UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

Comparação do perfil proteico de diferentes fenótipos do veneno de serpentes da espécie *Bothrops jararaca* em relação à abundância de metaloproteases

Ana Flávia Ferreira Caramelo

Orientadora: Cristiéle da Silva Ribeiro

Co-orientadora: Karen de Morais Zani

Ilha Solteira - SP
12/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

Comparação do perfil proteico de diferentes fenótipos do veneno de serpentes da espécie *Bothrops jararaca* em relação à abundância de metaloproteases

Ana Flávia Ferreira Caramelo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Engenharia, Câmpus de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ilha Solteira - SP
12/2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Caramelo, Ana Flávia Ferreira.
C259c Comparação do perfil proteico de diferentes fenótipos do veneno de serpentes da espécie *bothrops jararaca* em relação à abundância de metaloproteases / Ana Flávia Ferreira Caramelo. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
26 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2023

Orientador: Cristiéle da Silva Ribeiro
Co-orientador: Karen de Morais Zani
Inclui bibliografia

1. Peçonhas. 2. Toxinas. 3. *Bothrops jararaca*. 4. Metaloproteases. 5. Veneno.

Amanda Sertori dos Santos
Bibliotecária - CRB/8-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao Usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Ilha Solteira

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

"COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE DIFERENTES FENÓTIPOS DO VENENO DE SERPENTES DA ESPÉCIE *BOTHROPS JARARACA* EM RELAÇÃO À ABUNDÂNCIA DE METALOPROTEASES"

ANA FLÁVIA FERREIRA CARAMELO

REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:

Artigo 25º - § 2º A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máxima de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta do(a) aluno(a) a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

Artigo 24º - No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADO(A) ou REPROVADO(A).

COMISSÃO EXAMINADORA

1ª EXAMINADORA (Orientadora-Presidente)
Nome: Profa. Dra. Cristiéle da Silva Ribeiro Cristiéle S Ribeiro

2ª EXAMINADORA
Nome: Dra. Caroline Serino Silva Caroline Serino Silva

3ª EXAMINADORA
Nome: Dra. Karen de Morais Zani Karen de Morais Zani

CONCEITO
(x) Aprovado(a)
( ) Reprovado(a)

Ilha Solteira-SP, 18 de dezembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Venho carinhosamente por meio deste Trabalho de Conclusão de Curso agradecer algumas pessoas que fizeram o meu sonho se tornar possível.

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus e sua misericórdia, depois gostaria de agradecer à minha mãe Flávia e minha família pornunca me deixarem desistir, mesmo com os dias ruins muitas vezes sendo maioria.

Não poderia deixar de agradecer minha amiga Lorena Masetti por não me desamparar e me ajudar nos momentos mais difíceis, gostaria também de agradecer aos meus companheiros de curso ede Universidade que fizeram meus dias mais coloridos e felizes: Matheus Dutra, Laura Araújo, Vinicius Marqui, Jessica Mazalli, Ana Eduarda Tenório e Isabela Paschini.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer meus parceiros de laboratório do Instituto Butantan, principalmente a Dra. Karen Zani, Dra. Caroline Serino, Nathalia Galizio, Leticia Naves, Jessyca Pummer e Vitor Samele.

RESUMO

As peçonhas de serpentes constituem as toxinas animais mais estudadas. As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos no Brasil, sendo que o veneno botrópico possui três atividades principais: proteolítica ou necrosante, coagulante e hemorrágica. O quadro clínico decorrente do envenenamento por serpentes desse gênero caracteriza-se por manifestações locais importantes, resultantes da ação de diferentes famílias de toxinas, dentre elas as metaloproteases (SVMP). O objetivo deste trabalho foi analisar 50 indivíduos da espécie *B. jararaca* do estado de São Paulo para estabelecer os possíveis fenótipos de veneno dessa espécie com relação à abundância de SVMP através de Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. Foram selecionados e diferenciados cinco tipos de fenótipos dentre os venenos estudados neste trabalho, o primeiro com o perfil proteico mais comumente descrito, o segundo com ausência de SVMP III, o terceiro com baixa intensidade de SVMP PI, o quarto com baixa intensidade de SVMP PIII e o quinto com intensidade baixa em ambas as SVMP.

Palavras-chave: Peçonhas; Toxinas; Fenótipos; Envenenamento.

ABSTRACT

Snake venoms are the most studied animal toxins. Snakes of the genus Bothrops are responsible for 90% of snakebites in Brazil, and the bothrops venom has three main activities: proteolytic or necrotizing, coagulating and hemorrhagic. The clinical picture resulting from poisoning by snakes of this genus is characterized by important local manifestations, resulting from the action of different families of toxins, including metalloproteases (SVMP). The objective of this work was to analyze 50 individuals of the species B. jararaca from the state of São Paulo to establish the possible venom phenotypes of this species in relation to the abundance of SVMP through electrophoresis in polyacrylamide gel containing SDS. Five types of phenotypes were selected and differentiated among the venoms studied in this work, the first with the most commonly described protein profile, the second with the absence of SVMP III, the third with low intensity of SVMP PI, the fourth with low intensity of SVMP PIII and the fifth with low intensity in both SVMP.

