 V por 1h, 500 V por 1h, 1000 V por 1h, 3500 V por 3:30h, 3500 V por 30 minutos e 500 V por 30 minutos). Antes da segunda dimensão, as *strips* foram colocadas em tampão de reidratação e as proteínas nelas contidas foram reduzidas e alcalinizadas pelas seguintes soluções: 0,04 M Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS; 30% glicerol (tampão de equilíbrio); 4 mg/mL de DTT em tampão de equilíbrio e uma solução de 40 mg/mL de iodocetamida em tampão de equilíbrio. A *strip* foi então colocada para correr em um gel de poliacrilamida 12% a 200 V. Em seguida, o gel foi corado pelo método da prata como descrito em 3.7.1.

3.8 Imunoensaios

3.8.1 ELISA

Uma microplaca com 96 poços foi sensibilizada com 100 µL de uma solução contendo tampão carbonato (pH 9,8) e 0,5 µg de veneno. Em seguida, a placa foi incubada *overnight* a 4°C. Após este período, os poços foram lavados três vezes com PBS-Tween 0,01% e bloqueados com uma solução contendo 3% de leite em pó diluído em PBS (100 µL/poço). Após uma hora de incubação em estufa a 37°C, foram feitas três lavagens com PBS-Tween 0,01% para posterior adição de diferentes soros comerciais diluídos em tampão de incubação (leite em pó 0,1% em PBS e PBS-Tween 0,05%). Os soros utilizados foram o P-BAV, B-BAV ou o pré-imune de cavalo. Após 1 hora na estufa a 37°C, os poços foram novamente lavados com PBS-Tween 0,01% por três vezes. Em seguida, o conjugado anti-IgG de cavalo-peroxidase (1/6.000 em PBS) foi adicionado e a placa foi incubada na estufa por mais uma hora a 37°C. Depois de três lavagens com PBS-Tween 0,01%, o-fenilenediamina 2mM (SigmaFast diluída em 20mL de água) foi adicionada para revelação. A reação foi parada com 25µL de ácido

sulfúrico (H₂SO₄) e a leitura realizada a 492nm (BioRad iMark™ Microplate Reader, USA).

3.8.2 Western Blot

Para a realização do Western Blot, 10, 15, 20 e 25 µg de *BbsV* foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,6; azul de bromofenol 0,2% (p/v) e glicerol 10%) e separadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%, como previamente descrito nesse estudo. As proteínas contidas no gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose a 400 mA *overnight* (Towbin et al., 1979). Posteriormente, essa membrana foi bloqueada com PBS-Tween 0,3% durante uma hora. Após três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0,05%, a membrana foi incubada por mais 1 hora com um dos seguintes soros comerciais diluídos em PBS (1/5.000): o pré-imune de cavalo, P-BAV ou B-BAV. A membrana foi então lavada três vezes durante 5 minutos com PBS-Tween 0,05% e incubada com um conjugado anti-IgG de cavalo-peroxidase (1/6.000 em PBS) durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois, mais três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0,05% foram feitas e a reação foi revelada usando DAB/cloronaftol, de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich).

3.9 Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi determinada pelo software GraphPad Prism 6, utilizando o one-way analysis of variance (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni para os ensaios viabilidade celular e para a atividade e neutralização da hemorragia. Para a atividade de edema e sua neutralização, foi utilizado o two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni e para a atividade de LAAO foi usado o teste t de Student.

4 Resultados

4.1 Análise proteômica por shotgun

A análise shotgun foi realizada a fim de obter uma ampla visão da composição de *BbsV* e quantificar relativamente os principais constituintes do veneno por contagem espectral de peptídeos. Foram realizadas três replicatas por amostra e a análise de dados dos peptídeos identificou 122 entradas de proteínas. Apenas proteínas que tinham pelo menos um peptídeo único e um FDR <1% foram consideradas para análise. As proteínas foram então agrupadas por classes e a proporção relativa delas no veneno foi estimada por contagem espectral associada com pelo menos um peptídeo único (Fig. 3). Sequências identificadas pelo mesmo grupo de peptídeos foram descartadas, o que resultou em uma redução de 59 entradas da lista original. A Fig. 3 mostra que as SVMs foram a família de proteínas mais abundante (45,93%) seguidas por Lectinas do tipo C (22,37%), SVSPs (11,11%), L-aminoácido oxidases (6,62%), fosfolipases B (2,69%), 5' nucleotidases (2,37%), PLA₂ (2,22%), fosfodiesterases (2,2%), proteínas de veneno ricas em cisteína (1,97%) e outras proteínas.

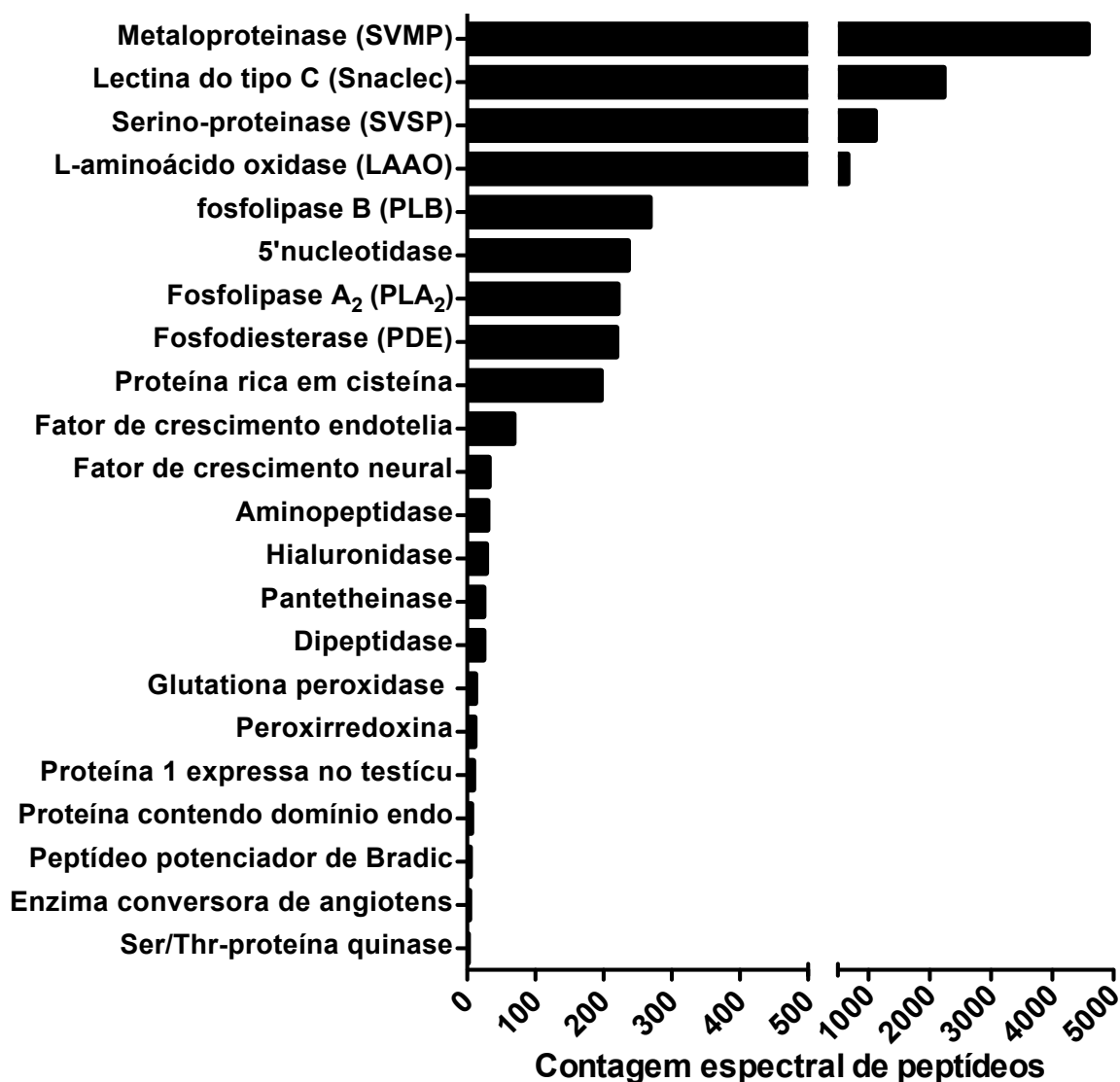


Fig. 3 Agrupamento de classes das diferentes proteínas identificadas por proteômica e sua contribuição relativa na composição proteica de BbsV. Distribuição das classes de proteínas. Proteínas foram identificadas por pelo menos um peptídeo único e uma FDR $\leq 1\%$ nos níveis de peptídeo e proteína

4.2 Atividades enzimáticas

4.2.1 Atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi realizada utilizando uma solução padrão de ácido hialurônico e diferentes quantidades de *BbsV*. O resultado foi expresso pela quantidade de veneno necessária para degradar 50% do ácido hialurônico

presente na solução (EC_{50}) e o valor encontrado foi o de 58,7 μ g de veneno (Fig. 4).

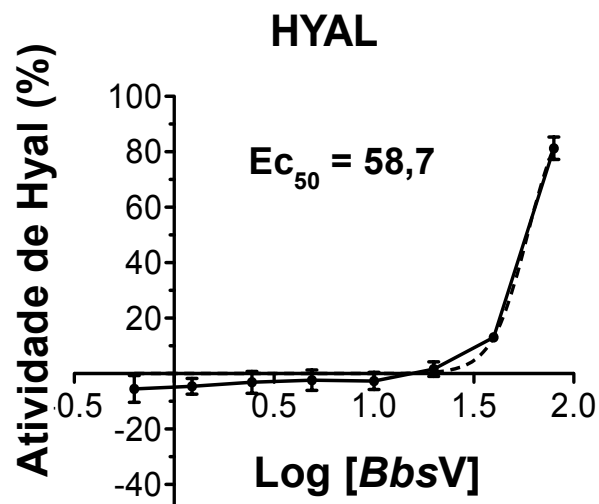


Fig. 4 Ensaio de atividade hialuronidásica de *BbsV*. Atividade representada pela quantidade de veneno que é necessária para degradar 50% do ácido hialurônico de acordo com a curva padrão. Dados representados como média \pm DP de quatro ensaios.

4.2.2 Atividade de PLA₂

A atividade fosfolipásica A₂ foi medida com o auxílio do EnzChek[®] Phospholipase A₂ Assay Kit. Os resultados foram representados como porcentagem de atividade em relação ao controle positivo do kit. *BbsV* apresentou atividade de PLA₂, mas essa atividade foi inferior à do controle positivo do kit (Fig. 5).

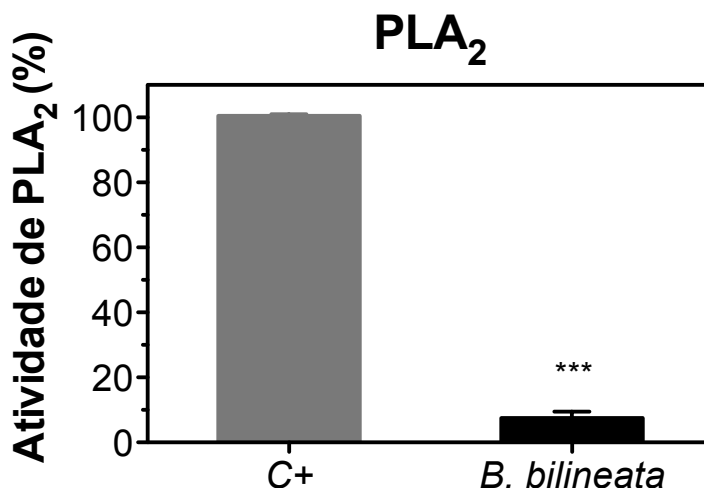


Fig. 5 Ensaio de atividade fosfolipásica A₂ de *BbsV*. Atividade medida pelo EnzChek[®] Phospholipase A₂ Assay Kit. Dados representam a porcentagem de atividade em relação ao controle positivo do kit. Gráfico representa a média \pm DP de dois ensaios, *** $p < 0,0005$

4.2.3 Atividade de LAAO

Para a atividade da L- aminoácido oxidase foi utilizada L-leucina como substrato e 2 μ g de veneno. A atividade foi representada em U/mg/min da forma ativa da enzima. Essa unidade é equivalente a quantidade de veneno necessária para produzir 1 μ mol de H₂O₂ por minuto. Os resultados (Fig. 6) mostram que *BbsV* apresenta atividade de LAAO e que esta atividade é inferior ao encontrado para o veneno de *Bothrops moojeni*, utilizado como controle positivo.

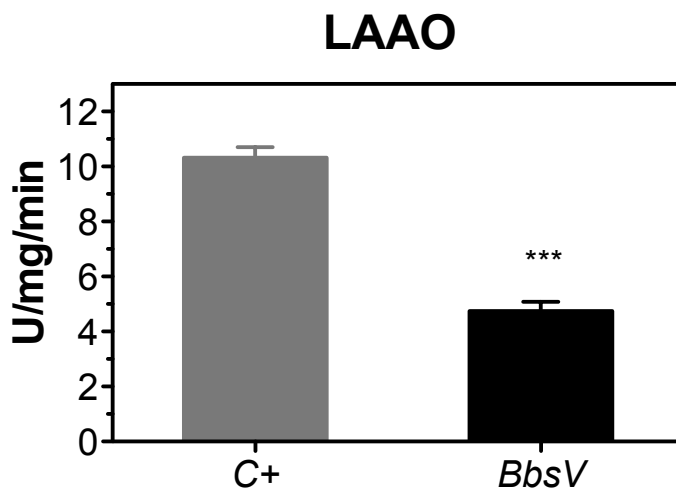


Fig. 6 Ensaio de atividade da L-aminoácido oxidase de *BbsV*. Atividade representada em U/mg/min da forma ativa de LAAO para os venenos de *BbsV* e *B. moojeni* e medida a 490 nm. Resultados correspondem a média \pm DP de três ensaios. *** $p < 0,0004$ vs. controle.

4.2.4 Atividades proteolíticas

4.2.4.1 Atividade de SVMP

A atividade metaloproteinásica foi medida a partir da fluorescência produzida pela hidrólise do substrato FRET e os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. A Fig. 7 mostra que *BbsV* apresenta atividade metaloproteinásica e que esta atividade é proporcional a quantidade de veneno utilizada.

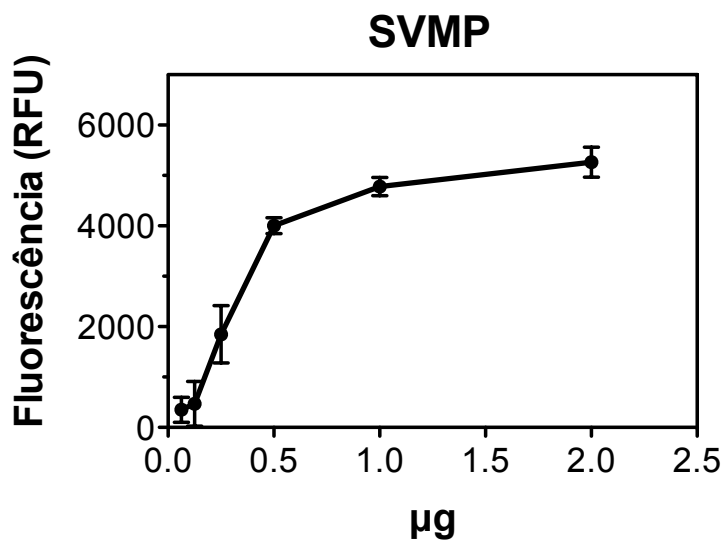


Fig. 7 Ensaio de atividade metaloproteinásica de *BbsV*. Atividade representada em unidades arbitrárias de fluorescência (RFU) produzidas ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) pela hidrólise do peptídeo FRET. Dados correspondem a média \pm DP de três ensaios.

4.2.4.2 Atividade de SVSP

A atividade serino-proteinásica também foi mensurada a partir da fluorescência produzida pela hidrólise do substrato FRET. A Fig. 8 mostra que *BbsV* apresenta atividade serino-proteinásica e que esta atividade também é proporcional a quantidade de veneno utilizada.

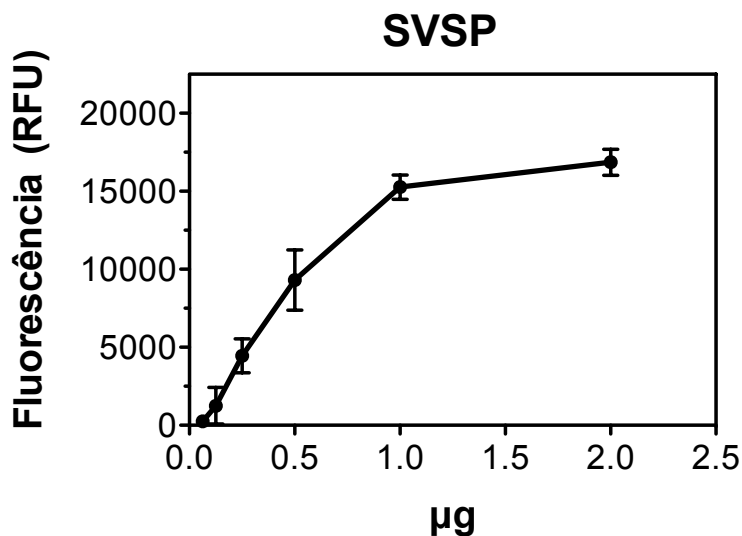


Fig. 8 Ensaio de atividade serino-proteinásica de *BbsV*. Atividade representada em unidades arbitrárias de fluorescência (RFU) produzida ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$) pela a hidrólise do substrato FRET. Resultados representados como média \pm DP de três ensaios.

4.2.4.3 Atividade fibrinogenolítica

O fibrinogênio bovino, assim como o humano, é composto por três subunidades, $A\alpha$ (66 kDa), $B\beta$ (54 kDa) e γ (48 kDa). *BbsV* foi capaz de agir em duas subunidades ($A\alpha$ e $B\beta$) (Fig. 9A). Foi observado também que a atividade fibrinogenolítica é quantidade dependente.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando veneno incubado com EDTA, um inibidor de metaloproteinase. Os resultados mostram que as amostras com EDTA quebraram menos o fibrinogênio que as amostras sem EDTA (Fig. 9 B).

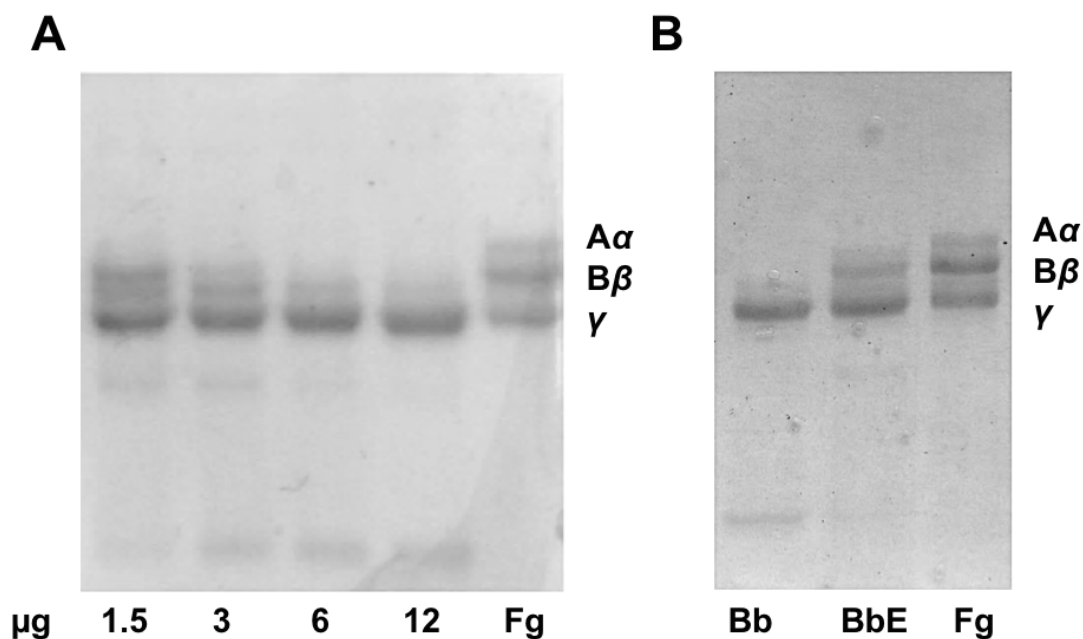


Fig. 9 Atividade fibrinogenolítica de *BbsV*. O fibrinogênio é formado por três cadeias de polipeptídeos A α (66 kDa), B β (54 kDa) e γ (48 kDa). (A) Digestão do fibrinogênio após incubação com 12, 6, 3 e 1,5 μ g de *BbsV*. O controle negativo utilizado foi fibrinogênio. (B) Digestão do fibrinogênio após a incubação com EDTA. Bb 3 μ g de *BbsV*. BbE 3 μ g de *BbsV* incubado com EDTA. Fg Fibrinogênio.

