

**Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**  
**Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP**  
**“Dr. Antônio Guilherme de Souza”**  
**Instituto Butantan**

**José Lucca Rodrigues**

**Estudo comparativo dos venenos de serpentes *Bothrops* do**  
**“Grupo *atrox*”**

**São Paulo**  
**2020**

**José Lucca Rodrigues**

**Estudo comparativo dos venenos de serpentes *Bothrops* do “Grupo *atrox*”**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Toxinas de Interesse em Saúde.

Orientadora: Marisa Maria Teixeira da Rocha

**São Paulo**

**2020**

Rodrigues, José Lucca

Estudo comparativo dos venenos de serpentes *Bothrops* do “Grupo *atrox*”/ José Lucca Rodrigues; orientador Marisa Maria Teixeira da Rocha. – São Paulo, 2020.

35 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Viperidae. 2. Envenenamentos. 3. *Bothrops*. I. Rocha, Marisa Maria Teixeira da. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Estudo comparativo dos venenos de serpentes *Bothrops* do “Grupo *atrox*”.

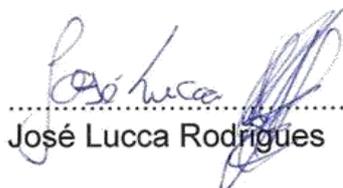
## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, José Lucca Rodrigues, aluno(a) do curso Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo \_\_\_\_\_ Justifique:

São Paulo, 27 de Fevereiro de 2020

  
.....  
José Lucca Rodrigues

De acordo:   
.....  
Orientadora: Marisa Maria Teixeira da Rocha

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha mãe Vera Rodrigues, que sempre me incentivou a buscar meus sonhos independente do quão diferentes e distantes eles poderiam parecer, por todo apoio recebido nesses anos.

Minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Marisa Maria Teixeira da Rocha, que me acolheu e se dispôs a me ensinar tudo o que fosse necessário, não apenas para o desenvolvimento deste trabalho, mas também para meu desenvolvimento pessoal e profissional, dentro da Biologia.

Gostaria de agradecer também à todos os funcionários e colaboradores do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por toda ajuda, mesmo que com algumas risadas em intervalos de um experimento e outro ou com ajuda para o uso de equipamentos técnicos e pelo conhecimento adquirido, mais especificamente ao Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna, à Dr<sup>a</sup> Karen de Moraes Zanni, Fabíola Rodrigues, Giovanni Perez, Lucas de Carvalho e à Dr<sup>a</sup> Kathleen Fernandes Grego, chefe do Laboratório de Herpetologia, por ter permitido o desenvolvimento deste estudo no laboratório.

## RESUMO

RODRIGUES, José Lucca. **Estudo comparativo dos venenos de serpentes *Bothrops* do “Grupo *atrox*”**. 2020. 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

Os venenos de serpentes são misturas complexas constituídas, em grande parte, de proteínas enzimáticas ou não; somando aproximadamente 90% do peso seco do veneno. O estudo da composição dos venenos colabora com o contínuo avanço biotecnológico, com o desenvolvimento de fármacos e na compreensão dos processos bioquímicos e fisiopatológicos dos organismos. O “grupo *Bothrops atrox*” corresponde a um conjunto de serpentes peçonhentas amplamente distribuídas na região neotropical e que apresenta um complexo padrão de variação morfológica interespecífico e intraespecífico. Por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, e contribuindo para o melhor entendimento das variações interespecíficas, bem como da filogenia dentro do complexo, foi proposto um modelo de estudo composto por análises biológicas e bioquímicas de 4 amostras de “*Pools*” de venenos (1 amostra por espécie) de exemplares machos e fêmeas, de diversas idades e procedências das espécies *Bothrops atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni*, visando uma análise comparativa por meio da quantificação proteica, análise dos perfis eletroforéticos e de zimografia dos venenos bem como determinação da Dose Mínima Coagulante, atividade hemorrágica, letalidade e a soroneutralização destas atividades pelo antiveneno botrópico. Os venenos das espécies estudadas apresentaram semelhanças em relação à algumas atividades bioquímicas, porém mostrando maiores particularidades nos testes de atividade biológica, sendo as atividades hemorrágica e de letalidade, assim como suas respectivas soroneutralizações.