Keywords: Venoms; Toxins; Phenotypes; Poisoning.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO *5*

2- OBJETIVO *7*

3- MATERIAIS E MÉTODOS *8*

Venenos *8*

Caracterização da composição proteica dos venenos *9*

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO *10*

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS *16*

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *18*

INTRODUÇÃO

Bothrops jararaca é uma espécie de serpente venenosa encontrada em diversas regiões do Brasil, pode chegar a cerca de um metro de comprimento, e é considerada uma das principais causadoras de acidentes ofídicos no país, com efeitos que podem variar de dores locais até danos graves em órgãos vitais (CARDOSO, 2009). Com relação aos acidentes causados pelo gênero *Bothrops*, segundo o Ministério da Saúde(2019) são registrados, anualmente, cerca de 18 mil acidentes, que ocorrem principalmente em áreas rurais. A espécie *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*) é a mais comum no sudeste brasileiro, habitando desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (CARDOSO, 2009). O estudo de *Bothrops jararaca* e seu veneno é de grande importância para a saúde pública no Brasil e no mundo, permitindo a prevenção e tratamento de acidentes ofídicos, bem como a busca por novas terapias e medicamentos a partir das propriedades bioativas do veneno.

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, os mais complexos de todos os venenos, sendo também as toxinas animais mais estudadas. Esses venenos representam uma inovação crítica na evolução dos ofídios que permitiu a transição da forma de captura da presa de mecânica (constrição) para química (veneno) e esta inovação desempenhou um papel importante na diversificação destes animais (ALAPE-GIRÓN et al., 2008).

A principal função destas toxinas é imobilizar, paralisar e matar a presa a fim de que a mesma possa ser ingerida de maneira segura. Entretanto, a ação de cada um destes componentes, bem como sua interação no envenenamento humano, ainda não está totalmente esclarecida. A atenção maior que a comunidade científica atribui aos venenos de serpentes deve-se ao seu elevado risco contra a saúde humana. Apesar da maioria dos envenenamentos serem causados por artrópodes, quase 80% das mortes são por peçonhas ofídicas. Em território brasileiro os envenenamentos por serpentes são causados por animais pertencentes aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Entretanto, a maioria dos casos de envenenamentos ofídicos no Brasil são de serpentes pertencentes à família Viperidae, sendo 81,7% por *Bothrops*, 8,93% por *Crotalus* e 3,45% por *Lachesis*. As serpentes do gênero *Micrurus* são pertencentes à família Elapidae e representam 0,95% dos acidentes ofídicos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Devido à importância médica de *Bothrops jararaca*, diversos estudos têm sido realizados para entender melhor a composição do seu veneno, seus efeitos sobre o organismo humano e a elaboração de tratamentos eficazes para o combate aos acidentes ofídicos. Cerca de

90% do peso seco dos venenos é constituído por proteínas, porém, apesar de apresentarem mais de 100 proteínas distintas, estas pertencem apenas a algumas famílias de enzimas (serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases) e proteínas sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas,peptídeos natriuréticos, miotoxinas, toxinas CRISP, fatores de crescimento neural e endotelial, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz), que podem afetar diferentes sistemas do corpo humano, como o cardiovascular, o nervoso e o hematológico (FRY; WÜSTER, 2004).

O veneno botrópico possui três atividades principais: (i) proteolítica ou necrosante, que causa edema inflamatório na região da picada com destruição tecidual (PINHO; PEREIRA, 2001) (ii) coagulante, por meio da atividade thrombin-like (semelhante à ação da trombina), ativadora de protrombina e do fator X, promovendo consumo dos fatores de coagulação com consequente alteração da coagulação sanguínea; e (iii) hemorrágica, que causa destruição do endotélio vascular na região da picada. Nos casos de envenenamento botrópico há diferenças entre o veneno de serpentes jovens, predominantemente coagulante, e adultas, com maior ação proteolítica e menor ação coagulante (PINHO; PEREIRA, 2001). O quadro clínico caracteriza-se por manifestações locais importantes como dor e edema de caráter precoce e progressivo. Frequentemente surgem equimoses, lesões bolhosas e sangramentos no local da picada (RIBEIRO, 1997). Nos casos mais graves pode ocorrer necrose de tecidos moles, podendo deixar com sequelas o membro acometido. As manifestações sistêmicas incluem sangramentos cutâneos persistentes, gengivorragias, epistaxes, hematêmese e hematúria. Podem ocorrer vômitos, sudorese, hipotensão arterial e, raramente, choque (PINHO; PEREIRA, 2001).

As principais toxinas responsáveis pelo efeito local do envenenamento botrópico são as metaloproteases (SVMP) (BERNARDONI, 2014). As SVMP são enzimas que dependem de íons metálicos para serem ativadas. Estas enzimas estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos do envenenamento, especialmente a hemorragia e degradação de fatores da cascata de coagulação sanguínea. As SVMP podem ser divididas em três classes, P-I, P-II e P-III. As SVMP P-I são enzimas de massa molecular entre 20 e 30 kDa que apresentam apenas o domínio protease (ou domínio catalítico). As SVMP P-II são enzimas de massa molecular de cerca de 30 a 50 kDa que, além do domínio catalítico, apresentam um domínio desintegrina. As SVMP P-III correspondem, normalmente, à classe de metaloproteases mais abundante nos venenos botrópicos e apresentam intensa atividade hemorrágica. Apresentam o domínio catalítico, o desintegrina e um terceiro domínio, rico em cisteínas. Possuem massa molecular

variando entre 50 e 80 kDa e podem apresentar-se na forma monomérica (classe P-III) ou na forma dimérica (classe P-IIIb). Ainda, a classe P-IIIc corresponde a SVMP com massa molecular entre 80 e 100 kDa que apresentam, além dos 3 domínios anteriores, dois domínios tipo lectina, ligados por pontes dissulfeto no final de sua estrutura. A diversidade de SVMP nos venenos desses animais demonstra a importância dessa classe de toxinas para a adaptação e evolução das serpentes do gênero *Bothrops* (BERNARDONI, 2014)