4.3 Atividades *in vivo*

4.3.1 Atividade edematogênica

Após a administração do veneno na pata direita dos camundongos, observou-se a formação precoce de edema, principalmente no grupo que recebeu 5 μ g. Esse edema teve seu pico máximo após 3h de envenenamento e persistiu por mais de 24h (Fig. 10). A atividade edematogênica foi observada para ambas as doses testadas, tendo sua intensidade aumentada no grupo de maior dose. Além disso, houve hemorragia macroscópica em todos os camundongos testados (Fig. 11B).

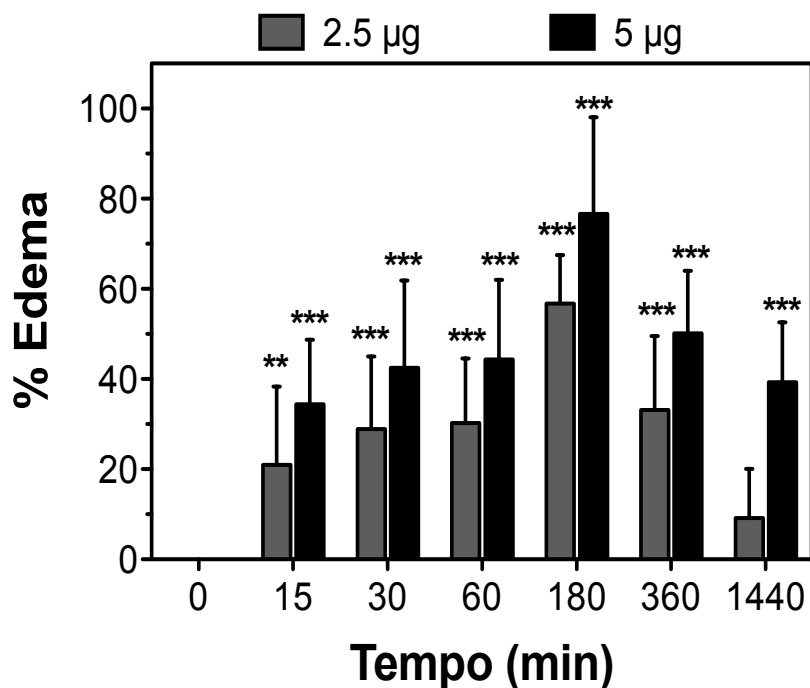


Fig. 10 Ensaio de atividade edematogênica de *BbsV*. A atividade edematogênica foi avaliada após a injeção de *BbsV* na para direita dos camundongos. A pata esquerda recebeu solução salina (PBS) e foi utilizada como controle. O gráfico mostra a porcentagem de aumento da espessura da pata causado por 2,5 e 5 µg de veneno de *BbsV* em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60, 180, 360 e 1440 min). Resultados correspondem à média \pm DP de quatro camundongos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. controle.

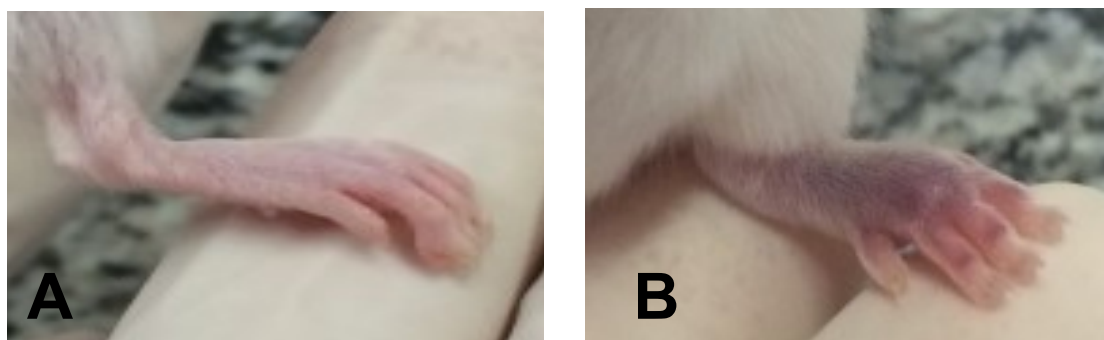


Fig. 11 Hemorragia macroscópica da atividade edematogênica. (A) Pata após administração de PBS. (B) Pata após administração de 5 µg do veneno, presença de hemorragia macroscópica.

A fim de avaliar a neutralização da atividade edematogênica, 5 µg de *BbsV* foram pré-incubados com P-BAV ou B-BAV por 30 minutos a 37°C. Ambos os antivenenos foram capazes de neutralizar o edema causado por esta quantidade de veneno (Fig. 12).

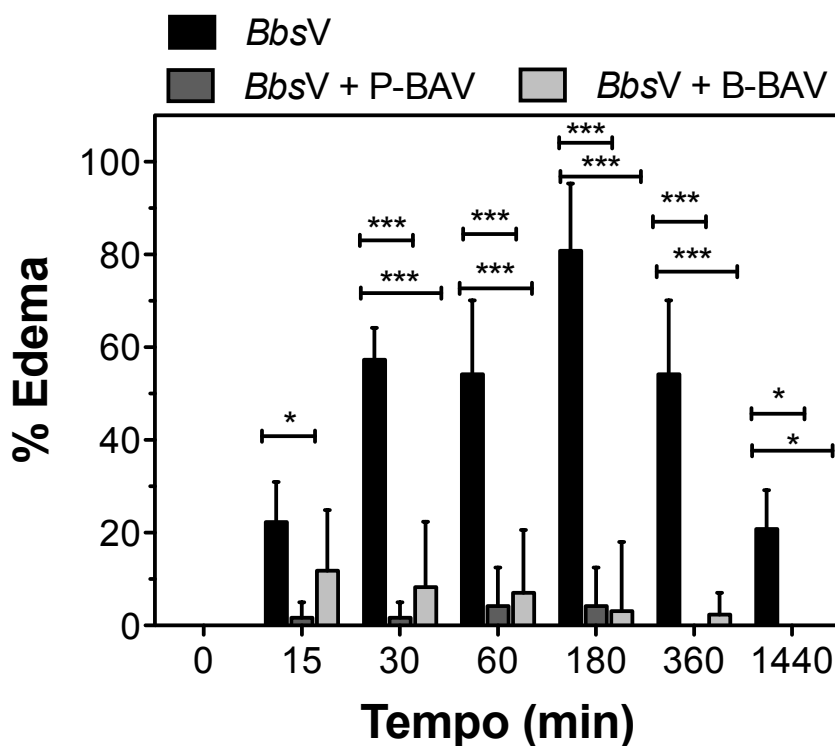


Fig. 12 Neutralização do edema. *BbsV* (5 μ g) foi pré-incubado com B-BAV ou P-BAV por 30 min e a grossura da pata foi medida em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60, 180, 360 e 1440 min). Dados representados como média \pm DP de 4 camundongos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. controle.

4.3.2 Atividade hemorrágica

Por meio de injeções subcutâneas, foi possível avaliar a atividade hemorrágica de *BbsV*. Os resultados mostram que a hemorragia induzida é dose dependente (Fig. 13), sendo macroscopicamente visível a partir de 1,25 μ g (Fig. 14). A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) é definida como a quantidade mínima de veneno capaz de gerar um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro. A partir da curva dose resposta do veneno a DMH foi calculada, obtendo-se o valor de 2,5 μ g.

A neutralização desta atividade foi analisada através da incubação de *BbsV* com P-BAV ou B-BAV. As Fig. 15 e 16 mostra que ambos os soros foram capazes de neutralizar os halos hemorrágicos gerados.

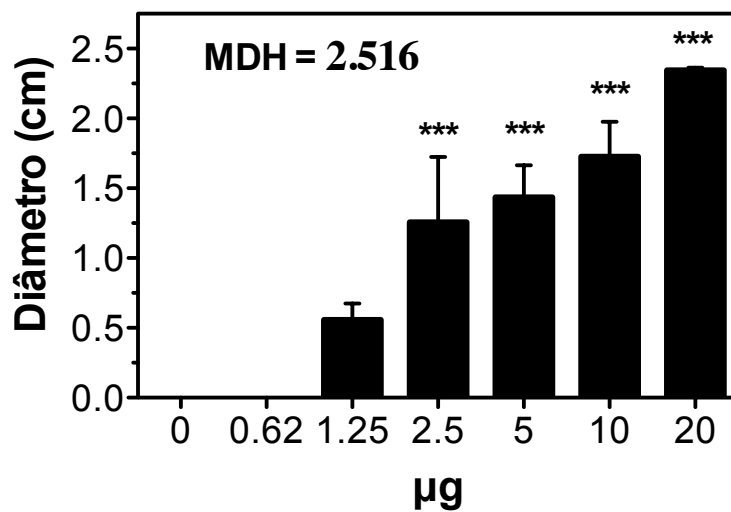


Fig. 13 Atividade hemorrágica de *BbsV*. A atividade hemorrágica foi avaliada após a injeção subcutânea de diferentes quantidades de *BbsV* (0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg). Salina (PBS) foi utilizada como controle negativo. Dados representados com média ± DP de quatro animais. **p<0,01, ***p<0,001 vs. controle.

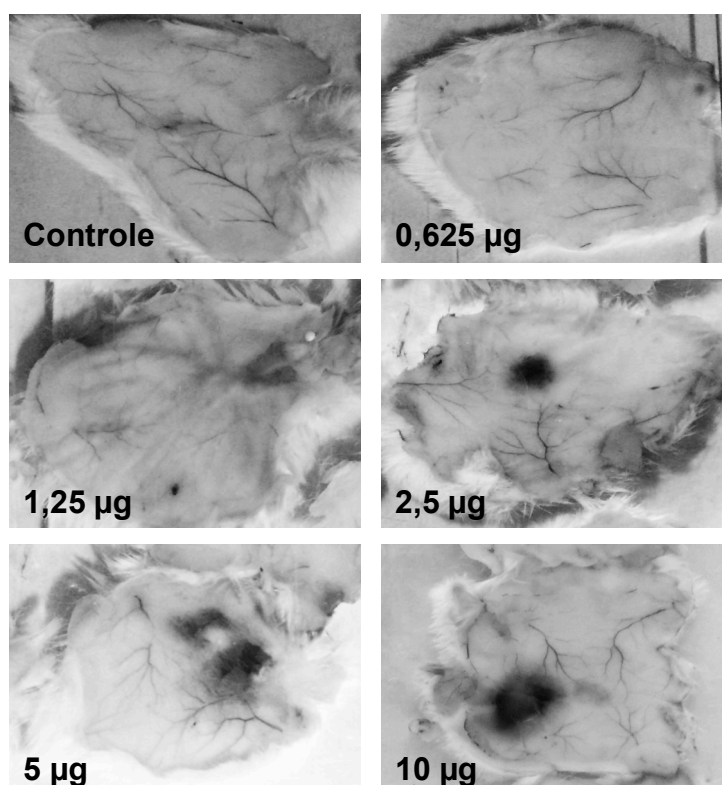


Fig. 14 Lesões hemorrágicas. Lesões hemorrágicas induzidas 2 h após a injeção subcutânea de diferentes quantidades de *BbsV* (0, 625; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg).

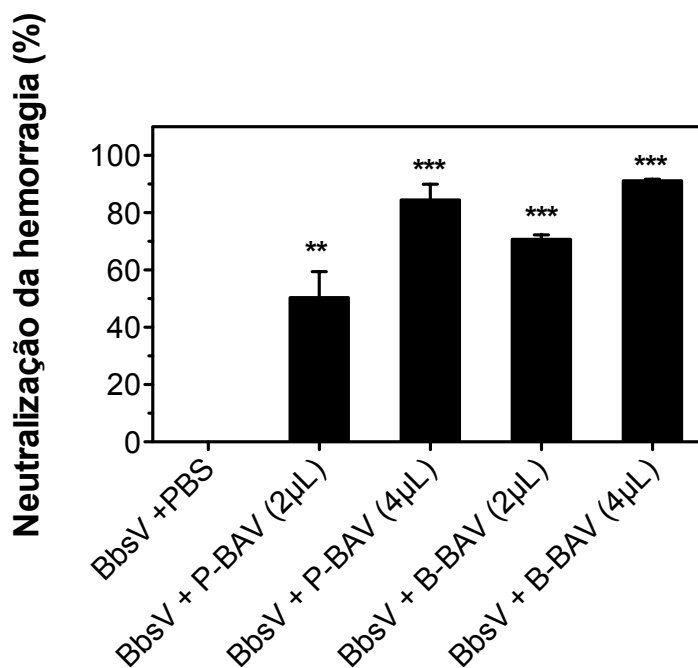


Fig. 15 Neutralização da atividade hemorrágica de *BbsV*. A neutralização da atividade hemorrágica foi avaliada após a injeção subcutânea de 20 µg de *BbsV* pré-incubado com P-BAV ou B-BAV (2 ou 4 µL). Salina (PBS) foi utilizada como controle negativo. Dados representados com média ± DP de quatro animais. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. controle.

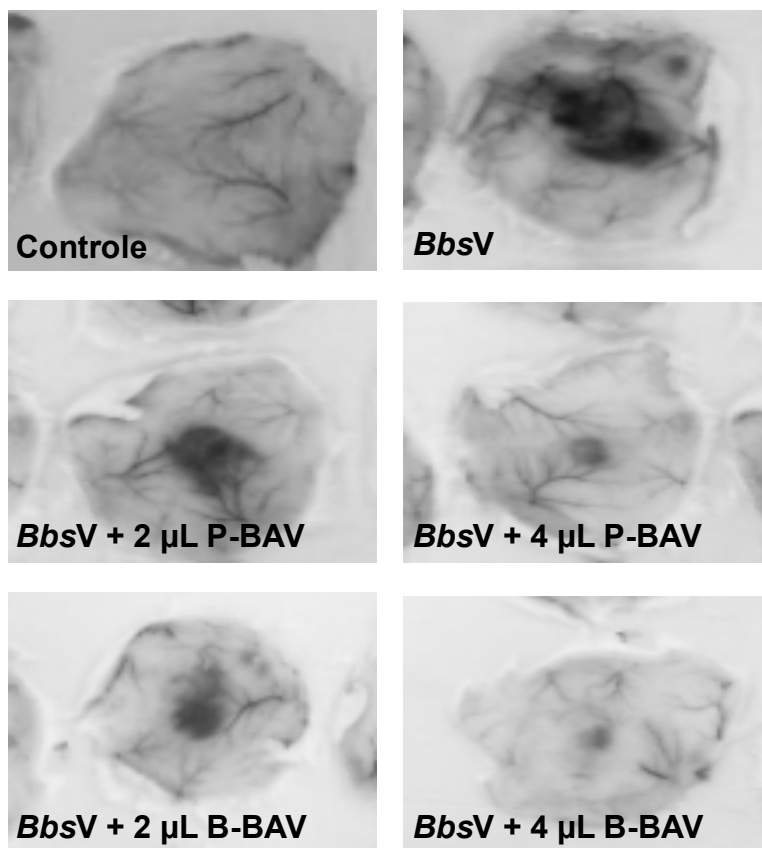


Fig. 16 Lesões hemorrágicas na presença de antivenenos. Lesões hemorrágicas produzidas depois de 2 h da injeção subcutânea de 20 µg de *BbsV* pré-incubado com P-BAV ou B-BAV (2 ou 4 µL).

4.3.3 Atividade Letal

A DL_{50} foi estimada através do número de mortes induzidas 48h após a injeção intraperitoneal de diferentes doses de *BbsV* (Tabela 2) e o valor obtido foi de 92,74 ($\pm 0,15$) µg/20 g de camundongo.

Tabela 2 Atividade letal intraperitoneal de *BbsV*. Atividade letal dose dependente de *BbsV* em camundongos

<i>BbsV</i> ($\mu\text{g}/20\text{g}$ de camundongo)	Mortos/Desafiados	Morte (%)
48	0/4	0
60	1/4	25
75	1/4	25
93,75	2/4	50
117,18	3/4	75
146,48	4/4	100

4.4 Atividade citotóxica

A linhagem celular VERO foi testada contra várias diluições de *BbsV* (1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As concentrações de 40 e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular. A partir da curva dose-resposta foi calculada a EC_{50} que é a quantidade de veneno necessária para diminuir a viabilidade celular em 50%, obtendo-se o valor de 29,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 17)

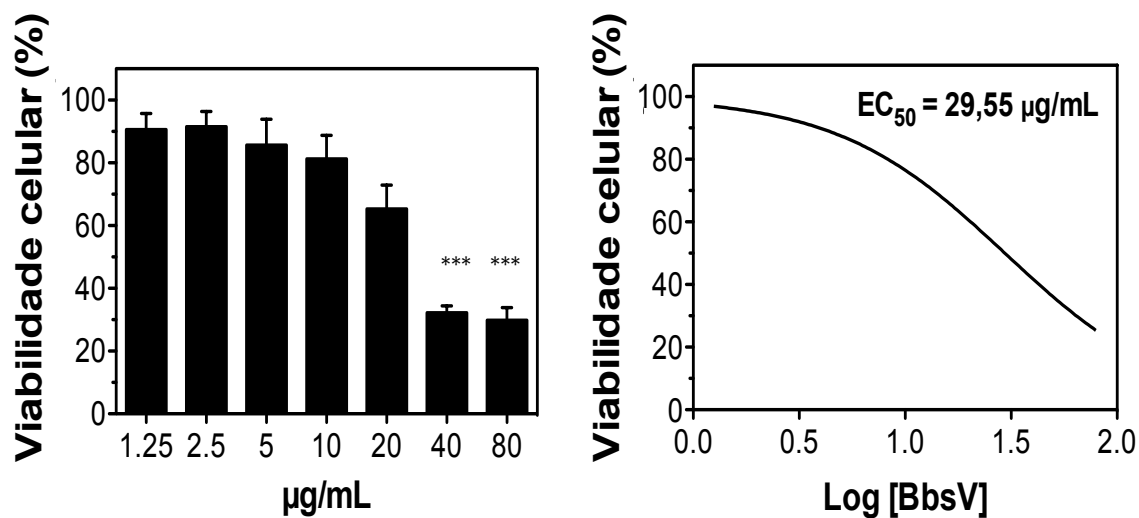


Fig. 17 Atividade citotóxica do veneno de *BbsV*. Viabilidade celular da linhagem VERO após 24 h da adição de *BbsV* (1,25-80 µg/mL). A viabilidade celular foi medida utilizando o ensaio de Alamar Blue[®]. Resultados representam a média ± DP de dois ensaios. ***P < 0,001 vs. controle.

4.5 Eletroforeses

4.5.1 Eletroforese unidimensional (1D)

As proteínas do veneno foram separadas por tamanho e tiveram sua massa molecular relativa determinada. O perfil proteico encontrado em condições não redutoras (Fig. 18) mostra proteínas com massas moleculares variadas. Foi feita a identificação das possíveis famílias de proteínas presentes, de acordo com Zelanis e colaboradores (2016).

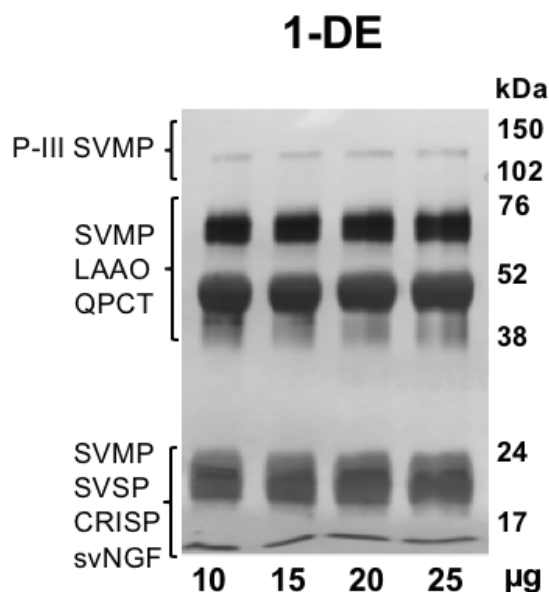


Fig. 18 Perfil proteico do veneno bruto de *BbsV* por SDS-PAGE unidimensional. Gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), corado por prata, representando o perfil proteico do veneno bruto de *BbsV* em condições não redutoras. Os números abaixo do gel representam a quantidade de veneno aplicada por poço (10, 15, 20 e 25 µg). SVMP Metaloproteinases de veneno de serpentes; SVSP Serino-proteinase de veneno de serpente; LAAO L-aminoácido oxidase; QPCT Glutaminil-peptídeo ciclotransferase; CRISP proteínas secretoras ricas em cisteína; svNGF Fator de crescimento neural de veneno de serpente.

4.5.2 Eletroforese bidimensional (2D)

Na eletroforese bidimensional, as proteínas do veneno foram separadas de acordo com sua massa molecular e ponto isoelétrico. O resultado obtido (Fig. 19) mostra pelo menos 30 proteínas, representando proteínas com diferentes pontos isoelétricos e massas moleculares. Mais uma vez foi feita a identificação das possíveis famílias de proteínas presentes, baseando-se no estudo de Zelanis e colaboradores (2016).

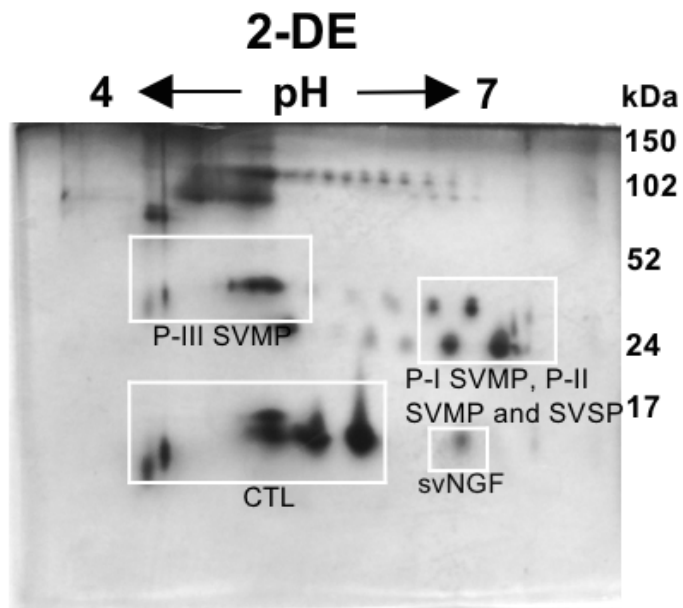


Fig. 19 Perfil proteico do veneno bruto de *BbsV* por SDS-PAGE bidimensional. Quarenta microgramas de veneno foram submetidos a isofocalização (pH 4-7) e eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. SVMP Metaloproteínas de veneno de serpentes; SVSP Serino-proteinase de veneno de serpente; LAAO L-aminoácido oxidase; QPCT Glutaminil-peptídeo ciclotransferase; CRISP proteínas secretoras ricas em cisteína; svNGF Fator de crescimento neural de veneno de serpente.

4.6 Imunoensaios

4.6.1 ELISA

BbsV foi utilizado como antígeno para a realização de ensaios de ELISA indireto. A Fig. 20 mostra a reatividade de diferentes diluições dos soros. B-BAV e P-BAV apresentaram títulos comparáveis, havendo reatividade cruzada entre eles e *BbsV*.

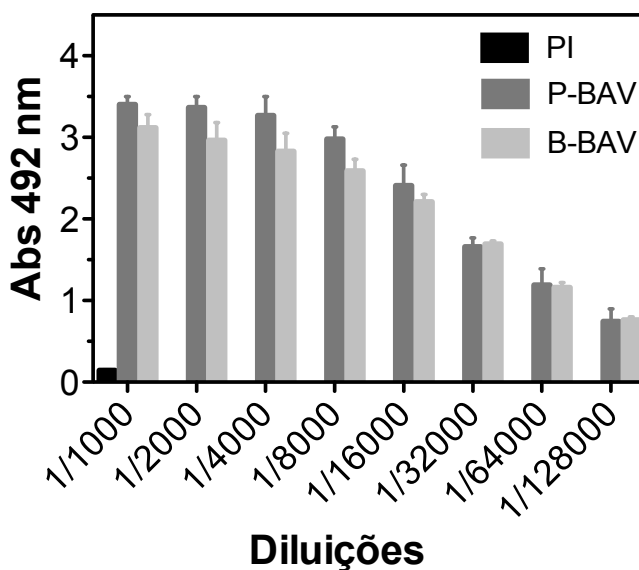


Fig. 20 Reação imunoenzimática de *BbsV* frente aos soros antitoxínicos. Comparação entre a reatividade de P-BAV e B-BAV a *BbsV* (5 µg/mL). Dados representados como absorbância a 492 nm em relação a diluição dos antivenenos (1:1.000 – 1:128.000).

4.6.2 Western Blot

Por meio da técnica de Western Blot foi possível verificar o reconhecimento do conteúdo proteico de *BbsV* por P-BAV e B-BAV. Ambos os soros foram eficientes na detecção destas proteínas e nenhuma reatividade foi detectada quando a membrana foi testada com soro pré-imune de cavalo (Fig. 21 e 22).

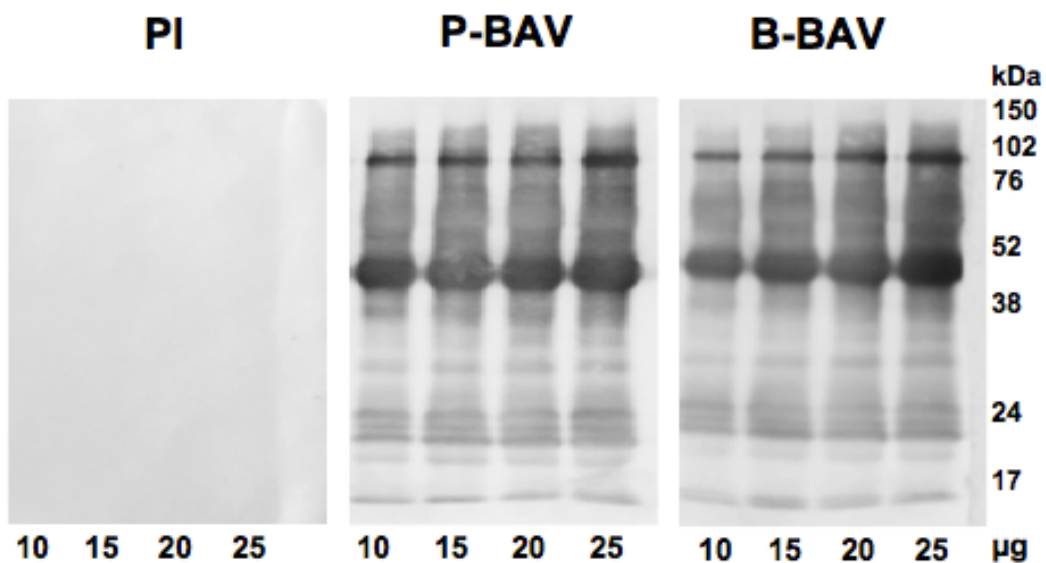


Fig. 21 Western Blots 1D. As proteínas contidas nos géis 1D foram transferidas para membrana de nitrocelulose e testadas contra o soro pré-imune (PI), P-BAV e B-BAV respectivamente (1/5.000).

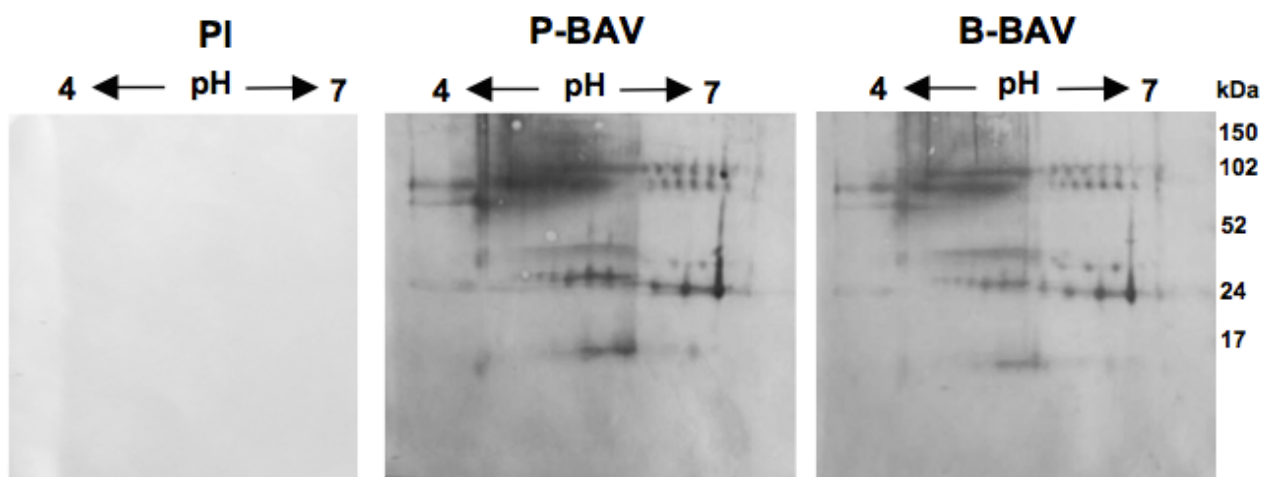


Fig. 22 Western Blots 2D. Os géis 2D foram transferidos para membrana de nitrocelulose e testados contra PI, P-BAV e B-BAV respectivamente (1/5.000).

5 Discussão

O envenenamento botrópico é caracterizado por efeitos locais, como edema, dor e equimose, e efeitos sistêmicos, como hipotensão arterial, hemorragia e choque (BRASIL, 2001). Estes efeitos estão relacionados a composição do veneno, que pode variar entre as espécies. A composição de *BbsV* é semelhante à de outros venenos botrópicos. No entanto, a quantificação relativa de proteínas por contagem espectral revelou que a proporção das famílias de proteínas deste veneno é diferente da que foi previamente relatada para o veneno de *B. jararaca* (NICOLAU et al., 2017).

A fim de observar a variação interespecífica, os autores de Guerra-Duarte e colaboradores (2015) realizaram a caracterização imunológica e enzimática do veneno de 11 *Bothrops* peruanas. A Tabela 3 compara os resultados enzimáticos obtidos por estes autores para os venenos de *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. barnetti* e *B. pictus* aos obtidos para *BbsV*. Em comparação a esses venenos, *BbsV* tem a menor atividade de Hyal. No entanto, os valores obtidos para esta atividade é similar ao encontrado para outros venenos botrópicos como o de *B. atrox*. A análise proteômica também apresentou baixa quantidade de Hyal, corroborando o resultado enzimático encontrado.

Tabela 3 Comparação entre as atividades de *Bothrops spp.* As atividades de BbsV foram comparadas as dos venenos de outras *Bothrops*. Os dados foram obtidos como descrito no Material e métodos e foram representados como médias de experimentos independentes. Hyal (hialuronidase); PLA₂ (fosfolipase A₂); LAAO (L-aminoácido oxidase); SVMP (metaloproteinase de veneno de serpente); SVSP (serino-proteinase de veneno de serpente); EC₅₀ (concentração efetiva média).

Veneno	Hyal ($\mu\text{g}/50\%\text{atv.}$)	PLA₂ ($\%\text{atv.}$)	LAAO (U/mg/min)	SVMP (RFU)	SVSP (RFU)	Citotox (EC ₅₀)
<i>B. bilineata</i>	58.7	7.47	4.74	5263.5	16859.33	29.55
<i>B. jararaca</i> ^a	48.39	54.19	3.48	7739.88	4350.17	18.78
<i>B. atrox</i> ^a	61.03	87.93	10.31	5698.75	2571.5	12.12
<i>B. barnetti</i> ^a	45.04	11.02	1.39	5391.92	578.17	16.01
<i>B. pictus</i> ^a	45.01	80.03	3.22	2797.42	5501.67	19.6

^a: Dados retirados de Guerra-Duarte e colaboradores (2015).

As Hyals contribuem para a toxicidade dos venenos, uma vez que atuam como um “fator de espalhamento” e degradam o ácido hialurônico presente na matriz extracelular, facilitando o colapso sistêmico da vítima (BORDON, 2012; FOX, 2013). Apesar da sua importância no processo de envenenamento e da sua ubiquidade nos venenos de serpentes, existem poucos estudos publicados sobre as hialuronidases ofídicas (KUDO; TU, 2001). As Hyals, junto com outras toxinas pró-inflamatórias, podem ser responsáveis por causar edema local (KEMPARAJU; GIRISH, 2006) e sua atividade já foi correlacionada com a atividade letal de venenos de *Bothrops* (SOUZA et al., 2015).

Outra enzima presente nos venenos são as PLA₂s, que tem atraído grande atenção dos pesquisadores devido aos seus efeitos antimicrobianos, antitumorais e pró-inflamatórios (BAZAA et al., 2010; LANDUCCI et al., 1998; SOARES et al., 1998; ZHAO; KINNUNEN, 2003). Foi encontrada baixa atividade de PLA₂ nos ensaios enzimáticos realizados, confirmando os achados

proteômicos que mostraram uma pequena quantidade de PLA₂ no veneno. Esta foi uma diferença marcante do proteoma de *BbsV* quando comparado aos de outros venenos descritos para *Bothrops* (ALAPE-GIRÓN et al., 2008; BERNARDES et al., 2013; GUÉRCIO et al., 2006; TASHIMA et al., 2008).

Um estudo recente não detectou presença de PLA₂ em *BbsV* por espectrometria de massa, mas encontrou uma moderada atividade fosfolipásica A₂ em ensaios enzimáticos e bandas entre 12 e 15 kDa no SDS-PAGE, indicando a presença desta enzima (DEBONO et al., 2016). Tais resultados confirmam o encontrado em outro estudo que avaliou venenos botrópicos de serpentes da floresta amazônica brasileira e demonstraram uma moderada atividade de PLA₂ em *BbsV* (MUNIZ et al., 2000).

O perfil proteômico encontrado e os ensaios enzimáticos realizados no presente estudo mostraram uma baixa quantidade e atividade de PLA₂. Este resultado difere dos de Tan & Ponnurai (1991) que detectou alta atividade de PLA₂ em *BbsV*. No entanto, o veneno utilizado no estudo citado acima foi adquirido do Miami *Serpentarium Laboratories*, uma companhia comercial que extrai o veneno de serpentes mantidas em cativeiro, sem descrição das subespécies envolvidas ou do local de origem das serpentes capturadas.

Outro resultado que contrapõe o encontrado neste estudo é o de Carregari e colaboradores (2013) que caracteriza uma PLA₂ denominada Bbil-TX em *BbsV*. Estes autores demonstraram que a Bbil-TX é capaz de causar uma resposta inflamatória caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de neutrófilos e edema. A análise do perfil de purificação de Bbil-TX sugere que esta proteína é um dos componentes mais abundantes de *BbsV* do Brasil.

As divergências entre os resultados encontrados podem ser explicadas pelas desconformidades de metodologia e o uso de venenos de origem diferente da deste estudo. Pesquisas anteriores mostraram que espécies de *Bothrops* que possuem uma ampla faixa de distribuição geográfica podem apresentar variação intraespecífica de veneno, com diferentes proporções de toxinas, principalmente

a PLA₂ (CALVETE et al., 2011; NÚÑEZ et al., 2009). O conteúdo de PLA₂ pode variar tanto em quantidade quanto em identidade entre venenos de serpentes que habitam áreas diferentes. Esta variação ainda não é totalmente compreendida, mas é de grande relevância, uma vez que pode causar sintomas de envenenamento diferentes de acordo não somente com a serpente envolvida, mas também com a localização do acidente (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991).

Os resultados proteômicos indicaram a presença de LAAO em *BbsV*. A Tabela 3 mostra que a atividade desta enzima em *BbsV* é menor do que as dos venenos de *B. moojeni* (usado como controle positivo) e *B. atrox*. Entretanto, é maior do que as dos venenos de *B. jararaca*, *B. pictus* e *B. barnetti*. Estas flavoenzimas já foram citadas como importantes componentes de venenos hemorrágicos (DU; CLEMETSON, 2002) e estão relacionadas a toxicidade dos venenos por causar a produção de uma espécie reativa de oxigênio (H₂O₂), podendo ocasionar estresse oxidativo e até mesmo levar a apoptose (COSTA et al., 2014). Diante dessas informações, a citotoxicidade do veneno foi testada em células da linhagem VERO e de fato *BbsV* diminuiu a viabilidade celular de maneira concentração dependente (Fig. 17). No entanto, quando o a EC₅₀ de *BbsV* foi calculada e comparada com as de outros venenos de *Bothrops*, foi visto que *BbsV* é menos tóxico para as células VERO do que os outros venenos.

Setubal e colaboradores (2013) testaram a citotoxicidade do veneno de *B. bilineata* brasileira frente a neutrófilos humanos. Apesar do veneno de *B. bilineata* induzir a produção de H₂O₂, capaz de danificar células, os neutrófilos continuaram viáveis e foram estimulados a produzir citocinas pró-inflamatórias. Além disso, Porto e colaboradores (2007) mostraram que, na presença de EDTA, a migração de neutrófilos em resposta ao veneno era menor, indicando que o recrutamento dessas células sanguíneas é dependente da presença de metaloproteinases.

Alta atividade de SVMP e SVSP foi detectada em *BbsV* (Tabela 3). No entanto, os dados proteômicos sugerem uma menor quantidade de SVSP que de SVMP. A atividade de SVMP foi comparável a de *B. atrox* e *B. barnetti*, mas

a atividade de SVSP foi muito maior que a dos outros venenos de *Bothrops*. Este fato pode estar relacionado à maior quantidade de isoformas de SVMP no banco de dados em comparação com as de SVSP, favorecendo a contagem espectral de SVMP. A atividade fibrinogenolítica também confirmou a presença de enzimas proteolíticas em *BbsV*. O veneno foi capaz de clivar as subunidades $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio, enquanto a subunidade γ continuou intacta (Fig 9A). Além disso a atividade fibrinogenolítica foi parcialmente inibida pelo EDTA, um agente quelante, confirmando a atividade específica de SVMP (Fig 9B).

SVMPs e SVSPs são enzimas proteolíticas encontradas nos venenos botrópicos que possuem uma diversa especificidade por substratos (BERNARDONI et al., 2014; SWENSON; MARKLAND, 2005). Estas enzimas possuem diferentes atividades, como alterações na cascata de coagulação sanguínea, células endoteliais, função plaquetária e no sistema fibrinolítico e de kallikreína-kinina. Além disso, SVMPs podem causar ruptura da membrana basal, levando a hemorragia, o efeito local e sistêmico mais marcante do envenenamento botrópico (SAJEVIC; LEONARDI; KRIŽAJ, 2011).

Os testes realizados *in vivo* com *BbsV*, mostraram que doses maiores que 1,25 $\mu\text{g}/\text{animal}$ causaram hemorragia, quando inoculados subcutaneamente no dorso de camundongos ($P < 0,001$) (Fig. 13 e 14) confirmando a presença de enzimas proteolíticas no veneno. A MHD foi definida como 2,5 $\mu\text{g}/\text{animal}$. Quando *BbsV* foi pré incubado com P-BAV ou B-BAV, o halo hemorrágico induzido foi significativamente reduzido (Fig. 16). Para ambos os soros, 4 μL foram suficientes para reduzir mais de 80% do halo hemorrágico causado por *BbsV*, o que significa que esta atividade foi neutralizada *in vivo* por P-BAV e B-BAV.

Rodrigues, Peña & Yarlequé (2012a) mostraram que *BbsV* é capaz de coagular o plasma humano, uma atividade relacionada a presença de enzimas pró-coagulantes. Estudos adicionais isolaram componentes individuais do veneno responsáveis por esta ação. Uma enzima coagulante de fibrinogênio (thrombin-like) já foi purificada a partir de *BbsV*. Esta molécula de 40-45 kDa

foi denominada bilineatobin e mostrou atividade pró coagulante no fibrinogênio bovino e no plasma humano (CACHUANA et al., 2012). Além disso, uma SVMP de 23 kDa, com atividade de ativação de protrombina, chamado bilinearin, foi isolada de *BbsV* (RODRÍGUEZ; PEÑA; YARLEQUÉ, 2012b).