Devido à sua importância epidemiológica, a composição do veneno da espécie B. jararaca foi caracterizada por meio de diversas abordagens proteômicas. As cinco principais famílias de toxinas que compõem o veneno de *B. jararaca* são as SVMP (~35%), as serinoproteases (~27%), as lectinas do tipo C (~19%), as fosfolipases A2 (~10%), e L-aminoácido oxidases (~7%)25–28 .Como descrito anteriormente, as SVMP são as mais abundantes no veneno da B. jararaca, desempenhando um importante papel no envenenamento (GALIZIO, 2018).

Entretanto, em um estudo recente, verificou por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que alguns indivíduos da espécie *B. jararaca* apresentam veneno pobre em SVMP, que reflete em uma menor atividade proteolítica sobre o colágeno (GALIZIO, 2018). Como essa característica não havia sido descrita até então, iniciamos um screening com um número maior de amostras individuais e observamos a presença de 5 fenótipos de venenos de *B. jararaca* com relação à abundância relativa de SVMP.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi analisar 50 indivíduos da espécie *B. jararaca* do estado de São Paulo para estabelecer os possíveis fenótipos de veneno dessa espécie com relação à abundância de metaloproteases (SVMP).

MATERIAIS E MÉTODOS

Venenos

Os venenos utilizados foram coletados de 50 serpentes da espécie *B. jararaca* recém-chegadas ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, sendo todos os espécimes adultos, provenientes do estado de São Paulo.

As serpentes recém-chegadas ao Instituto Butantan passaram por uma triagem em que se verificou a procedência do animal e a importância da localidade para manter a variabilidade no biotério. Após esta análise, o animal foi clinicamente examinado, pesado, medido e recebeu um manejo profilático que consta em um banho de imersão em triclorfon 0,2% (ectoparasiticida) e vermifugação contra diferentes nematódeos (ivermectina 2 mg kg-1), trematódeos e cestódeos (praziquantel 8 mg kg-1).

Após estes procedimentos, a serpente foi encaminhada para a primeira quarentena, onde permaneceu por 30 dias. A serpente foi mantida em gaiola plástica, com papelão corrugado e água *ad libitum*. Neste período, o animal foi observado diariamente, regularmente alimentado e, após 15 dias, recebeu a segunda dosagem dos vermífugos. Como a primeira quarentena recebe novas serpentes semanalmente, houve a necessidade de implementar uma segunda quarentena após o final dos 30 primeiros dias. Durante essa segunda quarentena os animais que sealimentaram regularmente e com os exames indicando que os animais estavam saudáveis, foram transferidos em um sistema "all in, all out". Com este sistema o período total de quarentena é de, no mínimo, 60 dias.

Ao sair da segunda quarentena para as salas de produção de venenos, as serpentes receberam um microchip, inserido no tecido subcutâneo na lateral do terço posterior esquerdo do corpo. Nas salas de produção de venenos, as serpentes continuam mantidas em gaiolas plásticas com papelão corrugado e água ad libitum. Para aumentar a segurança do extrator, diminuir o estresse dos animais e reduzir o desperdício de veneno devido a botes desnecessários, as serpentes foram submetidas, individualmente, a ambiente saturado de dióxido de carbono por, aproximadamente, 5 minutos.Esta metodologia é utilizada desde 1989 e é aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB). A extração do veneno foi realizada em microtubos que foram encaixados nas presas do animal e assim extraído, devido à necessidade de coleta devenenos individuais.

Na semana seguinte à extração de veneno, as serpentes foram alimentadas com camundongos ou ratos criados no Biotério Central do Instituto Butantan, a porção oferecida não ultrapassa 20% do peso do animal para evitar obesidade. Os venenos foram obtidos por meio da extração manual conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Após aextração, os venenos foram centrifugados a 1700 x g por 15 minutos a 4^{o}C, liofilizados e armazenados a -20^{o}C.

Caracterização da composição proteica dos venenos

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

O perfil proteico dos venenos coletados foram analisados por meio de SDS-PAGE. As amostras dos venenos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, de acordo com Laemmli . Por canaleta, foram aplicados 20 μg de proteína. Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando Coomassie G, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). Os géis corados foram submetidos à densitometria, utilizando o scanner ImageScan III (GE Healthcare), e analisados pelo programa de computação GelAnalyzer

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma técnica muito utilizada para comparação das proteínas dos venenos de serpentes é o SDS-PAGE. A eletroforese dos venenos possibilitou a visualização de grupos com características em comum com relação à metaloprotease.