Um relatório clínico sobre um acidente na floresta amazônica brasileira envolvendo *Bothriopsis bilineata bilineata*, uma subespécie próxima, mostrou que o paciente sofria de incoagulabilidade do sangue e lesão renal aguda, indicando a presença de enzimas proteolíticas que podem afetar a hemostasia e que são descritas nos venenos deste grupo de serpentes (TORREZ et al., 2014).

A capacidade de *BbsV* em induzir edema *in vivo* após a injeção de 2,5 ou 5 µg do veneno na pata de camundongos foi avaliada. Os resultados obtidos mostram que foi possível detectar a presença de edema a partir de 15 min da administração do veneno. Além disso, foi observada a presença de hemorragia local. A porcentagem de edema induzida após 1440 min (24 h) da injeção de 2,5 µg de *BbsV* não foi mais estatisticamente significativa, sugerindo que o edema foi transiente. Estes dados corroboram os obtidos por Torrez e colaboradores (2014) que reportou a presença de edema extensivo associado com eritema, equimose, aumento na temperatura local e bolhas ao descrever um acidente com *B. bilineata bilineata*.

Ao injetarem veneno de *B. bilineata* (nenhuma subespécie informada) em camundongos, Setubal e colaboradores (2013) perceberam a presença de inflamação, o que contribuiu para que houvesse o aparecimento de edema, recrutamento de neutrófilos e hemorragia local. Tanto P-BAV quanto B-BAV foram capazes de reduzir significativamente o edema causado por *BbsV* a partir de 15 e 30 min da administração do veneno respectivamente (Fig. 12).

A letalidade de *BbsV* também foi investigada em camundongos e a LD₅₀ definida como 92,74 (± 0,15) µg/20 g de animal (Tabela 2). Um trabalho anterior determinou a LD₅₀ dos venenos de diferentes serpentes peruanas como *B. atrox* (LD₅₀= 108 µg/20 g de animal), *B. barnetti* (LD₅₀= 104 µg/20 g

de animal) e *B. pictus* ($LD_{50}= 132 \mu\text{g}/20 \text{ g}$ de animal) e também das serpentes *B. leucurus* ($LD_{50}= 94 \mu\text{g}/20 \text{ g}$ de animal) e *B. jararaca* ($LD_{50}=45 \mu\text{g}/20 \text{ g}$ de animal) do Brasil (ESTEVAO-COSTA et al., 2016). *BbsV* apresentou maior letalidade quando comparado com os outros venenos botrópicos peruanos descritos no estudo acima e teve uma letalidade similar ao de *B. leucurus* (Brasil).

A reatividade imunológica de P-BAV e B-BAV frente a *BbsV* foi analisada por ELISA e Western Blot. A reatividade cruzada de B-BAV e P-BAV frente a *BbsV* foi observada e ambos os antivenenos apresentaram títulos similares.

Para os ensaios de Western Blot (Fig. 21 e 22), as intensidades de reatividade de P-BAV e B-BAV foram comparáveis e ambos os antivenenos reconheceram a maioria das bandas e spots. Nenhuma reatividade foi detectada quando a membrana foi testada com o soro pré-imune (PI). A reatividade cruzada corrobora o fato de que ambos os antivenenos foram capazes de neutralizar o edema e a hemorragia *in vivo*. Como *BbsV* não faz parte da mistura antigênica usada na produção de B-BAV ou P-BAV, os resultados deste estudo sugerem a presença de proteínas antigenicamente relacionadas nos componentes dos venenos de *Bothrops* spp, endossando a ideia de que os antígenos de veneno compartilham epítomos similares e indicando o possível uso de ambos os antivenenos em caso de acidentes envolvendo essa serpente.

6 Conclusão

Esse trabalho mostra o perfil proteômico de *BbsV* e as atividades de alguns de seus componentes, que foram analisados com o objetivo de determinar seu papel na patofisiologia do envenenamento. A variação da composição de venenos de serpentes tem implicações no tratamento do envenenamento, produção de soros, estudos taxonômicos e na investigação e concepção de medicamentos. Os experimentos realizados nesse estudo contribuem para uma compreensão mais aprofundada da complexidade de *BbsV* e das toxinas que o compõem.

7 Perspectivas

As perspectivas deste trabalho são:

- Avaliar a capacidade neutralizante dos antivenenos botrópicos peruano e brasileiro frente a atividade letal do veneno.
- Purificar e caracterizar bioquimicamente, imunologicamente e molecularmente os componentes tóxicos do veneno de *BbsV*;
- Análise transcriptômica de *BbsV*;
- Produzir e purificar proteínas recombinantes de interesse biotecnológico (PLA₂, LAAO e SVMP).

8 Referências

ALAPE-GIRÓN, A. et al. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. **Journal of proteome research**, [s. l.], n. February 2014, p. 3556–3571, 2008.

ALI, S. A. et al. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 384, n. 2, p. 216–226, 2000.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes Por Animais Peçonhentos: Serpentes Peçonhentas. [s. l.], p. 480–489, 2003.

BARAMOVA, E. N. et al. Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human α_2 -macroglobulin. **Biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 1069–1074, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00456a032>>

BARLOW, A. et al. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 276, n. 1666, p. 2443–2449, 2009. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2009.0048>>

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. **Families and Clans of Serine Peptidases**. [s.l: s.n.], v. 318

BAZAA, A. et al. MVL-PLA2, a Snake Venom Phospholipase A2, Inhibits Angiogenesis through an Increase in Microtubule Dynamics and Disorganization of Focal Adhesions. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e10124, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010124>>

BERNARDE, P. S. et al. *Bothriopsis bilineata bilineata* (Wied, 1821) (Serpentes: Viperidae): New records in the states of Amazonas, Mato Grosso and Rondônia, northern Brazil. **Check List**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 343–347, 2011.

BERNARDES, C. P. et al. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 574–584, 2008.

BERNARDES, C. P. et al. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **Journal of**

Proteomics, [s. l.], v. 80, p. 250–267, 2013. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.021>>

BERNARDONI, J. L. et al. Functional variability of snake venom metalloproteinases: Adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 10, 2014.

BERNHEIMER, A. W. et al. Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of collett's snake, *Pseudechis colletti*. **Toxicon**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 547–554, 1987.

BIEBER, A. L. **Metal and nonprotein constituents in snake venom**. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg, 1979.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994.

BON, C. Pharmacokinetics of Venom Toxins and Their Modification by Antivenom Therapy. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 129–138, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1081/TXR-120019025>>

BORDON, K. **Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus***. 2012. [s. l.], 2012.

BOULENGER, G. A. III.—Descriptions of new Reptiles from the Andes of South America, preserved in the British Museum. **Annals and Magazine of Natural History**, [s. l.], v. 7, n. 37, p. 19–25, 1911. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1080/00222931108692903>>

BRASIL. **Normas de produção e controle de qualidade dos soros antiofídicos**, Diário oficial da República Federativa do Brasil, 1996. Disponível em:
<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1996/anexo/anexo_prt0174_11_11_1996.pdf>

BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos**. [s.l: s.n.].

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, [s. l.], v. 82, n. 9–10, p. 851–859, 2000.

BREGGE-SILVA, C. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel l-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 1263–1276, 2012. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.008>>

BRINKHOUS, K. M. et al. Botrocetin (venom coagglutinin): reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 80, n. 5, p. 1463–1466, 1983. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.80.5.1463>>

BROWN, R. L. et al. Pseudechetoxin Binds to the Pore Turret of Cyclic Nucleotide-gated Ion Channels. **The Journal of General Physiology**, [s. l.], v. 122, n. 6, p. 749–760, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2229597/>>

BRUNORO, G. V. F. et al. Proteomic profiling of nipple aspirate fluid (NAF): Exploring the complementarity of different peptide fractionation strategies. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 117, p. 86–94, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.011>>

CACHUANA, G. et al. Purification and characteristics of bilineatobin, a clotting enzyme isolated from the venom of the arboreal peruvian snake *Bothrops bilineatus* (Loro Machaco). **Revista de la Sociedad Química del Perú**, [s. l.], v. 78, p. 43–52, 2012.

CALVETE, J. J. et al. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 510–527, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003>>

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles from the Western Hemisphere**. 2 vol. ed. Ithaca: Cornell University Press, 2004.

CARDOSO, J. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. [s.l: s.n.]. v. 45

CARRASCO, P. et al. Nomenclatural instability in the venomous snakes of the *Bothrops* complex: Implications in toxinology and public health. **Toxicon**, [s. l.], v. 119, p. 122–128, 2016.

CARREGARI, V. C. et al. Biochemical, Pharmacological, and Structural Characterization of New Basic P L A (2) Bbil-TX from *Bothriopsis bilineata* Snake Venom. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, p. 612649, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591176/>>

CARVALHO, P. C. et al. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. **Nature protocols**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 102–117, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5722229/>>

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 1279–1303, 1991.

CHISARI, A. et al. A Phospholipase A₂-Related Snake Venom (from *Crotalus durissus terrificus*) Stimulates Neuroendocrine and Immune Functions: Determination of Different Sites of Action¹. **Endocrinology**, [s. l.], v. 139, n. 2, p. 617–625, 1998. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article->

lookup/doi/10.1210/endo.139.2.5736>

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**2, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 75–93, 2015.

COSTA, T. R. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: An overview on their antitumor effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–7, 2014.

DAMICO, D. C. S. et al. Cytotoxicity of Lachesis muta muta snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 678–692, 2007.

DEBONO, J. et al. Canopy venom: Proteomic comparison among new world arboreal pit-viper venoms. **Toxins**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1–19, 2016.

DIXON, J. R.; SOINI, P. **The reptiles of the upper Amazon basin, Iquitos region, Peru**. 2 ed. ed. [s.l.] : Milwaukee Public Museum, 1986.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002.

ESTEVAO-COSTA, M. I. et al. Neutralization of toxicological activities of medically-relevant Bothrops snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. **Toxicon**, [s. l.], v. 122, p. 67–77, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.010>>

FEIO, R.; CARAMASCHI, U. Contribuição ao conhecimento da herpetofauna do nordeste do estado de Minas Gerais , Brasil. **Phyllomedusa**, [s. l.], v. 1, n. December, p. 105–111, 2002.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

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**, [s. l.], v. 62, p. 75–82, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.009>>

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 969–985, 2005.

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. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 200–

209, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.015>>

FUNDACENTRO. Prevenção de acidentes com animais peçonhentos. [s. l.], p. 1–49, 2001.

GEUEKE, B.; HUMMEL, W. A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: Purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 31, n. 1–2, p. 77–87, 2002.

GIRISH, K. S. et al. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **Biochimie**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 193–202, 2004.

GUÉRCIO, R. A. P. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome science**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 11, 2006. Disponível em: <<http://www.proteomesci.com/content/4/1/11>>

GUERRA-DUARTE, C. et al. Partial in vitro analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. **Toxicon**, [s. l.], 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115300660>>. Acesso em: 21 out. 2015.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by polyvalent antivenom produced at the Instituto Clodomiro Picado is used to treat envenomations induced by snakes from the genera *Bothrops*, *Crotales* and *Lachesis*. **Toxicon**, [s. l.], 1985.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 1223–1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, p. 17063, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>>

HARRISON, R. A. et al. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: Cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts. **Gene**, [s. l.], v. 392, n. 1–2, p. 22–33, 2007.

HOGUE. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). **Memórias do Instituto Butantan**, [s. l.], v. 32, p. 114–115, 1966.

HORTA, C. C. R. et al. Molecular, Immunological, and Biological Characterization of *Tityus serrulatus* Venom Hyaluronidase: New Insights into Its Role in Envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, USA, v. 8, n. 2, p. e2693, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3923731/>>

HUANG, T.-F.; HSU, C.-C.; KUO, Y.-J. Anti-thrombotic agents derived from snake venom proteins. **Thrombosis Journal**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 18, 2016.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12959-016-0113-1>>
INS. **Instituto Nacional de Salud**. 2013.

KAMIGUTI, A. S. et al. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from Bothrops jararaca venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 1097–1105, 1991.

KARLSSON, E. **Chemistry of protein toxins in snake venoms**. volume 52 ed. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg, 1979.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: A therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 7–12, 2006.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 397, n. Pt 3, p. 377–387, 2006.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1533313/>>

KINI, R. M.; FOX, J. W. Milestones and future prospects in snake venom research. **Toxicon**, [s. l.], v. 62, p. 1–2, 2013. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.002>>

KOCHVA, E.; GANS, C. Salivary Glands of Snakes. **Clinical Toxicology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 363–387, 1970. Disponível em:
<<https://doi.org/10.3109/15563657008990115>>

KOMORI, Y.; NIKAI, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. **J Toxicol - Toxin Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 261–277, 1998.

KUDO, K.; TU, A. T. Characterization of hyaluronidase isolated from Agkistrodon contortrix contortrix (Southern Copperhead) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 386, n. 2, p. 154–162, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, p. 680, 1970. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>>

LAING, G. et al. Preclinical testing of three south American antivenoms against the venoms of five medically-important Peruvian snake venoms. **Toxicon**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 103–106, 2004.

LANDUCCI, E. C. T. et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 343, n. 2–3, p. 257–263, 1998.

LOJA, D. et al. **Ofidismo por Bothrops atrox: Estudio clínico-epidemiológico**. [s.l: s.n.]. v. 38

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 1791–1799, 2005.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01358.x>>

MAMILLAPALLI, R. et al. Enhancement and inhibition of snake venom phosphodiesterase activity by lysophospholipids. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 436, n. 2, p. 256–258, 1998.

MARKLAND, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thrombosis and haemostasis**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 668–74, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531060>>

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 1171–1181, 2005.

MARTINS, M. et al. Diversity and evolution of microhabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (Bothrops). **Journal of Zoology, London**, [s. l.], v. 254, p. 529–538, 2001.

MESH. **No Title**. 2007. Disponível em: <<https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=Metalloproteases>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

MOREIRA, V. **Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A2 , isoladas do veneno de Bothrops asper e Crotalus durissus terrificus, e dos respectivos venenos, sobre a expressão de ciclooxygenases e produção de prostaglandinas**. 2007. [s. l.], 2007.

MUNIZ, E. G. et al. Neutralizing potency of horse antiotheropic Brazilian antivenom against Bothrops snake venoms from the Amazonian rain forest. **Toxicon**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 1859–1863, 2000.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from Bothrops leucurus venom. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1810, n. 7, p. 683–694, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.04.003>>

NICOLAU, C. A. et al. An in-depth snake venom proteopectidome characterization: Benchmarking Bothrops jararaca. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 151, p. 214–231, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.029>>

NÚÑEZ, V. et al. Snake venomomics and antivenomics of Bothrops atrox venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 57–78, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.013>>

PETERS, W. **Über die craniologischen Verschiedenheiten der Grubenottern (Trigonocephali) und über eine neue Art der Gattung Bothriechis**. Berlin: Zoologische Museum gesandten Schlangen, 1862.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: An updated inventory - On behalf of the Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. **Thrombosis and haemostasis**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 675–683, 1998.

PORTO, B. N. et al. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 270–277, 2007.

PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. **Toxicon**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 629–637, 1988.

RODRÍGUEZ, E.; PEÑA, G. A. S.; YARLEQUÉ, A. **Isolation and biochemical characterization of bilinearin, a prothrombin-activator factor from *Bothrops bilineatus* (loro machaco) Peruvian snake venom**. [s.l: s.n.]. v. 78

RODRÍGUEZ, E.; PEÑA, G. A. S.; YARLEQUÉ, A. **Aislamiento y caracterización bioquímica de la bilinearina, un factor activador de protrombina del veneno de la serpiente peruana *Bothrops bilineatus* (loro machaco)**. [s.l: s.n.]. v. 78

ROJAS, E. et al. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: Preclinical assessment. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 85–95, 2005.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, [s. l.], v. 57, n. 5, p. 627–645, 2011.

SAKURAI, Y. et al. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1649, n. 1, p. 51–57, 2003.

SAMPAIO, S. **Walker 256 Tumor Growth Suppression by Crotoxin Involves Formyl Peptide Receptors and Lipoxin A4**. [s.l: s.n.]. v. 2016

SCHNEIDER, F. S. et al. Use of a Synthetic Biosensor for Neutralizing Activity-Biased Selection of Monoclonal Antibodies against Atroxlysin-I, an Hemorrhagic Metalloproteinase from *Bothrops atrox* Snake Venom. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e2826, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002826>>

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases : sequence homology vs . substrate specificity , a paradox to be solved. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 45, p. 1115–1132, 2005.

SETUBAL, S. da S. et al. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. **Toxicon**, [s. l.], v. 76, p. 143–149, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.019>>

SILVA, M. R. e; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, [s. l.], v. 156, n. 2, p. 261–273, 1949. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1949.156.2.261>>

SINAN- **Sistema de informação de agravos de notificação**. 2016. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

SMALLIGAN, R. et al. Crotaline snake bite in the Ecuadorian Amazon: randomised double blind comparative trial of three South American polyspecific antivenoms. **BMJ : British Medical Journal**, [s. l.], v. 329, n. 7475, p. 1129, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC527684/>>

SOARES, A. M. et al. A rapid procedure for the isolation of the LYS-49 myotoxin II from bothrops moojeni (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 503–514, 1998.

SOUSA, L. F. et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 9, 2013.

SOUZA, L. L. De et al. Determination of toxic activities in Bothrops spp. snake venoms using animal-free approaches: Correlation between in vitro versus In vivo assays. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 147, n. 2, p. 458–465, 2015.

SPIX, J. B. Von; WAGLER, J. G. **Serpentum Brasiliensium species novae = ou, Histoire naturelle des espèces nouvelles de serpents : recueillies et observées pendant le voyage dans l'intérieur du Brésil dans les années 1817, 1818, 1819, 1820 /** . Monachii [Munich] : Typis F.S. Hübschmanni, 1824. French and Latin. Disponível em: <<https://www.biodiversitylibrary.org/item/23062>>

STÁBELI, R. G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from Bothrops alternatus snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 2881–2886, 2004.

STAHEL, E. Epidemiological aspects of snake bites on a Liberian rubber plantation. **Acta tropica**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 367–374, 1980.

SUHR, S.-M.; KIM, D.-S. Comparison of the Apoptotic Pathways Induced by L-Amino Acid Oxidase and Hydrogen Peroxide. **The Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 305–309, 1999.

SULKOWSKI, E. A Specific and Nonspecific Alkaline Venom of Bothrops atrox and the Purified Monophosphatase Their Occurrence in the in Venom. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], n. 7, 1963.

SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes**. 2014. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 1021–1039, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105000681>>

TAN, N. H.; SAIFUDDIN, M. N.; YONG, W. Y. The edema inducing activity of phospholipase A2 enzymes. **Biochemistry international**, Department of Biochemistry, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia., v. 23, n. 1, p. 175–181, 1991. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/1863271>>

TAN, N.; PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). ... **Biochemistry and Physiology Part B: Comparative ...**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 361–365, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030504919190387S>>

TASHIMA, A. K. et al. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 473–485, 2008.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 290, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618223/>>

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 947–962, 2003.

TEMPONE, A. G. et al. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 280, n. 3, p. 620–624, 2001.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Antivenoms: A list of hyperimmune sera currently available for the treatment of envenoming by bites and stings. **Toxicon**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 1419–1470, 1991.

TORREZ, P. P. Q. et al. Forest pit viper (*Bothriopsis bilineata bilineata*) bite in the Brazilian Amazon with acute kidney injury and persistent thrombocytopenia. **Toxicon**, [s. l.], v. 85, n. September 2013, p. 27–30, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.001>>

TURCI, L. C. B. et al. Uso do hábitat, atividade e comportamento de *Bothriopsis bilineatus* e de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) na floresta do Rio Moa, Acre, Brasil. **Biota Neotropica**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 197–206, 2009.

WALDEZ, F.; VOGT, R. C. **Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus,**

Amazonas, Brasil , scielo , 2009.

WARRELL, D. A. et al. Randomized Comparative Trial of three Monospecific Antivenoms for Bites by the Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) in Southern Thailand: Clinical and Laboratory Correlations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1235–1247, 1986.

Disponível em:

<<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1986.35.1235>>

WARRELL, D. A. WHO/SEARO Guidelines for the clinical management of snake bites in the Southeast Asian region. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, [s. l.], v. 30 Suppl 1, p. 1–85, 1999.

WATANABE, L. et al. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Science**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 2273–2281, 2009.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1110/ps.03102403>>

WHITE, J. **Snake venoms and coagulopathy**. [s.l: s.n.]. v. 45

WHO. Recommendations for the Adoption of Additional Diseases As Neglected Tropical Diseases. [s. l.], p. 1–5, 2016. a. Disponível em:

<http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/Adoption_additional_NTDs.pdf>
>

WHO. **WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins**, 2016. b.

WHO. **Snakebite envenoming**. 2017. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

WIED-NEUWIED. Reise nach Brasilien in den Jahren 1815 bis 1817. **Heinrich Ludwig Bronner**, [s. l.], v. 2, 1821.

WIED-NEUWIED. **Beiträge zur Naturgeschichte von Brasilien**. Weimar : Im Verlage des Landes-Industrie-Comptoirs, 1825. v. Bd. 1 Sabin | 47012 --- Zimmer, J.T. Ayer Lib., | p. 422 --- Nissen, C. Zoologische Buchillustration, | 4398 (note).

Disponível em: <<https://www.biodiversitylibrary.org/item/129628>>

WILLIAMS, D. et al. **Venomous bites and stings in Papua New Guinea: a guide to treatment for health workers and doctors**. [s.l: s.n.].

WÜSTER, W. et al. **Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis**. [s.l: s.n.].

YANG, C. A. et al. Identification of antibacterial mechanism of L-amino acid oxidase derived from *Trichoderma harzianum* ETS 323. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 278, n. 18, p. 3381–3394, 2011.

YOU, W. K. et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 571, n. 1–3, p. 67–73, 2004.

ZELANIS, A. et al. Proteomic identification of gender molecular markers in *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 139, p. 26–37, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.030>>

ZHANG, Y. J. et al. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 309, n. 3, p. 598–604, 2003.

ZHAO, H.; KINNUNEN, P. K. J. Modulation of the Activity of Secretory Phospholipase A(2) by Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 965–971, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC149322/>>

ZHOU, Q.; SMITH, J. B.; GROSSMAN, M. H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **The Biochemical journal**, [s. l.], v. 307 (Pt 2, p. 411–417, 1995.

9 Anexo

Os resultados obtidos neste estudo foram compilados em um manuscrito denominado “Proteomic profile, biological activities and antigenic analysis of the venom from *Bothriopsis bilineata smaragdina* (“loro machaco”), a pitviper snake from Peru”, o qual foi submetido a revista “Journal of Proteomics” e atualmente encontra-se em processo final de correção.

Journal of **PROTEOMICS**

[Contact us](#)
[Help](#)

ELSEVIER

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: olortegi@icb.ufmg.br
 Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#)

New Submissions

[Submit New Manuscript](#)
 Submissions Sent Back to Author (0)
 Incomplete Submissions (0)
 Submissions Waiting for Author's Approval (0)
 Submissions Being Processed (0)

Revisions

Submissions Needing Revision (0)
 Revisions Sent Back to Author (0)
[Incomplete Submissions Being Revised](#) (1)
 Revisions Waiting for Author's Approval (0)
 Revisions Being Processed (0)
 Declined Revisions (0)

Completed

Submissions with a Decision (0)

Author Main Menu

[See your Author stats on Mendeley](#)

**Proteomic profile, biological activities and antigenic analysis
of the venom from *Bothriopsis bilineata smaragdina* (“loro
machaco”), a pitviper snake from Peru**

Carolina Rego Rodrigues^{#a}, Frey Francisco Romero Vargas^{#a}, Clara Guerra-Duarte^b, Fernanda Costal-Oliveira^a, Stephanie Stransky Láuar^a, Letícia Lopes de Souza^a, Alexandre Augusto Assis Dutra^c, André Teixeira-Ferreira^d, Armando Yarlequé^e, César Bonilla^f, Eladio Flores Sanchez^b, Jonas Perales^d, Carlos Chávez-Olórtegui^{a*}

[#] These authors contributed equally to this work.

^a*Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* ^b*Centro de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, 30510-010, Belo Horizonte, MG, Brazil.* ^c*Faculdade de Medicina do Mucuri, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni, Minas Gerais, Brasil* ^d*Laboratório de Toxinologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, CEP: 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil.* ^e*Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru.* ^f*Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru.*

Running title: Proteomic profile, toxicity and antivenom neutralization of *Bothriopsis bilineata smaragdina* snake venom

***Address for correspondence**

Dr. Carlos Chávez-Olórtegui

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Brazil. CEP: 31270-901.

Telephone number: 55 31 3409 2625

Fax number: 55 31 3409 2613

Email: olortegi@icb.ufmg.br

Highlights

- SVMPs, C-type Lectins, SVSPs and LAAOs are *B. b. smaragdina* venom (*BbsV*) main components.
- *BbsV* presented low PLA₂ content and *in vitro* activity.
- *BbsV* is more lethal than other Peruvian bothropic venoms.
- Bothropic antivenoms from Peru and Brazil neutralized edema and hemorrhage caused by *BbsV* in mice.

Abstract

In order to determine *Bothriopsis bilineata smaragdina* venom (*BbsV*) composition, proteomic approaches were performed. The shotgun strategy was used to analyze trypsinized venom by nanoLC on line with LTQ Orbitrap XL. Results showed a total of 122 identified proteins, grouped into 22 different subgroups, which include snake venom metalloproteinases (SVMPs, 45.93%), snake C-type lectins (Snaclecs, 22.37%), snake venom serine proteinases (SVSPs, 11.11%), L-amino acid oxidases (LAAOs, 6.62%), Phospholipases B (2.69%), 5' nucleotidases (2.37%), Phospholipases A₂ (PLA₂, 2.22%), Phosphodiesterase (2.2%), Cystein-rich venom proteins (1.6%) and other proteins. *In vitro* enzymatic activities (SVMP, SVSP, LAAO, Hyal and PLA₂) of *BbsV* were also analyzed. *BbsV* showed high SVSP activity but low PLA₂ activity, when compared to other *Bothrops* venoms. *In vivo*, *BbsV* induced hemorrhage and edema in mice and showed intraperitoneal median lethal dose (LD₅₀) of 92.74 (\pm 0.15) μ g/20 g of mice. Furthermore, *BbsV* reduced cell viability when incubated with VERO cells. Peruvian and Brazilian bothropic antivenoms recognize *BbsV* proteins, as detected by ELISA and Western Blotting. Both antivenoms were able to neutralize *in vivo* edema and hemorrhage.

Key words: *Bothriopsis bilineata smaragdina*, Venom proteomics, Peruvian snake, Venom characterization.

Significance

In Peru, snakebite is a public health problem, especially in the rain forest, as a result of progressive colonization of this geographical area. This country is the second in Latin America, after Brazil, to exhibit the largest variety of venomous snakes. *B. atrox* and *B. b. smaragdina* snakes are sympatric species in Peruvian Amazon region and are responsible for approximately 95% of the envenomings reported in this region. *B. b. smaragdina* may cause a smaller share (3 to 38%) of those accidents, due to its arboreal habits, that make human encounters with these snakes less likely to happen. Despite *B. b. smaragdina* recognized medical importance, its venom composition and biological activities have been poorly studied. Furthermore, *BbsV* is not a component of the antigenic pool used to produce the corresponding Peruvian bothropic antivenom (P-BAV). Our results not only provide new insights on *BbsV* composition and biological activity, but also demonstrate that both P-BAV and B-BAV polyvalent antivenoms have a considerable recognition of proteins from *BbsV* and, more importantly, neutralized hemorrhage and edema, the main local effects of bothropic envenomation.

1.- Introduction

Snakebites are an important health problem in Peru, especially at the east of the Andes, in the tropical rainforest (<800 m altitude). These regions are known for having the most diversified ophidian population of the country [1]. More than 2,000 accidents are reported per year within this region and the *Bothrops* complex (comprising *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Rhinocerothis* genera) causes the majority of envenomings, corresponding to 77% of all accidents [2]. *Bothrops atrox*, popularly known as "jergón", and *Bothriopsis bilineata smaragdina*, known as "loro machaco", are the species most commonly involved in these accidents [3].

B. b. smaragdina is found in the Amazon Basin, comprising Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana, Brazil, Ecuador, Peru and Bolivia. In Peru, *B. b. smaragdina* have been reported in the Departments of Junin, Loreto, Madre de Dios, San Martín and Ucayali, at elevations above 600m [1]. *B. b. smaragdina* is a medium length pitviper (70 cm), with a moderately slender body and a short prehensile tail. This pitviper is mainly found on branches and shrubs. Its characteristic pale green body color with dark spots on the dorsum serves as camouflage and its immobility makes it difficult to be detected [4].

Peruvian bothropic antivenom (P-BAV), used to treat envenomings involving snakes from the *Bothrops* complex, is a whole IgG preparation produced from horse plasma previously immunized with an antigenic pool, consisting of *B. atrox* (50%), *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti*, *Bothrops brazili* and *Bothrocophias hyoprora* (12.5% each) venoms [5]. Although *B. b. smaragdina* is a medically important species with respect to snakebites, its venom is not included in the antigenic pool used to produce the corresponding P-BAV.

As part of an ongoing effort between researchers from Brazil and Peru concerning toxicological studies of venomous animals such as snakes, scorpions and spiders from these countries, the first part of the present work reports the proteomic identification and relative abundance of *B. b. smaragdina* venom (*BbsV*) components, and the final part of this manuscript describes some biological activities and immunological characterization of *BbsV*. Understanding the toxic components diversity present in snake venoms from medically important species commonly found in the equatorial region of South America, such as *B. b. smaragdina*, as well as the immunological cross-recognition and neutralization by antivenoms, could lead us to the production of common antivenoms for Latin America.

2.- Material and Methods

2.1.- Animals, venoms and antivenoms

Female Swiss mice (18–22 g) were maintained at the animal facilities of Instituto de Ciências Biológicas of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil. All animals received water and food *ad libitum*, under controlled environmental conditions. Experimental protocols were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG 234/2017). *B. b. smaragdina* venom was provided by the Instituto Nacional de Salud (INS) from Lima, Peru. Venom from *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta*, used as controls, were provided by Fundação Ezequiel Dias (FUNED), located in Belo Horizonte, Brazil. Venom samples are pools from several individuals and were manually extracted, lyophilized and kept at -20 °C until use. Peruvian bothropic antivenom (P-BAV) was provided by INS. Brazilian bothropic antivenom (B-BAV) produced from horse plasma previously immunized with venoms

from *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi* and *B. moojeni* (12.5% each), was provided by FUNED. Antivenoms were kept at 4 °C until use.

2.2.- Shotgun analysis

2.2.1 Venom tryptic digestion

Trypsin digestion was done based on [6], with some modifications. Lyophilized crude *BbsV* (100 µg) was initially solubilized in 20 µL of 0.4 M ammonium bicarbonate and 8 M urea. Then, sample was reduced with 5 µL of 100 mM DTT and incubated at 56 °C for 3 h. After cooling to room temperature, sample was alkylated with 5 µL of 400 mM iodoacetamide for 15 min in the dark and 130 µL of deionized water were added to dilute urea to a final concentration of 1M. Finally, *BbsV* was subjected to digestion with 10 µL of trypsin (1 µg/µL in 50 mM acetic acid) at enzyme/substrate ratio of 1:50 (w/w) at 37 °C for 16 h. Reaction was stopped with 20 µL of 10% formic acid (v/v) in deionized water to a final concentration of 1% (v/v). Tryptic peptides mixture was made in triplicate and desalted using ZipTip C18/P10 (Millipore) prior to NanoLC-MS run.

2.2.2. Orbitrap MS

Tryptic peptides were fractionated on Easy nLC II (Thermo Scientific) nanoflow HPLC system connected to a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (MS) (Thermo, Bremen, Germany) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptides were initially loaded onto a trap column 2.0 cm long (100 µm internal diameter) packed in-house with C18 resin (5 µm, 100 Å pore, Magic C18 AQ, Bruker-Michrom, Auburn, CA) and fractionated on a RP-HPLC column 30 cm long (75 µm internal diameter). The gradient conditions were as follows: 2 to 40% of 0.1% trifluoroacetic

acid (v/v) in *acetonitrile solution* for 162 min and up to 80% of this solution for 4 min. This concentration was maintained for 2 more min before the column was re-equilibrated. The eluted peptides were directly introduced to an LTQ Orbitrap XL MS for analysis. Precursor scans were performed in Orbitrap mass detector at resolution of 60,000 in a mass range from 300 m/z to 1700 m/z, while MS/MS scans were acquired in a linear trap analyzer. With exclusion of singly charged ions, up to ten of the most intense precursor ions were subjected to product ion scans using collision-induced dissociation (CID) with normalized collision energy of 35.0. Moreover, MS/MS scans were only triggered for precursor ions having a minimum signal threshold of 10,000 counts. Precursors selected for MS/MS scans were dynamically excluded for 30 secs from a repeated product ion scan within a ± 10 ppm mass error.

2.2.3. Database search

The database used in LTQ Orbitrap XL analysis was kindly provided by [7]. All entries displaying 100% sequence identity that were a subset of a longer sequence, were merged into a single entry, using the Generate Search DB option from the PatternLab for Proteomics public domain software (version 4.0.0.27) [8]. This step removed 14,860 redundant entries, leading to a final database containing 92,955 entries. Database searches of the tandem mass spectra acquired on LTQ Orbitrap XL mass spectrometer were performed using Peaks Studio 8.0. The search parameters for monoisotopic peptide masses allowed two missed enzymatic cleavage. Carbamidomethylation of the cysteine residues was defined as fixed modification and the oxidation (M), carbamylation (K, N-term), Pyro-glu from Q (N-term) as variable modifications. A fragment ion mass tolerance of 0.60 Da and a parent ion tolerance of 20 ppm were used. To choose from variables modifications, the PEAKS PTM

algorithm WARE tool was used, with the same parameters described above and modifications with AScore 1000 were selected for the searches. False discovery rates (FDR) were estimated through the PEAKS decoy fusion approach. A peptide-spectrum match FDR of 0.1% and protein identifications with at least 1 unique peptide were the criteria used to establish FDR values at peptide and protein levels $\leq 1\%$.

2.2.4. Protein Quantification

Quantification was performed by spectral counting, in order to estimate the relative proportion of venom proteins. To avoid an overestimation of protein complexity in the venom, as tryptic peptides may be associated with several proteins within the same family, only proteins that had at least one unique tryptic peptide associated were selected. All entries presenting the same set of peptides were removed, avoiding the redundancy in the spectral count, which could overestimate the amount of protein, especially those presenting a large isoform number in the database. After this selection, proteins were classified by family and their relative proportions were estimated.

2.3. - *Enzymatic activities*

2.3.1. Hyaluronidase activity (Hyal)

For quantifying Hyal activity, serial dilution from 80 to 0.625 μg of *BbsV* was incubated in acetate buffer (0.2 M sodium acetate-acetic acid and 0.15 M NaCl) with 12.5 μg of hyaluronic acid (HA) in 96-well microtiter plates [9]. A control curve was made with 5 points of known HA concentrations, corresponding to 0%, 25%, 50%, 75% and 100% of Hyal activity. The plate was incubated at 37 °C for 15 min. After

incubation, 200 μL of a solution containing 2.5% (w/v) cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) dissolved in 2% (w/v) NaOH were added to each well and produced turbidity was measured at 405 nm in microplate reader Biorad Model 680. All assays were performed in duplicates. Results from four independent experiments were plotted as means in a concentration-response curve and venom concentration needed for 50% of Hyal activity was determined.

2.3.2. Phospholipase A₂ activity (PLA₂)

To analyze PLA₂ activity, EnzChek® PLA₂ Assay Kit (Life Technologies) was used. The experiment was made following EnzCheck's protocol, using 2 μg of *BbsV*. A solution of PLA₂ 10 U/mL in 1X PLA₂ reaction buffer was used as positive control and the same buffer without PLA₂ was considered as negative control. All assays were performed in duplicates. Means of the results from two independent experiments were calculated and plotted as percentage of activity, relative to the positive control.

2.3.3. L-amino acid oxidase (LAAO) activity

LAAO activity assay was performed according to [10], with modifications. For LAAO activity quantification, 2 μg of either *BbsV* or *B. moojeni* venom (used as positive control) were incubated with a solution containing L-leucine as substrate, 2 mM OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) and peroxidase (5 U/mL) in 100 mM Tris- HCl buffer (pH 8.5), in 96 wells microtiter plates, at 37 °C. After 1 h of incubation, the reaction was stopped by adding 50 μL of 2M H₂SO₄. Activity was measured by the absorbance intensity at 490 nm, in microplate reader (Biorad Model 680). Three independent assays performed in duplicates were made and the specific activity was expressed as $\Delta A_{492\text{nm}}/\text{min}$ related to protein concentration (mg).

2.3.4. Proteolytic activity

2.3.4.1. Metalloproteinase and Serine Proteinase Activities

To measure metalloproteinase activity, a FRET peptide (Abz- LVEALYQ-EDDnp) containing the specific cleavage site for these enzymes, previously produced by our group [11], was used. Twenty microliters of the FRET peptide diluted in 60 μL of 100 nM Tris-HCl/50 nM NaCl buffer were incubated with 2 μg of *BbsV* or *L. muta* venom (used as positive control). After 30 min of incubation, the plate was read in fluorometer (Synergy, BioTek) at 340 nm for excitation and 440 nm for emission. Results representing means of three independent experiments were plotted as relative fluorescence units.

In order to measure serine proteinase activity, the venom was pre-incubated with 0.2 μM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA -Labsinth) for 1 hour and then activity was assayed as described above, using a FRET peptide as substrate for serine proteinases (Abz-FLPRSFRQ-EDDnp). All assays were performed in duplicates. Means of three independent experiments were plotted as relative fluorescence units.

2.4.4.2. Fibrinogenolytic activity

To determine fibrinogenolytic activity, *BbsV* (1.5, 3, 6 and 12 μg) was diluted in phosphate buffered saline (PBS). Fifty microliters of bovine fibrinogen (2.5 mg/mL in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0) were added to the samples. After incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes, an aliquot of 50 μL was withdrawn, mixed with an equal volume of denaturing solution (10 M urea, 4% β -mercaptoethanol, 4% SDS) and kept at room

temperature for 18h. After this time, 15 μL of the final solution was run in SDS-PAGE (10%, at reducing conditions). Gels were stained with Coomassie Blue R250 solution diluted in 50% ethanol (v/v) and 10% phosphoric acid. To analyze the contribution of metalloproteinases to this activity, the same procedure was performed using venom pre-incubated with 50 μL of 2 mM EDTA for 1 h at 37 °C, to inactivate SVMPPs by chelating their conjugated ion.

2.4.- In vivo activities

2.4.1. Edematogenic activity

BbsV ability to induce edema was analyzed in mice. Fifty microliters of sterile saline solution containing venom (2.5 or 5 $\mu\text{g}/\text{paw}$) were injected in the sub plantar region of the right hind paw. The left hind paw received an equal volume of sterile saline alone as a control. The thickness of both hind paws was measured with a caliper rule 0.25, 0.5, 1, 3, 6 and 24 h after venom administration, according to [12]. Edema was expressed as the percentage increase of the treated (right) paw thickness relative to the control (left) paw, at each time point. In order to test edema neutralization, *BbsV* was pre-incubated with either Peruvian bothropic antivenom (P-BAV) or Brazilian bothropic antivenom (B-BAV) for 30 min at 37 °C in a proportion of 1 μg of venom to 10 μL of antivenom. The left hind paw received an equal volume of P-BAV or B-BAV as control.

2.4.2. Hemorrhagic activity

Hemorrhagic activity was determined as described by [13]. Increasing *BbsV* amounts (0.625, 1.25, 1.5, 5 and 10 μg) in 50 μL of saline solution were injected subcutaneously (s.c.) into mice dorsal skin (Swiss, 18–20 g). Two hours after injection,

animals were euthanized. Dorsal skin was removed, stretched, and inspected to locate hemorrhagic spots. Hemorrhagic area was measured using the image analysis software ImageJ. The minimum hemorrhagic dose (MHD), defined as the venom dose that induces a lesion of 10 millimeters (mm) in diameter, was quantified. Neutralization studies were performed by s.c. injection of 20 µg of venom pre-incubated with 2 or 4 µL of either P-BAV or B-BAV for 30 minutes at 37 °C. The percentage of hemorrhagic neutralization was calculated based on the reduction of the lesion induced by 20 µg of venom (considered as 100% of hemorrhagic activity).

2.4.3. Lethal activity

To determine the median lethal dose (LD₅₀), different doses of *BbsV* (48, 60, 75, 93.75, 117.18 and 146.48 µg) were injected intraperitoneally (i.p.) into 5 groups of 4 mice (Swiss, 18–20 g) and the number of deaths for each group was observed over a period of 48 hours. The LD₅₀, defined as the amount of venom that causes the death of 50% of the animals, was determined using the PROBIT method [14].