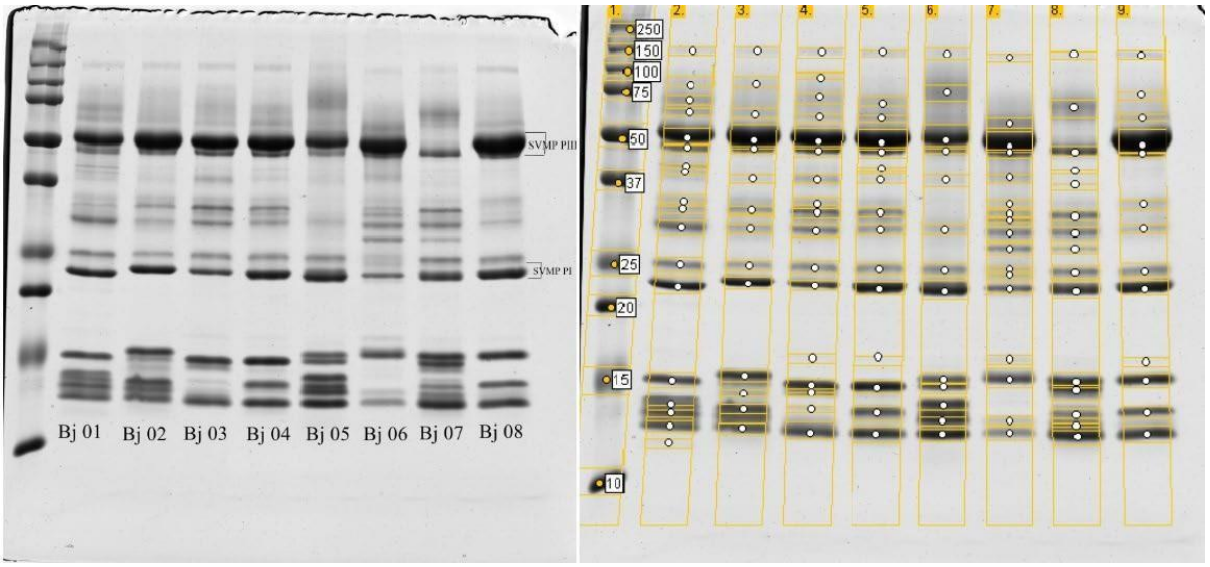

Fig. 1. Perfil de eletroforese Gel 1 - Venenos de 1 a 8 sem análise do Gel Analyzer e com análise. Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 1 foi possível observar a presença de SVMP P-III em praticamente todos os venenos, comexceção do veneno Bj 07. Em alguns venenos, como o Bj 06 e Bj 08, a abundância relativa deSVMP P-III é maior, correspondendo a valores acima de 38 % e com massa molecular entre 47e 48 kDa. Nos demais venenos deste gel de eletroforese as bandas referentes a SVMP P-IIIcorrespondem de 19 a 32% com massa molecular de 47 a 54 kDa. As bandas referentes a SVMPdo tipo P-I correspondem de 8% a 19% dos venenos e possuem entre 21 e 23 kDa, com maiorabundância em Bj 05 (17,28%) e Bj 08 (18,15%) e com menor abundância em Bj 06 (8,91%). De acordo com um estudo sobre a Variabilidade Funcional de SVMP as Metaloproteases daclasse P-III foram encontradas majoritariamente entre 60 kDa e as de classe PI entre 25 kDa,portanto é possível dizer que os dados encontrados neste trabalho estão adequados aos padrõesjá descritos na literatura (BERNARDONI et al., 2014).

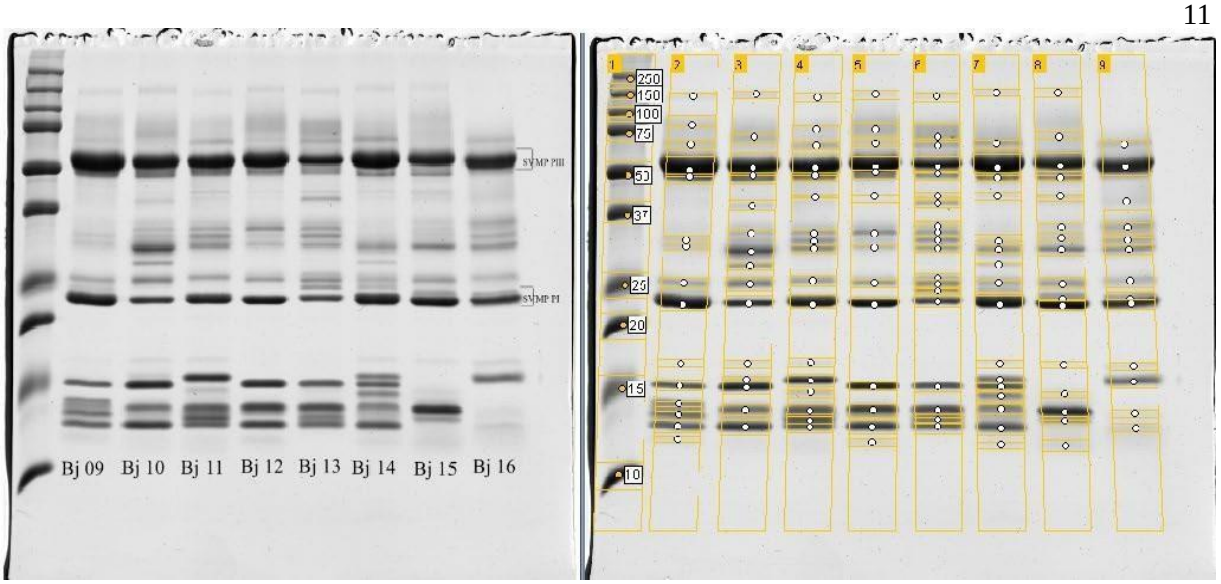

Fig. 2. Perfil de eletroforese Gel 2 - Venenos de 9 a 16 sem análise do Gel Analyzer e com análise. Fonte: Próprio autor.