2.5- Platelet aggregation

Platelet aggregation in human citrated platelet rich plasma (PRP) was measured in an AggRamTM System (Helena Laboratories, USA) at 37°C according to [15]. Inhibition of collagen induced-platelet aggregation was monitored by adding 1, 2.5 or 5 µg of *BbsV* pre-treated with 5 mM EDTA for 5 min, at room temperature, 3 min prior to the addition of collagen (10 µg/ml). The inhibition of platelet aggregation was normalized to the maximum aggregation in the absence of venom. For comparative

purposes, the venom of *B. jararaca* was also tested under the same conditions. Experiments were conducted with PRP from different drug-free donors.

2.6.- Cytotoxicity

VERO cell line (derived from normal African green monkey kidney epithelial cells) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Scientific-HyClone), 0.2% gentamicin (Gibco by Life Technologies) and kept in a controlled atmosphere (10% CO₂ incubator at 37 °C). Venom cytotoxicity was evaluated by Alamar Blue assay which was conducted as described by [16] with modifications. Cells (1x10⁴) were plated in 96-wells microtiter plates and incubated for 24 h at 37 °C and 10% CO₂. A dilution curve of *BbsV* was made from 80 µg/mL to 1.25 µg/mL, added to the cells and incubated in the same conditions described above. After 24 h of incubation, Alamar Blue was diluted in DMEM to a final concentration of 10% v/v and 100 µL of this solution were added to each well. The plate was incubated for 3 h and values were measured at 540 nm for excitation and 590 nm for emission in fluorometer Synergy 2 (Bio-tek). GraphPad Prism 5 software was used to calculate the amount of venom able to reduce cell viability in 50% (CD₅₀) using results of two independent experiments, performed in duplicates.

2.7. – Immunoassays

2.7.1. – ELISA

For ELISA assays, microtiter plates were coated with 100 µL of a solution containing 1 µg/well of *BbsV* in carbonate buffer, pH 9.8 and incubated overnight at 4°C. After washing, the plate was blocked with 100 µL/well of a solution

containing 3% of skimmed milk in PBS and incubated at 37 °C for 1 h. The plate was washed and either P-BAV, B-BAV or pre-immune horse serum (PI) were diluted from 1/500 to 1/128,000 in 0.01% of milk-PBS, in a final volume of 100 µL. The plate was incubated at 37 °C for 1 h, washed, and the secondary antibody (anti-horse peroxidase, diluted to 1/6000 in incubation buffer), was added in a final volume of 100 µL. After 1 h incubation at 37 °C, the reaction was detected using SigmaFast OPD tablets, according to manufacturer's instructions. The plate was incubated in the dark for 20 min and the reaction was stopped by the addition of 20 µL of 2M H₂SO₄. Absorbance was measured in microplate reader (Biorad Model 680) at 490 nm.

2.7.2.- SDS-PAGE (1-DE and 2-DE) and Western blot

BbsV (20 µg) was diluted in sample buffer under non-reducing conditions and electrophoresis (1-DE) was performed as described in [17]. Protein bands were visualized by silver staining or transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting [18].

For two-dimensional electrophoresis (2-DE), 40 µg of *BbsV* were diluted in 125 µL of a buffer containing 0.5% of IPG buffer pH 4-7, 50 mM DTT, 1% of protease inhibitor and rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 2% triton X-100, IPG buffer, 0,002% bromophenol blue). Sample was applied to a 7 cm IPG gel strip with immobilized pH linear gradient from 4 to 7 (GE Healthcare). After 18h incubation, isoelectric focusing (IEF) was carried out on Ettan TM IPGphor TM 3 (GE Healthcare Life), as described by the manufacturer. The strips were isofocalized at 20 °C using a 5-step electrophoresis program (100 V for 1 h, 200 V for 1 h, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, 3500 V for 3:30 h, 3500 V for 30 min and 500 V for 30 min). Prior to the second dimension, strips were placed in equilibration buffer and proteins contained

in the strip were reduced and alkalinized by the following solutions: 0.04 M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS; 30% glycerol (equilibration buffer) containing 4 mg/mL DTT followed by a solution of 40 mg/mL of iodoacetamide in equilibration buffer. Second dimension was made on 12% polyacrylamide gel at 200V. Proteins were visualized by silver staining or transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting.

For western blot, gels were wet-transferred to nitrocellulose membranes overnight. The membrane was blocked with PBS-Tween 0.3% for 1h. After washing three times for 5 min with PBS-Tween 0.05%, the membrane was incubated with either PI, P-BAV or B-BAV, diluted 1/5000 for 1 h. The membrane was washed (PBS-Tween 0.05%) three times and immunoreactive proteins were detected using anti-horse IgG conjugated to peroxidase for 1 h at 37 °C. After additional washes, blots were developed using DAB/chloronaphthol substrate, according to manufacturer's instructions.

2.7.- Statistical analysis

Quantitative data were expressed as means \pm standard deviation. Statistical analysis was determined by GraphPad Prism 6 software, performing one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test for cell viability, hemorrhagic activity and neutralization data. For edema activity and neutralization and for platelet aggregation results, two-way ANOVA with Bonferroni's post-test was applied. The statistical significance was set as *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

3.- Results and discussion

3.1. Shotgun Analysis

The shotgun proteomics analysis was performed in order to obtain a broad view of *BbsV* composition and to perform a relative quantification of its main constituents by peptide spectral count. Three replicates per sample were performed and peptide data analysis led to the identification of 122 proteins entries (Table ID in supplementary data). Only proteins with at least 1 unique tryptic peptide and <1% FDR were considered for analysis.

Based on the shotgun analysis, proteins were grouped into families and the relative concentration of the *BbsV* constituents was estimated per spectral counts associated with at least one unique peptide (Fig. 1). *BbsV* composition is similar to other bothropic venoms, however, protein relative quantification revealed that protein family ratio of this venom is considerably different from what was previously reported for *B. jararaca* venom [7]. Fig. 1 shows that snake venom metalloproteinases are the most abundant protein family (45.93%) followed by C-type lectins (22.37%), snake venom serine proteinases (11.11%), L-amino acid oxidases (6.62%), phospholipases B (2.69%), 5' nucleotidases (2.37%), phospholipases A₂ (2.22%), phosphodiesterases (2.2%), and cystein-rich venom proteins (1.97%). The remaining *BbsV* proteins were classified as "others" (7.5%) and the contribution of each of these proteins was specified in Fig. 1B.

As disintegrins and disintegrins-like domains are released in the venom after processing of P II and P III SVMP respectively [19], we reported those proteins within the metalloproteinase family instead of a separated family. Such approach has been

done before [20] as it is impossible to affirm that a tryptic peptide pointed out as disintegrin is, in fact, derived from SVMP proteolytic processing.

3.2. Toxic activities of *BbsV*

Table 1 shows comparative data between *BbsV* enzymatic activities and results from *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus* obtained from [9]. Data show that *BbsV* has the lowest Hyal activity when compared with *B. jararaca*, *B. pictus* and *B. barnetti* venoms, but within the range found for other bothropic venoms, such as *B. atrox*. This observation corroborates the minor traces of Hyal revealed in the *BbsV* by proteomic analysis. Hyals are enzymes present in most animal venoms, being responsible for facilitating toxins diffusion from the bite site to circulation [21]. The presence of Hyal activity, together with other pro-inflammatory toxins may be responsible for causing local edema [22] and was recently correlated with the lethal activity of snakes from genera *Bothrops* [23].

Table 1. *Bothrops spp.* comparative activities. Activities of *BbsV* (bold) were compared with other *Bothrops* venom activities. Data were obtained as described in Material and Methods and were represented as means of independent experiments. Hyal (hyaluronidase); PLA₂ (phospholipase A₂); LAAO (L- amino acid oxidase); SVMP (snake venom metalloproteinase); SVSP (snake venom serine proteinase); CD₅₀ (median cytotoxic dose).

Venom	Hyal ($\mu\text{g}/50\%\text{act}$)	PLA₂ (%activity)	LAAO (U/mg/min)	SVMP (RFU)	SVSP (RFU)	Cytotox (CD ₅₀)
<i>B. bilineata</i>	58.7	7.47	4.74	5263.5	16859.33	29.55
<i>B. jararaca</i> ^a	48.39	54.19	3.48	7739.88	4350.17	18.78
<i>B. atrox</i> ^a	61.03	87.93	10.31	5698.75	2571.5	12.12
<i>B. barnetti</i> ^a	45.04	11.02	1.39	5391.92	578.17	16.01
<i>B. pictus</i> ^a	45.01	80.03	3.22	2797.42	5501.67	19.6

^a: Data from [9].

Low levels of PLA₂ activity were detected in the enzymatic test performed, corroborating the initial proteomic findings that revealed minor presence of PLA₂ in *BbsV*. This was a striking difference from other described venom proteomes from genera *Bothrops* [24–29].

In accordance to our findings, a recent work [30] also did not detect PLA₂ by shotgun mass spectrometry of *BbsV*, but they later detected the presence of this enzyme by finding bands between 12 and 15 kDa in SDS-PAGE and moderate PLA₂ activity by enzymatic tests. These results are also in accordance with studies using bothropic venoms from Brazilian amazonic forest, that found only moderate levels of PLA₂ activity in *BbsV* [31].

Despite the above described data, the low PLA₂ protein content and activity found in our analysis disagree with studies from other groups. A previous work detected high levels of PLA₂ activity in *BbsV* in a comparative study of bothropic venoms [32]. The venom used in this particular study was purchased from Miami Serpentarium Laboratories, a commercial company that extracts venom from snakes maintained in captivity, without description of the subspecies used or the locality where snakes were captured. Also, a Brazilian group purified an Asp49 PLA₂ of 14243.8 Da, named Bbil-TX, from the venom of Brazilian specimens of *B. b. smaragdina* [33,34]. Analysis of Bbil-TX purification profiles published suggests that this protein is one of the most abundant components of Brazilian *BbsV*.

The apparent differences among our results and those described above can be explained by several hypotheses. In addition of using different methodologies for venom screening and enzymatic tests, which can account for the distinct levels of PLA₂ detected in *BbsV*, each group worked with venoms from snakes of different origins (Peru, Brazil, French Guyana, etc.). It has been described that bothropic species presenting wide geographic distribution range may show significant intraspecific venom variation, with different proportions of venom components, notably PLA₂ [35,36]. PLA₂ content may vary widely both in quantity and identity among venoms from populations of the same species inhabiting different areas. This phenomenon has not been completely understood, but it is of great relevance since this variability may result in different envenoming symptoms, according not only with the snake species involved in the accident but also with the location where the accident happened.

Our proteomic results confirmed that LAAOs (EC 1.4.3.2), are a group of toxins found in considerable amounts in *BbsV*. LAAOs are flavoenzymes catalyzing stereo-specific oxidative deamination of L-amino acids, which generates the

corresponding α -keto acid, H_2O_2 and ammonia. It was reported that LAAOs are major components in particularly hemorrhagic venoms [37]. LAAOs can be considered multifunctional enzymes due H_2O_2 production, which mediates several cellular processes [38]. Within snake venoms, LAAOs are involved in deleterious actions such as edema, hemorrhage, hemolysis, myotoxicity and cytotoxicity [39–43]. When compared to other pitviper venoms [9], LAAO activity of *BbsV* is lower than *B. moojeni* (used as positive control) and *B. atrox* but greater than *B. jararaca*, *B. pictus* and *B. barnetti* venoms (Table 1). LAAO activity levels from *Bothrops spp.* snake venoms have been reported to correlate with venom cytotoxicity [9,23,44]. Indeed, when tested on VERO cells, *BbsV* seemed to impair cell viability in a concentration dependent manner (Fig. 2). However, when the median cytotoxic dose (CD_{50}) of *BbsV*, determined in VERO cells, was compared with those found in closely related venoms, *BbsV* seems less toxic to this cell lineage [9]. A previous work [45] has tested the cytotoxicity of *B. bilineata* venom of Brazilian origin towards human neutrophils. Although *B. bilineata* venom induced the production of H_2O_2 , capable of harming cells, neutrophils remained viable and were stimulated to produce pro-inflammatory cytokines.

Enzymatic tests also revealed the presence of elevated levels of SVMP and SVSP in *BbsV* (Table 1). Although proteomic data suggest a lower abundance of SVSP than those observed for SVMP in *BbsV*, the SVMP activity was comparable to *B. atrox* and *B. barnetti* levels but SVSP levels were considerably higher than the ones reported for other bothropic venoms [9]. This fact may be related to the greater presence of SVMP isoforms in the database compared to the SVSP, favoring SVMP spectra counting. Fibrinogenolytic tests also indicated the presence of proteolytic enzymes on *BbsV*, capable of cleaving fibrinogen $A\alpha$ and $B\beta$ chain, while γ chain

remained intact (Fig. 3). Increasing amounts of *BbsV* resulted in higher fibrinogenolytic activity (Fig. 3A). In addition, fibrinogenolytic activity was partially inhibited by incubation with EDTA, a chelating agent, confirming the specific activity of SVMP (Fig. 3B). SVMPs and SVSPs are proteolytic enzymes widely distributed within bothropic venoms, which have quite diverse substrate specificity [46,47]. These enzymes have pharmacological action versatility, which include alterations in the blood coagulation cascade, endothelial cells, platelet function and in the fibrinolytic and kallikrein-kinin system. Moreover, SVMPs can cause disruption of basal membrane leading to hemorrhage, the most remarkable local and systemic effects of bothropic envenoming [48]. In the present work, *in vivo* tests showed that *BbsV*, in doses higher than 1.25 µg/animal, caused hemorrhage when inoculated under mice dorsal skin ($p < 0.001$) (Fig. 4A), confirming the presence of proteolytic hemorrhagic enzymes in the venom. The minimum hemorrhagic dose (MHD) was defined as 2.5 µg/animal. When *BbsV* was pre-incubated with Peruvian bothropic antivenom (P-BAV) or Brazilian bothropic antivenom (B-BAV), the hemorrhagic halo diameter was significantly reduced (Fig. 4B). For both antivenoms, 4 µL were sufficient to reduce more than 80% of hemorrhagic halo caused by *BbsV*, meaning that this activity was neutralized *in vivo* by P-BAV and B-BAV.

A previous study showed that *BbsV* was able to coagulate human plasma, an activity related to the presence of pro-coagulant enzymes [49]. Further studies isolated individual venom components responsible for this described action. A fibrinogen coagulant (thrombin-like) enzyme has already been purified from *BbsV*. This molecule of 40-45 kDa was called bilineatobin and showed procoagulant activity on bovine fibrinogen and human plasma [50]. Also, a SVMP of 23 kDa, with prothrombin activation activity, named bilinearin, was isolated from *BbsV* [51].

Our study concurs with the high proteolytic activity on thrombin, plasmin, kallikrein, and cathepsin C reported for Brazilian *B. bilineata* venom [52]. A clinical report of a human accident in the Brazilian Amazon forest involving *Bothriopsis bilineata bilineata*, a close related sub-species, indicated blood incoagulability and acute renal injury, which is compatible with the presence of a high content of proteolytic enzymes that affect hemostasis described in the venoms of this group of pitvipers [53].

Platelets also play a key role in hemostasis and thrombosis. Inhibition of platelet aggregation intensifies bleeding through leaky vessels, thus exacerbating hemorrhage. It is well documented that the SVMPs and other bothropic venom components have inhibitory effects on platelet aggregation induced by several agonists [54–59]. In all tested concentrations, *BbsV* significantly inhibited collagen-induced platelet aggregation in PRP ($p < 0.05$) (Fig. 5). *BbsV* (5 μg), pre-treated with EDTA to inactivate SVMPs, also inhibited collagen induced aggregation even without proteolytic activity ($p < 0.01$). This suggests that sequences like RGD, XECD or other variants found in SVMPs, as well as snake C-type lectins (Snaclecs), may be involved in inhibition of platelet aggregation, perhaps through interaction with platelet receptors involved in aggregation induced by collagen, ADP and Snaclecs. Further investigation, together with purified venom components, will be performed to examine this mechanism and may help to clarify the structure-function relationship of these molecules. Furthermore, no significant effect on platelet function was detected using *B. jararaca* venom (Fig. 5).

The *BbsV* capacity of inducing edema *in vivo* was assessed. When 2.5 or 5 μg of *BbsV* was injected in mice hind paw, it was possible to detect edema from 15 min onwards (Fig. 6A). In addition, local hemorrhage was observed. For 2.5 μg , the

percentage of edema induced after 1440 min (24h) was no longer statistically significant, suggesting that the edema was transient. Extensive edema, associated with erythema, ecchymosis, increased local temperature and blister, was previously reported [53] when describing a *B. b. bilineata* accident. Inflammation was also reported upon *B. bilineata* (no subspecies informed) venom inoculation in mice, producing edema, neutrophil recruitment and local hemorrhage [45]. P-BAV and B-BAV significantly reduced the edema caused by *BbsV*, from 15 min onwards and 30 min onwards, respectively (Fig. 6B).

BbsV lethality was investigated on mice and its LD_{50} was determined as 92.74 (± 0.15) $\mu\text{g}/20$ g of mice (Table 2). A previous work determined the LD_{50} for different Peruvian snake venoms, as *B. atrox* ($LD_{50}=108$ $\mu\text{g}/20$ g mouse), *B. barnetti* ($LD_{50}=104$ $\mu\text{g}/20$ g mouse) and *B. pictus* ($LD_{50}=132$ $\mu\text{g}/20$ g mouse), and for *B. leucurus* ($LD_{50}=94$ $\mu\text{g}/20$ g mouse) and *B. jararaca* ($LD_{50}=45$ $\mu\text{g}/20$ g mouse) from Brazil [60]. *BbsV* seems to be more lethal than all Peruvian bothropic venoms reported and presented a similar lethality when compared to *B. leucurus* (Brazil), being *B. jararaca* (Brazil) venom the most lethal.

Table 2. *BbsV* intraperitoneal lethal activity. Dose dependent lethal activity of *BbsV* on mice.

<i>BbsV</i> ($\mu\text{g}/20\text{g mouse}$)	Dead/Challenged	Death (%)
48	0/4	0
60	1/4	25
75	1/4	25
93.75	2/4	50
117.18	3/4	75
146.48	4/4	100

3.4. Antigenic analysis of *BbsV*

Immunological reactivity of P-BAV or B-BAV against *BbsV* was assessed by both ELISA and western blotting. For ELISA, reactivity at different sera dilutions can be seen in Fig. 7. Cross-reactivity of B-BAV and P-BAV with *BbsV* was observed and both antivenoms presented comparable titers. Fig. 8 shows the results of 1-DE, 2-DE and western blotting of both gels with either P-BAV or B-BAV. In both western blotting assays (Figs. 8B and 8C), P-BAV and B-BAV reactivity intensities were comparable and both antivenoms recognized the majority of the bands or spots. The spots observed in Fig. 8A were identified by molecular exclusion chromatography of *BbsV*, followed by SDS-PAGE, trypsin digestion of obtained bands and mass spectrometry identification of the resulting peptides (data not shown). No reactivity was detected when the membrane was probed with pre-immune (PI) serum (data not shown). This cross-reactivity corroborates the fact that both antivenoms were capable of neutralizing *in vivo* edema and hemorrhage. As *BbsV* is not part of the antigenic

mixture used to produce neither P-BAV nor B-BAV, our results suggest the presence of antigenically related proteins in *Bothrops* spp. venom components, supporting the notion that venom antigens share similar epitopes and preliminary endorsing the use of both antivenoms in case of accidents involving this snake.

4.- Concluding remarks

This work demonstrates the proteomic profile of the Peruvian snake *BbsV*. It describes a variety of bioactive compounds that were analyzed with the purpose of determining their role in envenoming pathophysiology, contributing to a better understanding of this venom. *BbsV* shows a predominance of proteases, SVMPs and SVSPs, which collectively represent more than 50% of total protein content, slightly below to the composition of other viperid venoms. *BbsV* has a low content of PLA₂ in its composition, evidencing a remarkable difference from other proteomes of the genera *Bothrops*. However, since label free quantification are prone to technical limitation, the relative quantification results presented here should be considered as a estimative of protein components contribution within the venom.