Analisando a figura 2 foi possível observar a presença de SVMP P-III e P-I em todos os venenos deste gel de eletroforese. As bandas referentes a SVMP P-III ocupam de 19% a 33% e pesam entre 53 e 55 kDa, com maior presença em Bj 09 (32,66%), assim como a enzima *Jararhagin - SVMP* que foi encontrada com massa de 53 kDa (BERNARDONI et al., 2014). Com menor presença em Bj 13 (19,34%). As bandas referentes a SVMP P-I ocupam de 9% a 20% e pesam entre 22 e 23 kDa, assim como *BnMPIa - SVMP* que foi encontrada com 23 kDa de acordo com a literatura (BERNARDONI et al., 2014). Com maior presença em Bj 09 (20,75%) e menor presença em Bj 10 (9,20%).

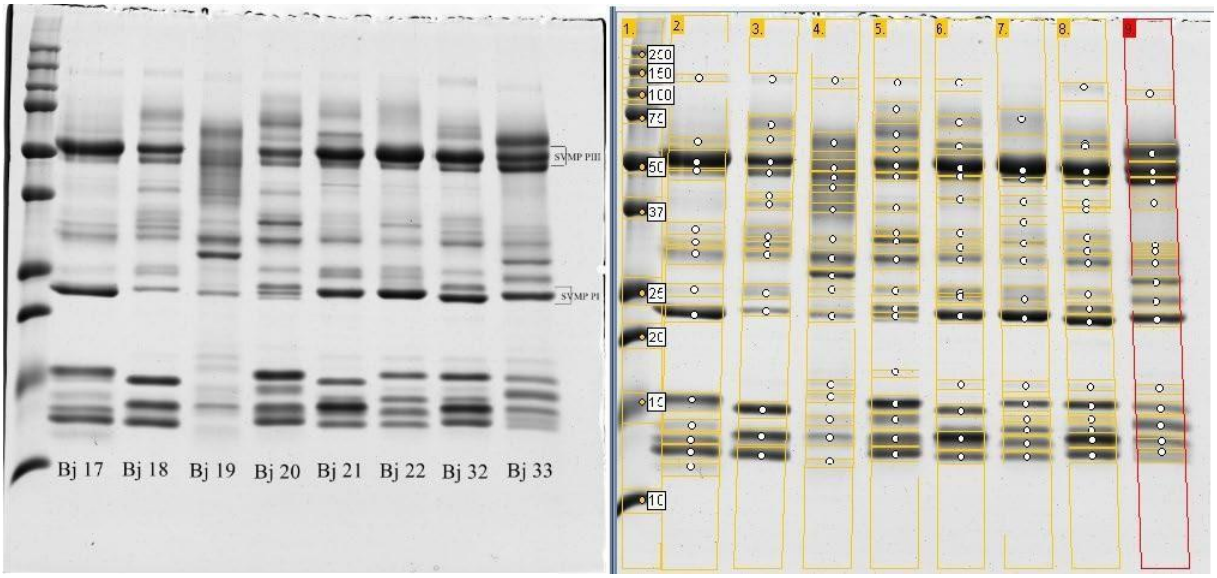

Fig. 3. Perfil de eletroforese Gel 3 - Venenos de 17 a 33 sem análise do Gel Analyzer e com

análise. Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 3 foi possível observar a presença de SVMP P-III e P-I em todos os venenos deste gel de eletroforese. O veneno Bj 19 apresentou uma intensidade fraca na banda de SVMP P-III, com consequência disso ocupa apenas 9,33% de sua lane, um volume baixo comparado aos outros. As bandas referentes a SVMP P-III ocupam de 9% a 30% e pesam entre 48 e 51 kDa, com maiorpresença em Bj 22 (29,56%) e menor presença em Bj 19. As bandas referentes a SVMP P-I apresentam de 4% a 17% e pesam entre 22 e 23 kDa, com maior presença em Bj 17 (16,26%) e menor presença em Bj 19 (4,97%) e Bj 20 (4,04%).

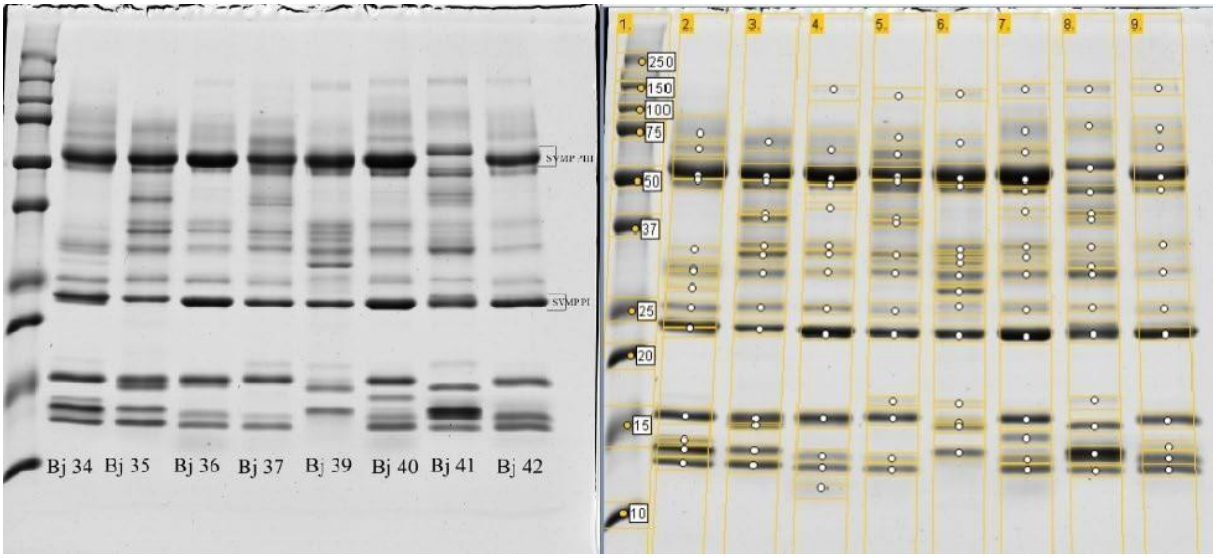

Fig. 4. Perfil de eletroforese Gel 4 - Venenos de 34 a 42 sem análise do Gel Analyzer e com análise. Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 4 foi possível perceber a presença de SVMP P-III em todos os venenos deste gel de eletroforese, com exceção do veneno Bj 41. As bandas referentes a SVMP P-III ocupam de 19%a 30% e pesam entre 50 e 51 kDa, com maior presença em Bj 39 (30,04%) e menor presença em Bj 37 (19,99%). As bandas referentes a SVMP P-I ocupam de 8% a 18% e pesam entre 22 e 23 kDa, com maior presença em Bj 40 (17,41%) e menor presença em Bj 34 (8,20%).

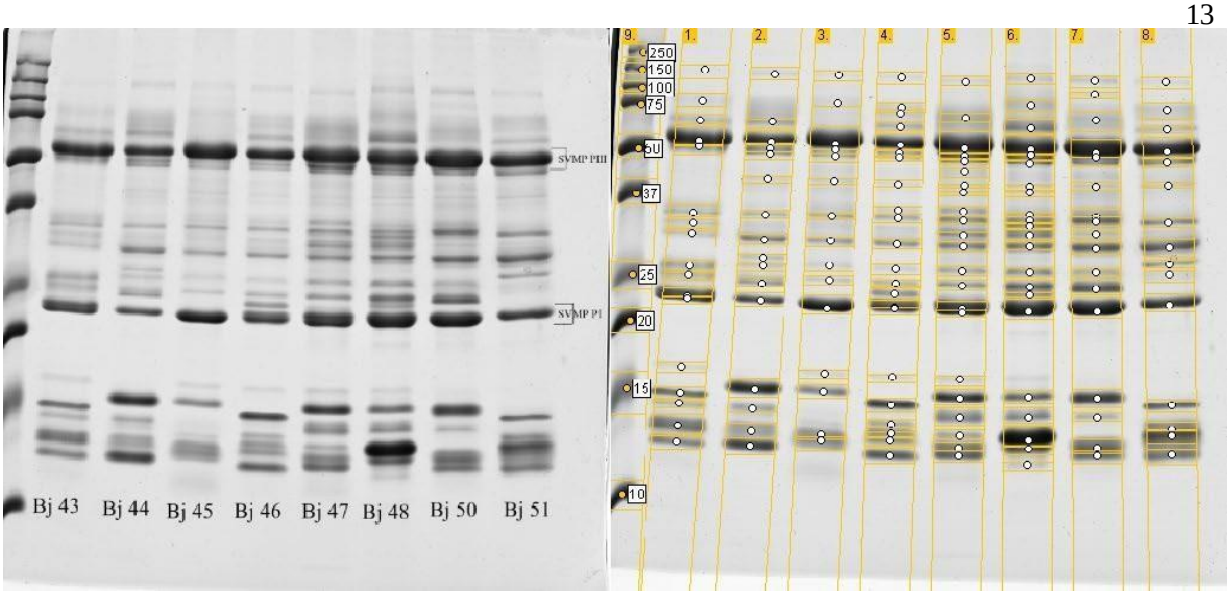

Fig. 5. Perfil de eletroforese Gel 5 - Venenos de 43 a 51 sem análise do Gel Analyzer e com análise. Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 5 foi possível observar a presença de SVMP P-III e P-I em todos os venenos deste gel de eletroforese. O veneno Bj 47 possui 5,17 % de SVMP P-III em sua lane, o que é um valor baixocomparado as outras bandas de P-III. Nesse gel as bandas de P-III ocupam de 5% a 31% e pesamentre 50 e 53 kDa, com maior presença em Bj 45 (30,69%) e menor presença em Bj 47. As bandas referentes a SVMP P-I ocupam entre 2% e 23% e pesam de 21 a 25 kDa, com maior presença em Bj45 (23,07%) e menor presença em Bj 47 (2,73%). Nesse gel de eletroforese podemos observar a presença de muitas bandas entre 10 e 15 kDa, que são bandas referentes a fosfolipase e desintegrina, por isso houve uma variação entre o volume ocupado pelas bandas de metaloprotease.

Como já dito na literatura, o grupo mais abundante e diversificado em veneno de *B. jararaca* são as Metaloproteases mesmo em comparação com outras enzimas (GALIZIO et al., 2018) e através destes resultados podemos observar o mesmo padrão.