Experimentally, venom proteome correlates well with *in vitro* enzymatic and cytotoxic activities. *BbsV* induced edema and hemorrhage in mice, which were neutralized by both P-BAV and B-BAV. Although *BbsV* venom is not used in the antigenic pool to produce the corresponding P-BAV or B-BAV, the presence of cross-reactive antibodies in both commercial antivenoms supports the statement that *Bothrops* venom antigens share similar epitopes [60].

Acknowledgements

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq) (n° 17/2013, process: 490269/2013-3),

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil - CAPES (TOXINOLOGIA N° 23038000825/2011-63) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil (FAPEMIG).

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Ministerio de Salud del Perú, Norma técnica sobre prevención y tratamiento de accidentes por animales ponzoñosos, (2004).
- [2] Instituto Nacional de Salud. Perú, (2013).
- [3] D.G. Loja Oropeza, J. Castro Tapia, M. Vilca Vásquez, R. Necochea Villafuerte, Yngrid Ursula Avilés Gonzaga, Ofidismo por Bothrops atrox: estudio clínico-epidemiológico. *Diagnóstico Perú.*, 39 (2000) 261–265.
- [4] J.A. Campbell, W.W. Lamar, The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99 (2005) 476–477. doi:10.1016/j.trstmh.2004.12.002.
- [5] G. Laing, A. Yarleque, A. Marcelo, E. Rodriguez, D. Warrell, R. Theakston, Preclinical testing of three south American antivenoms against the venoms of five medically-important Peruvian snake venoms, *Toxicon.* 44 (2004) 103–106. doi:10.1016/j.toxicon.2004.03.020.
- [6] G.V.F. Brunoro, P.C. Carvalho, A.T. da S. Ferreira, J. Perales, R.H. Valente, C.V. de Moura Gallo, D. Pagnoncelli, A.G. da C. Neves-Ferreira, Proteomic profiling of nipple aspirate fluid (NAF): Exploring the complementarity of different peptide fractionation strategies, *J. Proteomics.* 117 (2015) 86–94. doi:10.1016/j.jprot.2015.01.011.
- [7] C.A. Nicolau, P.C. Carvalho, I.L.M.M. Junqueira-de-Azevedo, A. Teixeira-Ferreira, M. Junqueira, J. Perales, A.G.C. Neves-Ferreira, R.H. Valente, An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking Bothrops jararaca, *J. Proteomics.* 151 (2016) 214–231. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.029.
- [8] P.C. Carvalho, D.B. Lima, F. V Leprevost, M.D.M. Santos, J.S.G. Fischer, P.F. Aquino, J.J. Moresco, J.R. Yates, V.C. Barbosa, Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0, *Nat. Protoc.* 11 (2015) 102–117. doi:10.1038/nprot.2015.133.
- [9] C. Guerra-Duarte, J. Lopes-Peixoto, B.R. Fonseca-De-Souza, S. Stransky, D. Oliveira, F.S. Schneider, L. Lopes-De-Souza, C. Bonilla, W. Silva, B. Tintaya, A. Yarleque, C. Chávez-Olórtegui, Partial in vitro analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms, *Toxicon.* 108 (2015) 84–96. doi:10.1016/j.toxicon.2015.09.007.
- [10] C. Bregge-Silva, M.C. Nonato, S. de Albuquerque, P.L. Ho, I.L.M. Junqueira de Azevedo, M.R. Vasconcelos Diniz, B. Lomonte, A. Rucavado, C. Díaz, J.M. Gutiérrez, E.C. Arantes, Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel l-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom, *Toxicon.* 60 (2012) 1263–1276. doi:10.1016/j.toxicon.2012.08.008.
- [11] F.S. Schneider, D. Le Nguyen, K.L. Castro, S. Cobo, R.A. Machado de Avila, N. de A. Ferreira, E.F. Sanchez, C. Nguyen, C. Granier, P. Galéa, C. Chávez-Olortegui, F. Molina, Use of a Synthetic Biosensor for Neutralizing Activity-Biased Selection of Monoclonal Antibodies against Atroxlysin-I, an Hemorrhagic Metalloproteinase from *Bothrops atrox* Snake Venom, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) e2826. doi:10.1371/journal.pntd.0002826.
- [12] C.G. Van Arman, A.J. Begany, L.M. Miller, H.H. Pless, Some Details of the inflammations caused by yeast and Carrageenin (with appendix on kinetics of the reaction), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 150 (1965).
- [13] J.M. Gutiérrez, J.A. Gené, G. Rojas, L. Cerdas, Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom., *Toxicon.* 23 (1985) 887–93.

- [14] D.J. Finney, *Probit Analysis*, 3rd Editio, Cambridge University Press, Cambridge, 1971.
- [15] E.F. Sanchez, F.S. Schneider, A. Yarleque, M.H. Borges, M. Richardson, S.G. Figueiredo, K.S. Evangelista, J.A. Eble, The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets, *Arch. Biochem. Biophys.* 496 (2010) 9–20. doi:10.1016/j.abb.2010.01.010.
- [16] D.C.S. Damico, J.M. Nascimento, B. Lomonte, L.A. Ponce-Soto, P.P. Joazeiro, J.C. Novello, S. Marangoni, C.B. Collares-Buzato, Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells, *Toxicon.* 49 (2007) 678–692. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.014.
- [17] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685. doi:10.1038/227680a0.
- [18] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 4350–4.
- [19] R.M. Kini, H.J. Evans, 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.* 30 (1992) 265–293. doi:10.1016/0041-0101(92)90869-7.
- [20] I.D.L.M. Junqueira-de-Azevedo, P.L. Ho, A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs), *Gene.* 299 (2002) 279–291. doi:10.1016/S0378-1119(02)01080-6.
- [21] J.W. Fox, A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases, *Toxicon.* 62 (2013) 75–82. doi:10.1016/j.toxicon.2012.09.009.
- [22] K. Kemparaju, K.S. Girish, Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target, *Cell Biochem. Funct.* 24 (2006) 7–12. doi:10.1002/cbf.1261.
- [23] L. Lopes-de-Souza, S. Stransky, C. Guerra-Duarte, A. Flor-Sá, F.S. Schneider, E. Kalapothakis, C. Chávez-Olórtegui, Determination of Toxic Activities in *Bothrops* spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between In Vitro Versus In Vivo Assays, *Toxicol. Sci.* 147 (2015) 458–465. doi:10.1093/toxsci/kfv140.
- [24] C.P. Bernardes, D.L. Menaldo, E. Camacho, J.C. Rosa, T. Escalante, A. Rucavado, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, S. V Sampaio, Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase., *J. Proteomics.* 80 (2013) 250–67. doi:10.1016/j.jprot.2013.01.021.
- [25] R.A.P. Guércio, A.A. Shevchenko, A.A. Shevchenko, J.L. López-Lozano, J. Paba, M. V Sousa, C.A.O. Ricart, Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*., *Proteome Sci.* 4 (2006) 11. doi:10.1186/1477-5956-4-11.
- [26] A. Alape-Girón, L. Sanz, J. Escolano, M. Flores-Díaz, M. Madrigal, M. Sasa, J.J. Calvete, Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations., *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3556–71. doi:10.1021/pr800332p.
- [27] A.K. Tashima, L. Sanz, A.C.M. Camargo, S.M.T. Serrano, J.J. Calvete, Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers, *J. Proteomics.* 71 (2008) 473–485. doi:10.1016/j.jprot.2008.07.007.

- [28] C. Corrêa-Netto, I. de L.M. Junqueira-de-Azevedo, D.A. Silva, P.L. Ho, M. Leitão-de-Araújo, M.L.M. Alves, L. Sanz, D. Foguel, R.B. Zingali, J.J. Calvete, Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*., *J. Proteomics*. 74 (2011) 1795–809. doi:10.1016/j.jprot.2011.04.003.
- [29] M. Kohlhoff, M.H. Borges, A. Yarleque, C. Cabezas, M. Richardson, E.F. Sanchez, Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*, *J. Proteomics*. 75 (2012) 2181–2195. doi:10.1016/j.jprot.2012.01.020.
- [30] J. Debono, C. Cochran, S. Kuruppu, A. Nouwens, N.W. Rajapakse, M. Kawasaki, K. Wood, J. Dobson, K. Baumann, M. Jouiaei, T.N.W. Jackson, I. Koludarov, D. Low, S.A. Ali, A.I. Smith, A. Barnes, B.G. Fry, Canopy venom: Proteomic comparison among new world arboreal pit-viper venoms, *Toxins (Basel)*. 8 (2016) 1–19. doi:10.3390/toxins8070210.
- [31] E.G. Muniz, W.S. Maria, M.I. Estevão-Costa, P. Bührnheim, C. Chávez-Olórtegui, Neutralizing potency of horse antithropic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest., *Toxicon*. 38 (2000) 1859–63.
- [32] N.H. Tan, G. Ponnudurai, A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper)., *Comp. Biochem. Physiol. B*. 100 (1991) 361–5.
- [33] V. Corasolla Carregari, R. Stuaní Floriano, L. Rodrigues-Simioni, F. V. Winck, P.A. Baldasso, L.A. Ponce-Soto, S. Marangoni, Biochemical, pharmacological, and structural characterization of new basic PLA2 Bbil-TX from *bothriopsis bilineata* snake venom, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 1–12. doi:10.1155/2013/612649.
- [34] R.S. Floriano, V.C. Carregari, V.A. de Abreu, B. Kenzo-Kagawa, L.A. Ponce-Soto, M.A. da Cruz-Höfling, S. Hyslop, S. Marangoni, L. Rodrigues-Simioni, Pharmacological study of a new Asp49 phospholipase A2 (Bbil-TX) isolated from *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom in vertebrate neuromuscular preparations, *Toxicon*. 69 (2013) 191–199. doi:10.1016/j.toxicon.2013.03.006.
- [35] V. Núñez, P. Cid, L. Sanz, P. De La Torre, Y. Angulo, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, J.J. Calvete, Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism, *J. Proteomics*. 73 (2009) 57–78. doi:10.1016/j.jprot.2009.07.013.
- [36] J.J. Calvete, L. Sanz, A. Pérez, A. Borges, A.M. Vargas, B. Lomonte, Y. Angulo, J.M. Gutiérrez, H.M. Chalkidis, R.H.V. Mourão, M.F.D. Furtado, A.M. Moura-Da-Silva, Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management, *J. Proteomics*. 74 (2011) 510–527. doi:10.1016/j.jprot.2011.01.003.
- [37] X.-Y. Du, K.J. Clemetson, Snake venom l-amino acid oxidases, *Toxicon*. 40 (2002) 659–665. doi:10.1016/S0041-0101(02)00102-2.
- [38] L.F.M. Izidoro, J.C. Sobrinho, M.M. Mendes, T.R. Costa, A.N. Grabner, V.M. Rodrigues, S.L. da Silva, F.B. Zanchi, J.P. Zuliani, C.F.C. Fernandes, L.A. Calderon, R.G. Stábeli, A.M. Soares, Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 1–19. doi:10.1155/2014/196754.
- [39] R.G. Stábeli, S. Marcussi, G.B. Carlos, R.C.L.R.L.R. Pietro, H.S.H.S. Selistre-de-Araújo, J.R. Giglio, E.B. Oliveira, A.M. Soares, Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus*

- snake venom, *Bioorganic Med. Chem.* 12 (2004) 2881–2886.
doi:10.1016/j.bmc.2004.03.049.
- [40] R.G. Stábeli, C.D. Sant’Ana, P.H. Ribeiro, T.R. Costa, F.K. Ticli, M.G. Pires, A. Nomizo, S. Albuquerque, N.R. Malta-Neto, M. Marins, S. V. Sampaio, A.M. Soares, Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 41 (2007) 132–140.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006.
- [41] X.-L. Wei, J.-F. Wei, T. Li, L.-Y. Qiao, Y.-L. Liu, T. Huang, S.-H. He, Purification, characterization and potent lung lesion activity of an l-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom, *Toxicon.* 50 (2007) 1126–1139. doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.022.
- [42] J.-F. Wei, H.-W. Yang, X.-L. Wei, L.-Y. Qiao, W.-Y. Wang, S.-H. He, Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom., *Toxicon.* 54 (2009) 262–71.
doi:10.1016/j.toxicon.2009.04.017.
- [43] P. Ciscotto, R. a. Machado de Avila, E. a F. Coelho, J. Oliveira, C.G. Diniz, L.M. Farías, M.A.R. de Carvalho, W.S. Maria, E.F. Sanchez, a. Borges, C. Chávez-Olórtegui, Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom, *Toxicon.* 53 (2009) 330–341. doi:10.1016/j.toxicon.2008.12.004.
- [44] M.M. De Vieira Santos, C.D. Sant’Ana, J.R. Giglio, R.J. Da Silva, S. V. Sampaio, A.M. Soares, D. Fecchio, Antitumoural effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102 (2008) 533–542. doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00229.x.
- [45] S. da S. Setubal, A.S. Pontes, N.M. Nery, J.S.F. Bastos, O.B. Castro, W.L. Pires, K.D. Zaqueo, L. de A. Calderon, R.G. Stábeli, A.M. Soares, J.P. Zuliani, Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function, *Toxicon.* 76 (2013) 143–149. doi:10.1016/j.toxicon.2013.09.019.
- [46] J.L. Bernardoni, L.F. Sousa, L.S. Wermelinger, A.S. Lopes, B.C. Prezoto, S.M.T. Serrano, R.B. Zingali, A.M. Moura-da-Silva, Functional variability of snake venom metalloproteinases: Adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation, *PLoS One.* 9 (2014) e109651.
doi:10.1371/journal.pone.0109651.
- [47] S. Swenson, F.S. Markland, Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes, *Toxicon.* 45 (2005) 1021–1039. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.027.
- [48] T. Sajevic, A. Leonardi, I. Križaj, Haemostatically active proteins in snake venoms, *Toxicon.* 57 (2011) 627–645. doi:10.1016/j.toxicon.2011.01.006.
- [49] E. Rodríguez, G.A. Sandoval, A. Yarlequé, Isolation and biochemical characterization of bilinearin, a prothrombin-activator factor from *Bothrops bilineatus* (Loro Machaco) Peruvian snake venom, *Rev Soc Quím Perú.* 78 (2012).
- [50] G. Cahuana, D. Vivas, E. Rodríguez, A. Yarlequé, Purification and characteristics of bilineatobin, a clotting enzyme isolated from the venom of the arboreal peruvian snake *Bothrops bilineatus* (loro machaco), *Rev. La Soc. Química Del Perú.* 78 (2012) 43–52.
- [51] E. Rodríguez, G.A. Sandoval, A. Yarleque, Aislamiento y caracterización bioquímica de la bilinearina, un factor activador de protrombina del veneno de la serpiente peruana *Bothrops bilineatus* (Loro Machaco), *Rev. La Soc. Química Del Perú.* 78 (2012) 3–13.
- [52] B.N. Porto, C.A. Telli, T.P. Dutra, L.S. Alves, M.T. Bozza, C.A. Fin, F. V. Thiesen, M.F. Renner, Biochemical and biological characterization of the venoms

- of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae), *Toxicon*. 50 (2007) 270–277. doi:10.1016/j.toxicon.2007.03.020.
- [53] P.P.Q. Torrez, R. Said, M.M.M. Quiroga, M.R. Duarte, F.O.S. França, Forest pit viper (*Bothriopsis bilineata bilineata*) bite in the Brazilian Amazon with acute kidney injury and persistent thrombocytopenia, *Toxicon*. 85 (2014) 27–30. doi:10.1016/j.toxicon.2014.04.001.
- [54] S.M.T. Serrano, D. Wang, J.D. Shannon, A.F.M. Pinto, R.K. Polanowska-Grabowska, J.W. Fox, Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation, *FEBS J.* 274 (2007) 3611–3621. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05895.x.
- [55] B.B. De Sousa, C. Cristine, N. Mamede, M.S. Matias, D. Fernanda, M.R. De Queiroz, E. Henrique, V. Dias, A. Christine, A. Silva, N.O. Dantas, J.D.O. Costa, F. De Oliveira, A New Platelet-Aggregation-Inhibiting Factor Isolated from *Bothrops moojeni* Snake Venom, 2017 (2017) 9–11.
- [56] M.L. Santoro, T.S. Vaquero, A.F. Paes Leme, S.M.T. Serrano, NPP-BJ, a nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from *Bothrops jararaca* snake venom, inhibits platelet aggregation, *Toxicon*. 54 (2009) 499–512. doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.016.
- [57] E.F. Sanchez, M. Richardson, L.H. Gremski, S.S. Veiga, A. Yarleque, S. Niland, A.M. Lima, M.I. Estevao-Costa, J.A. Eble, Data for a direct fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti* (barnett,s pitviper) snake venom with anti-thrombotic effect, *Data Br.* 7 (2016) 1609–1613. doi:10.1016/j.dib.2016.04.054.
- [58] D.A. Higuchi, M.C. Almeida, C.C. Barros, E.F. Sanchez, P.R. Pesquero, E.A.S. Lang, M. Samaan, R.C. Araujo, J.B. Pesquero, J.L. Pesquero, Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth, *Toxicon*. 58 (2011) 123–129. doi:10.1016/j.toxicon.2011.05.013.
- [59] G.B. Naumann, L.F. Silva, L. Silva, G. Faria, M. Richardson, K. Evangelista, M. Kohlhoff, C.M.F. Gontijo, A. Navdaev, F.F. de Rezende, J.A. Eble, E.F. Sanchez, Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1810 (2011) 683–694. doi:10.1016/j.bbagen.2011.04.003.
- [60] M.I. Estevao-Costa, S.S. Gontijo, B.L. Correia, A. Yarleque, D. Vivas-Ruiz, E. Rodrigues, C. Chávez-Olortegui, L.S. Oliveira, E.F. Sanchez, C. Chávez-Olortegui, L.S. Oliveira, E.F. Sanchez, C. Chávez-Olortegui, L.S. Oliveira, E.F. Sanchez, Neutralization of toxicological activities of medically-relevant *Bothrops* snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil, *Toxicon*. 122 (2016) 67–77. doi:10.1016/j.toxicon.2016.09.010.

Figure legends

Fig. 1. Groups of distinct proteins identified in the proteomic approach and their relative contribution to *BbsV* proteic composition. Distribution of the protein subgroups indicating the average percentual contribution of each group. Proteins were identified with at least 1 unique peptide for a false-discovery rate $\leq 1\%$ at peptide and protein levels.

Fig. 2. Cell viability of VERO cells (1×10^4 /well). Cell viability after a 24h treatment with different concentrations of *BbsV* (1.25–80 $\mu\text{g/mL}$). Cell viability was assessed using the Alamar Blue[®] assay. Data are represented as means \pm SD. ***P < 0.001 vs. Control.

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of bovine fibrinogen after digestion by *BbsV*. Fibrinogen consists of three polypeptide chains α (66 kDa), β (54 kDa) and γ (48 kDa). **(A)** Digestion of fibrinogen after incubation with 12, 6, 3 and 1.5 μg of *BbsV*. Fibrinogen control (no *BbsV*) is shown in the left lane. **(B)** Digestion of fibrinogen assessed after incubation with EDTA. **Bb** 3 μg of *BbsV*. **BbE** 3 μg of *BbsV* incubated with EDTA. **Fg** Fibrinogen.

Fig. 4. Hemorrhagic activity and neutralization by bothropic antivenoms evaluated after subcutaneous injection in mice. **(A)** Hemorrhagic halo diameter induced 2 hours after subcutaneous injection of different amounts of *BbsV* (0.625, 1.25, 1.5, 5 and 10 μg) **(B)** Hemorrhagic activity neutralization was evaluated after subcutaneous injection of 20 μg *BbsV* pre-incubated with B-BAV

and P-BAV (2 or 4 μ L). Saline (PBS) was used as negative control. Data are represented as means \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control.

Fig. 5. Effect of *BbsV* on collagen-induced platelet aggregation. Human PRP was incubated for 3 min at 37°C with different concentrations (1, 2 or 5 μ g) of *BbsV* or *BbsV* pre-treated with EDTA before the addition of 10 μ g/ml collagen. *B. jararaca* venom was tested under the same conditions for comparative purposes. The aggregation induced by collagen was used as positive control and the spontaneous aggregation of 250 μ L of PRP (SPT) was used as negative control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

Fig. 6. Edema activity and neutralization by bothropic antivenoms. Edema activity was evaluated after injection of *BbsV* in mice right hind paw. The left paw received saline (PBS) and was used as control. **(A)** Increase of paw thickness caused by 2.5 and 5 μ g at different time intervals (0, 15, 30, 60, 180, 360 and 1440 min). **(B)** Edema neutralization. *BbsV* (5 μ g) was pre-incubated with either B-BAV or P-BAV at different time intervals (0, 15, 30, 60, 180, 360 and 1440 min). Data are represented as mean \pm SD of four mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control.