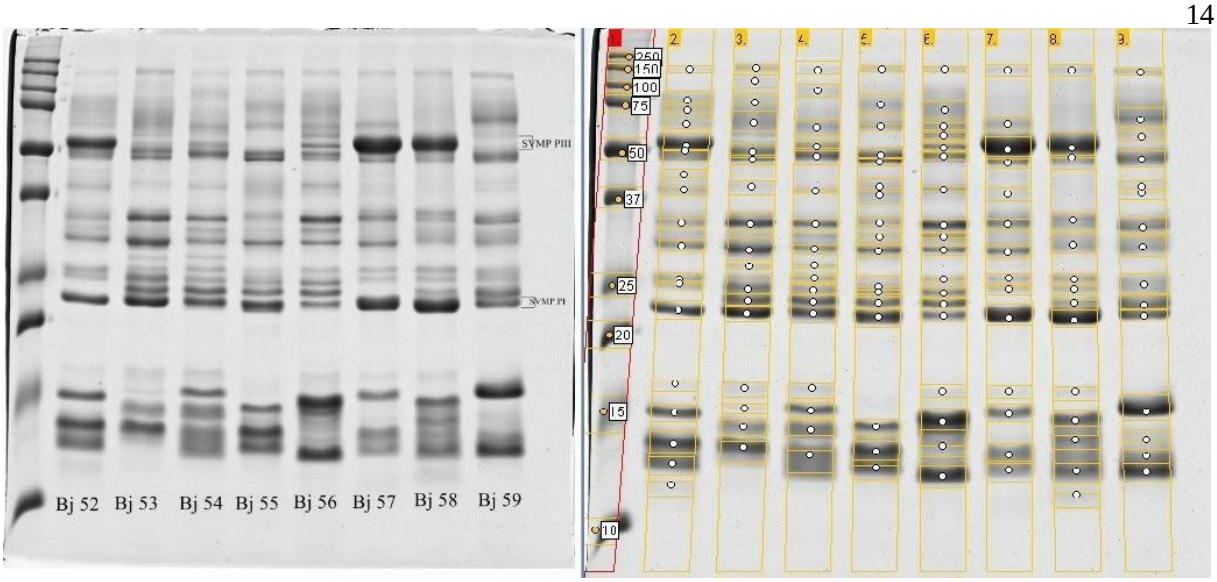

Fig. 6. Perfil de eletroforese Gel 6 - Venenos de 52 a 59 sem análise do Gel Analyzer e com análise. Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 6 foi possível observar a presença de SVMP P-III em quase todos os venenos, com exceção do veneno Bj 59. Também foi possível observar que no veneno Bj 56 a intensidade deSVMP P-III e P-I é baixa, a P-III ocupa apenas 4,07% de sua lane e a P-I ocupa 5,23%. As bandasde SVMP P-III ocupam de 3% a 25% e pesam entre 49 e 53 kDa, com maior presença em Bj 57(24,65%) e menor presença em Bj 54 (3,47%). As bandas de SVMP P-I ocupam de 5% a 18 % e pesam 22 kDa, com maior presença em Bj 57 (17,13%) e menor presença em Bj 56 (5,23%)

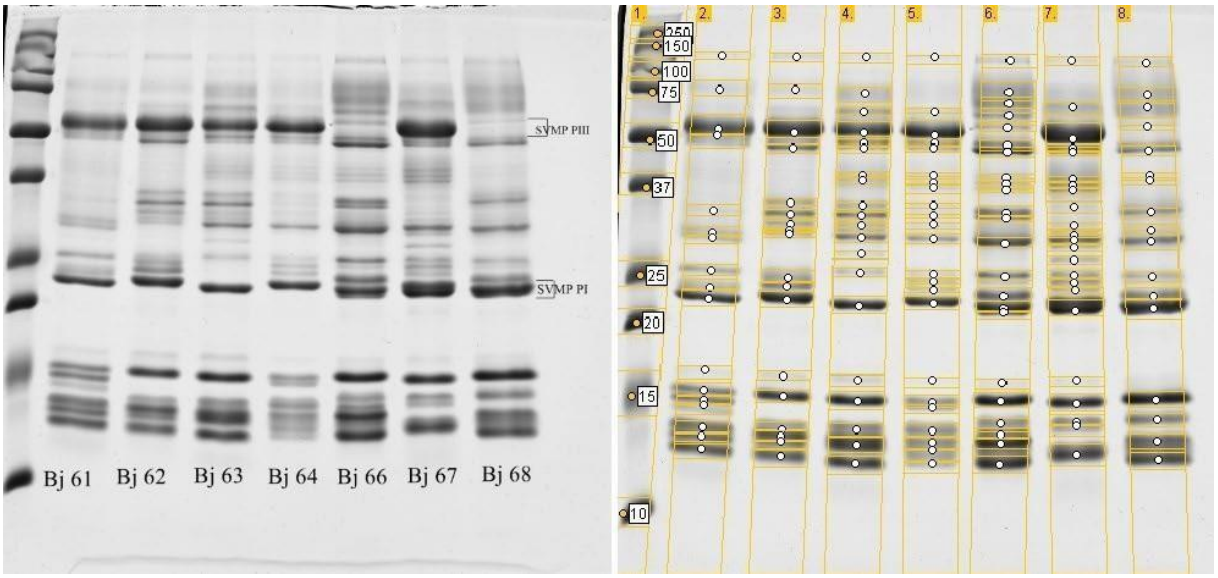

Fig. 7. Perfil de eletroforese Gel 7 - Venenos de 61 a 68 sem análise do Gel Analyzer e com

análise. Fonte: Próprio autor.