Fig. 7. B-BAV and P-BAV immune recognition of *BbsV*. ELISA of B-BAV and P-BAV tested against *BbsV* (5 μ g/mL). Data represented as absorbance at 492nm in relation to antivenom dilution (1:1000 – 1:128000).

Fig. 8. Cross-reactivity analysis of *BbsV* against B-PAV and P-BAV. **(A)** 1-DE and 2-DE of *BbsV*. For 1-DE, different concentration (10, 15, 20 and 25 μ g) of *BbsV* were loaded into 12% acrylamide gel. For 2-DE *BbsV* (40 μ g) was applied to a 4-7

IPG strips and electrophoresis was carried out on 12% acrylamide gels. PLB (Phospholipase B); LAAO (L-Amino Acid Oxidase); SVMP (Snake Venom Metalloproteinase); SVSP (Snake Venom Serine Proteinase); Snaclec (snake venom C-type lectin-like proteins). **(B)** Western Blotting analysis of 1-DE gels against B-BAV and P-BAV. Samples were analyzed in 12% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose membranes, probed against either B-BAV or P-BAV (1/5000) and incubated with anti-horse IgG conjugated to peroxidase. Reactivity was visualized using DAB/chloronaphthol as substrate. **(C)** Western Blotting analysis of 2-DE gels against B-BAV and P-BAV. The 2-DE gels were transferred to nitrocellulose membranes, probed against either B-BAV or P-BAV (1/5000) and incubated with anti-horse IgG conjugated to peroxidase. Reactivity was visualized using DAB/chloronaphthol as substrate.

Graphical abstract

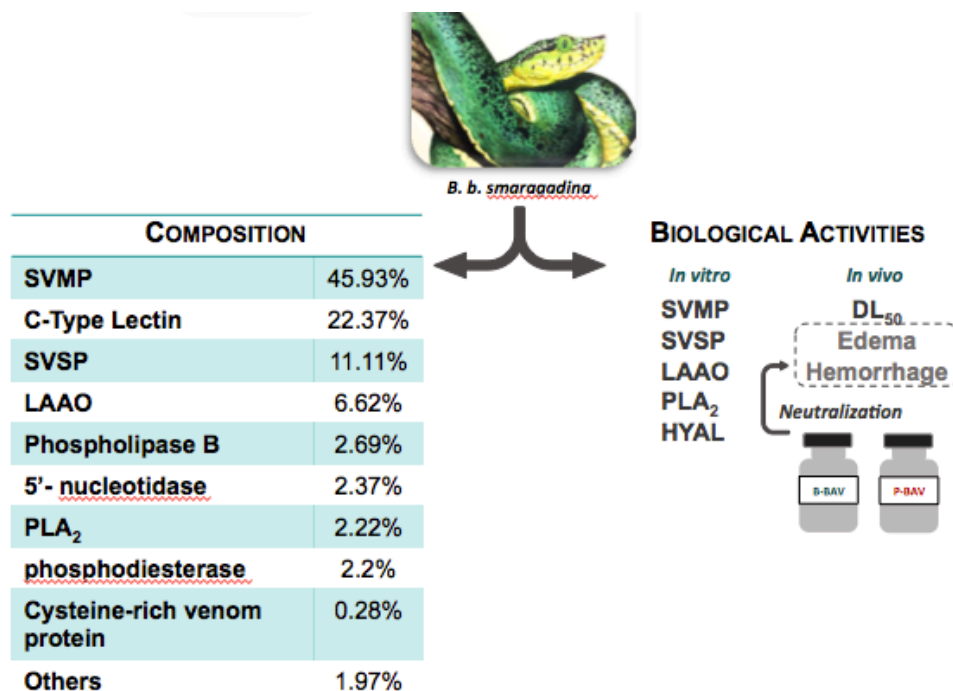


Fig.

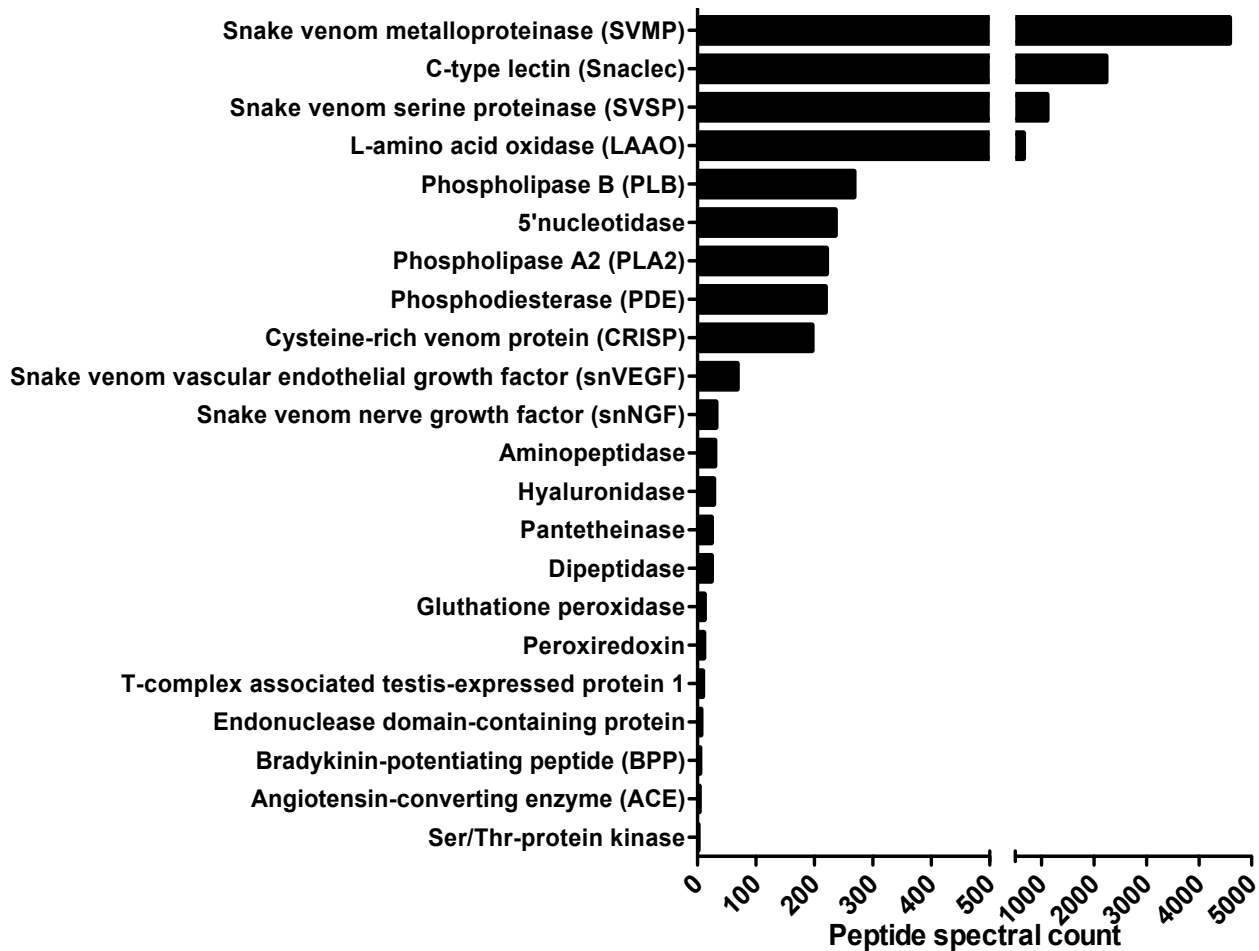


Fig. 2

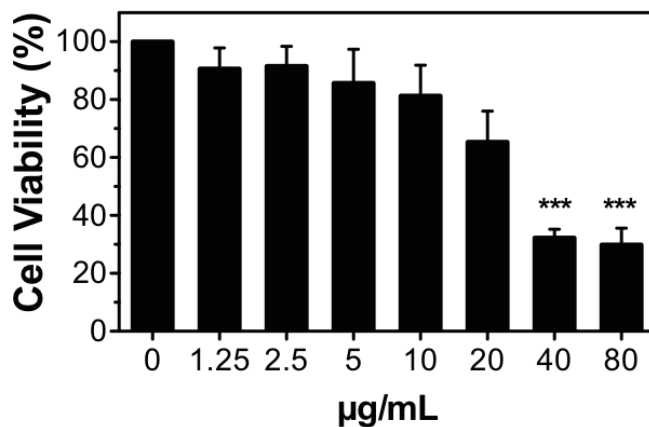


Fig. 3

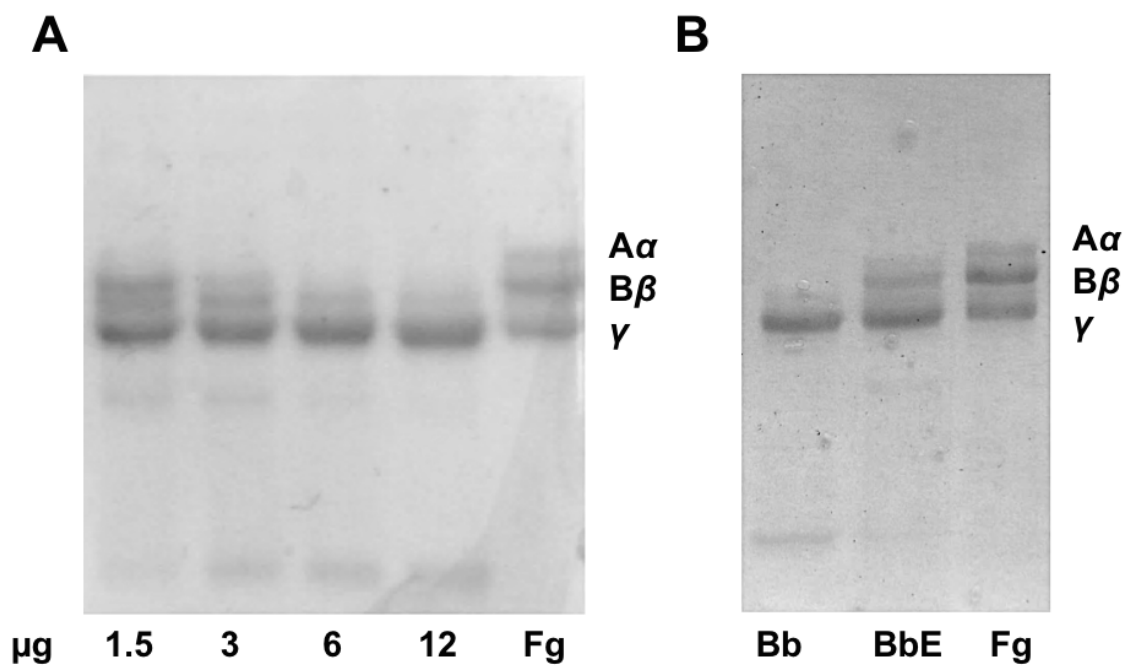


Fig.4

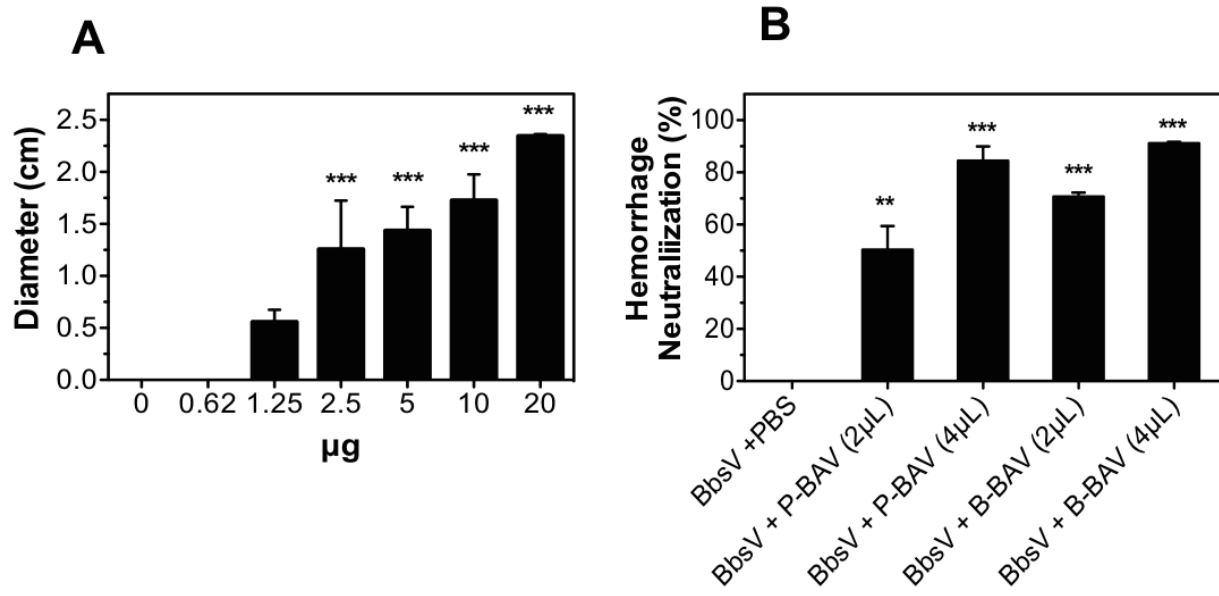


Fig. 5

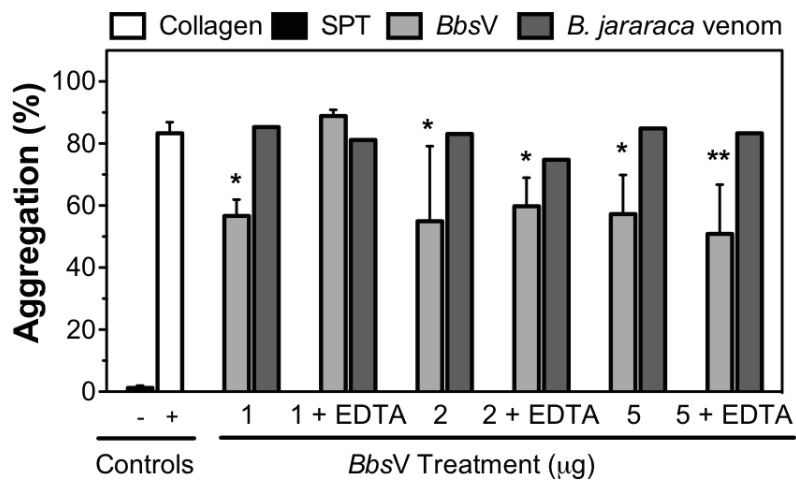


Fig. 6

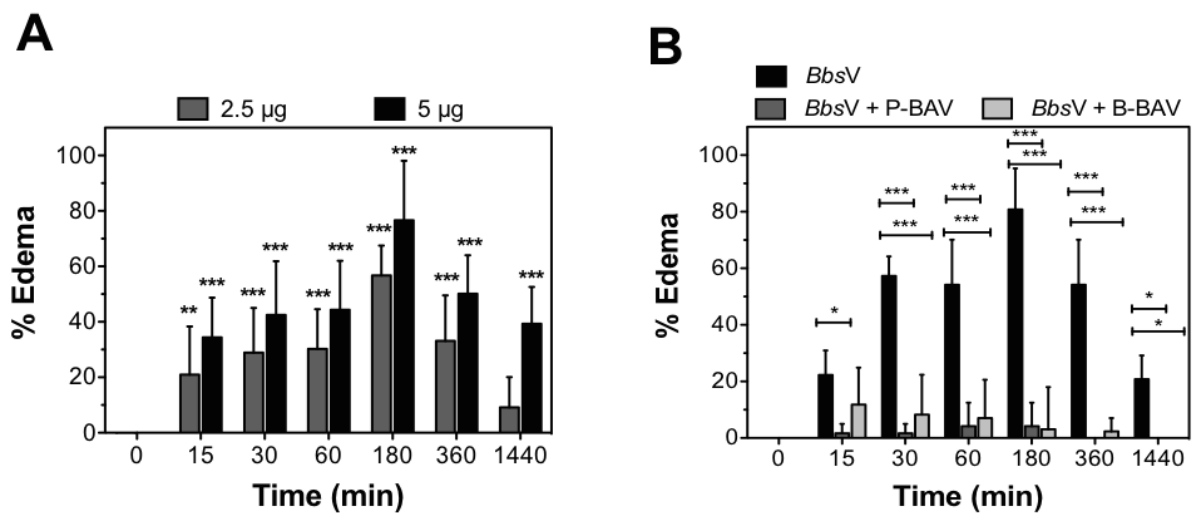


Fig. 7

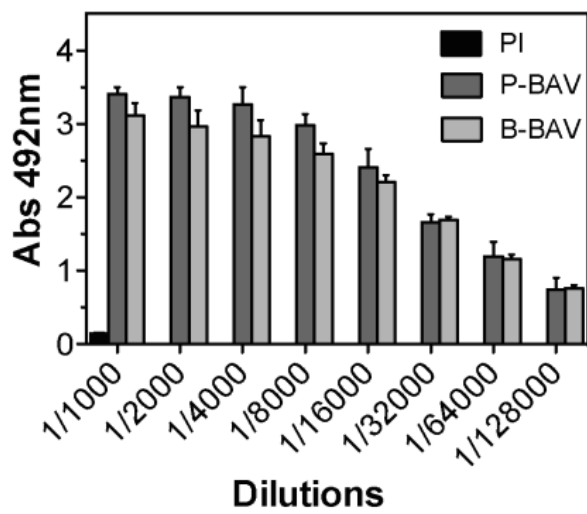
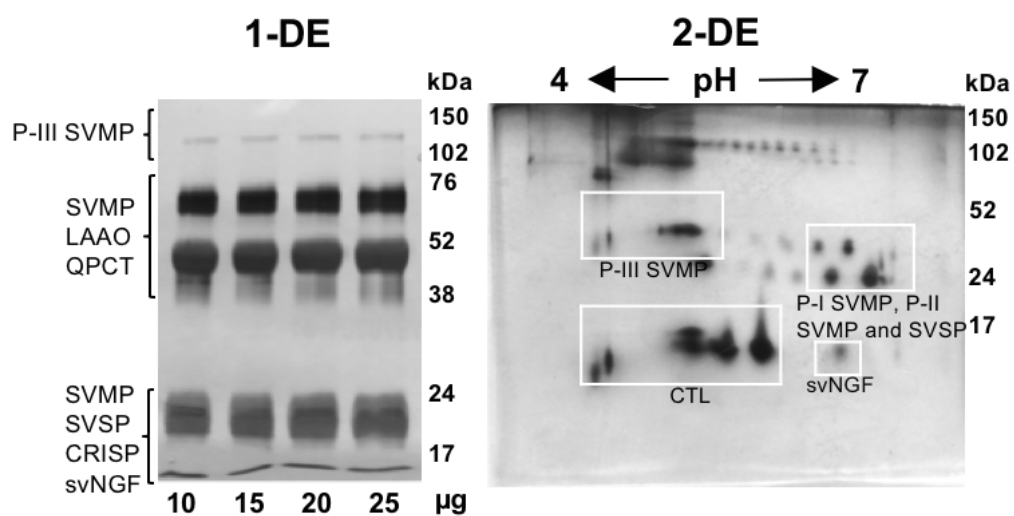
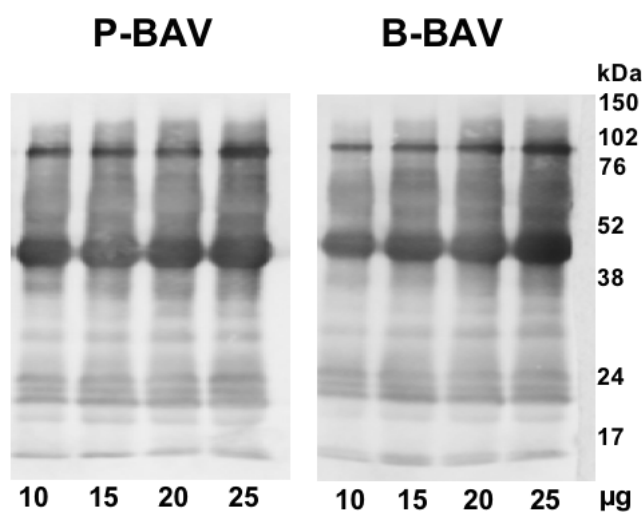


Fig. 8

A**B****C**