Foi possível observar a presença de SVMP P-III em quase todos os venenos, com exceção do veneno Bj 66 e Bj 68. As bandas de P-III ocupam de 12 a 20% e pesam de 52 a 54 kDa, com maior presença em Bj 64 (22,79%) e menor presença em Bj 63 (12,15%). As bandas referentes a P-I ocupam de 1 a 16%, com maior presença em Bj 68 (15,94%) e menor presençaem Bj 67 (1,60%), pesando de 22 a 23 kDa. Nesse gel de eletroforese também foi possível observar um número maior de bandas na região entre 15 e 10 kDa, o que ocasionou uma diferença significativa no volume de cada banda.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração tudo o que há na literatura, podemos concluir que a massa molecular das enzimas analisadas seguem no mesmo padrão , pois a classe P-I possui enzimas de massa molecular entre 20 a 30kDa, a classe P-II possui enzimas de massa molecular de 30 a 50kDa e a classe P-III possui enzimas com massa molecular de 50 a 80 kDa; (BJARNASON; FOX, 1994). Como já era esperado (NICOLAU et al., 2017) , as toxinas SVMPs representam as toxinas mais abundantes no veneno de *B. jararaca.* Essas enzimas são divididas predominantemente em dois picos principais, a SVMP- I e a SVMP-III, sendo a do tipo III mais abundante.

Após a análise do volume ocupado pelas bandas de metaloproteases (SVMP) e comparando os valores entre todos os resultados, foi possível separar em grupos os venenos e suas múltiplas características. A partir dessa análise foi possível separar os venenos de *Bothrops jararaca* em diferentes fenótipos.

I) O primeiro deles é aquele que possui um perfil proteico mais comumente descrito de SVMP PI e PIII, onde estão localizados os venenos Bj 01, Bj 02, Bj 03, Bj 04, Bj 05, Bj 08, Bj 09, Bj10, Bj 11, Bj 12, Bj 13, Bj 14, Bj 15, Bj 16, Bj 17, Bj 21, Bj 22, Bj 32, Bj 33, Bj 34,Bj 35, Bj 36, Bj 37, Bj 39, Bj 40, Bj 42, Bj 43, Bj 44, Bj 45, Bj 46, Bj 47, Bj 48, Bj50, Bj 51, Bj 52, Bj 57, Bj 58, Bj 61, Bj 62, Bj 63, Bj 64 e Bj 67.

II) O segundo tipo de fenótipo é aquele onde não há a presença de SVMP PIII, onde estão localizados os venenos Bj 07, Bj 41, Bj 59, Bj 66 e Bj 68.

III) O terceiro tipo de fenótipo é aquele onde a intensidade de SVMP PI é baixa, onde estão localizados os venenos Bj 06 e Bj 18.

IV) O quarto fenótipo é aquele onde a intensidade de SVMP PIII é baixa, onde estão localizados os venenos Bj 53, Bj 54 e Bj 55.

V) O quinto fenótipo é aquele onde a intensidade de SVMP PI e PIII são baixas, mas ainda há a presença delas, onde estão localizados os venenos Bj 19, Bj 20 e Bj 56.

Tipo de Fenótipo	**Veneno encontrado**
Perfil proteico mais comumente descrito de SVMP PI e PIII	Bj 01, Bj 02, Bj 03, Bj 04, Bj 05, Bj 08, Bj 09, Bj 10, Bj 11, Bj 12, Bj 13, Bj 14, Bj 15, Bj 16, Bj 17, Bj 21, Bj 22, Bj 32, Bj 33, Bj 34, Bj 35, Bj 36, Bj 37, Bj 39, Bj 40, Bj 42, Bj 43, Bj 44, Bj 45, Bj 46, Bj 47, Bj 48, Bj 50, Bj 51, Bj 52, Bj 57, Bj 58, Bj 61, Bj 62, Bj 63, Bj 64 e Bj 67
Não há presença de SVMP PIII	Bj 07, Bj 41, Bj 59, Bj 66 e Bj 68
Intensidade de SVMP PI baixa	Bj 06 e Bj 18
Intensidade de SVMP PIII baixa	Bj 53, Bj 54 e Bj 55
Intensidade de SVMP PI e PIII baixa	Bj 19, Bj 20 e Bj 56

Tabela 1: Venenos encontrados em cada tipo de fenótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAPE-GIRÓN, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J. J. Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. J. Proteome Res. 7, 3556– 3571, 2008.

BERNARDONI, J. L.; SOUSA, L.F.; WERMELINGER, L.S.; LOPES, A.S.; PREZOTO, B.C.; SERRANO, S.M.T.; ZINGALI, R.B.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Functional variability of snake venom metalloproteinases: Adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. PLoS One 9, e109651, 2014.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, v. 7, n. 2, p. 121–209, 1988.

CALVETE, J. J. Venomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. J Proteomics 72, 121–126, 2009.

CARDOSO, J.L.C. Epidemiologia dos Acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, João Luiz Costa. **Animais peçonhentos no Brasil**: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. Indianápolis: Sarvier, 2009.

FRY, B. G. ; WÜSTER, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. Mol. Biol. Evol. 21, 870–883, 2004.

GALIZIO, N. C.; SERINO-SILVA, C.; STUGINSKI, D.R.; ABREU, P.A. E.; SANT´ANA, S.S.; GREGO, K.F.; TASHIMA, A.K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; MORAIS- ZANI, K. Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. J. Proteomics 186, 56–70, 2018.

Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Acidente por animais peçonhentos, serpentes peçonhentas. Notificações registradas: banco de dados. 2019.

NICOLAU, C.A.; CARVALHO, P.C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; JUNQUEIRA, M.; PERALES, J.; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; VALENTE, R.H. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. Journal of Proteomics. 151, 214-231, 2017.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. Rev. Assoc. Med. Bras. 47, 24–29, 2001.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 30, 475–480, 1997.