**Palavras-chave:** Viperidae. *Bothrops atrox*. *Bothrops leucurus*. *Bothrops marajoensis*. *Bothrops moojeni*. Venenos. Soroneutralização.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Tipos de dentição de serpentes. ....	11
<b>Figura 2</b> – Indivíduos das espécies pertencentes ao Grupo <i>atrox</i> . ....	14
<b>Figura 3</b> - Quantificação proteica. ....	17
<b>Figura 4</b> - Ensaio de eletroforese ....	19
<b>Figura 5</b> - Fibrômetro ....	21
<b>Figura 6</b> - Gel de eletroforese. ....	23
<b>Figura 7</b> - Perfis densitométricos ....	24
<b>Figura 8</b> - Gel de zimografia ....	25
<b>Figura 9</b> - Gráfico de atividade caseinolítica. ....	26
<b>Figura 10</b> - Gráfico da atividade coagulante sobre o plasma equino citratado com o erro padrão. ....	26
<b>Figura 11</b> - Gráfico de atividade hemorrágica. ....	27
<b>Figura 12</b> - Gráfico de atividade hemorrágica do grupo controle. ....	27
<b>Figura 13</b> - Gráfico de neutralização da atividade hemorrágica ....	28
<b>Figura 14</b> - Número de óbitos ao inocular 115,0 µg de veneno/animal. ....	29
<b>Figura 15</b> - Gráfico de neutralização da atividade hemorrágica ....	29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Serpentes</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Venenos ofídicos</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3 Grupo <i>atrox</i></b> .....	<b>12</b>
1.3.1 <i>Bothrops atrox</i> (Linnaeu, 1758) .....	12
1.3.2 <i>Bothrops leucurus</i> (Wagler, 1966).....	13
1.3.3 <i>Bothrops marajoensis</i> (Hoge, 1966).....	13
1.3.4 <i>Bothrops moojeni</i> (Hoge, 1966) .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 ANIMAIS</b> .....	<b>15</b>
3.1.1 Serpentes.....	15
3.1.2 Camundongos .....	15
<b>3.2 VENENOS</b> .....	<b>16</b>
3.2.1 Obtenção dos venenos .....	16
<b>3.3 Quantificação de proteínas</b> .....	<b>16</b>
3.3.1 Solução A:.....	16
3.3.2 Solução B:.....	16
3.3.3 Solução C:.....	16
3.3.4 Solução D:.....	16
<b>3.4 Eletroforese SDS-PAGE</b> .....	<b>18</b>
3.4.1 Solução A (Tampão de concentração – pH 6,8 - 0,25 M): .....	18
3.4.2 Solução B (Tampão de separação – pH 8,8 – 0,75 M): .....	18
3.4.3 Solução C (Acrilamida – Bis-acrilamida): .....	18
3.4.4 Tampão de corrida – pH 8,3:.....	18
3.4.5 Tampão de amostra – 0,0625 M – Tris HCl – pH 6,8: .....	18
3.4.6 Solução Corante:.....	18
3.4.7 Solução descorante:.....	18
<b>3.5 Atividade gelatinolítica (Zimografia)</b> .....	<b>19</b>

3.6 Atividade proteolítica sobre caseína .....	20
3.7 Dose mínima coagulante sobre o plasma (DMC-P) .....	20
3.8 Atividade hemorrágica .....	21
3.9 Neutralização da Atividade hemorrágica .....	21
3.10 Letalidade .....	22
3.11 Neutralização da letalidade .....	22
4 RESULTADOS .....	22
4.1 Teor proteico: .....	22
4.2 Eletroforese em SDS-PAGE .....	23
4.3 Atividade gelatinolítica (Zimografia) .....	25
4.4 Atividade proteolítica sobre caseína .....	25
4.5 Dose mínima coagulante sobre o plasma (DMC-P) .....	26
4.6 Atividade hemorrágica .....	26
4.7 Soroneutralização da atividade hemorrágica .....	27
4.8 Letalidade .....	28
4.9 Soroneutralização da letalidade .....	29
5 DISCUSSÃO .....	30
6 CONCLUSÕES .....	33
REFERÊNCIAS .....	33

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Serpentes

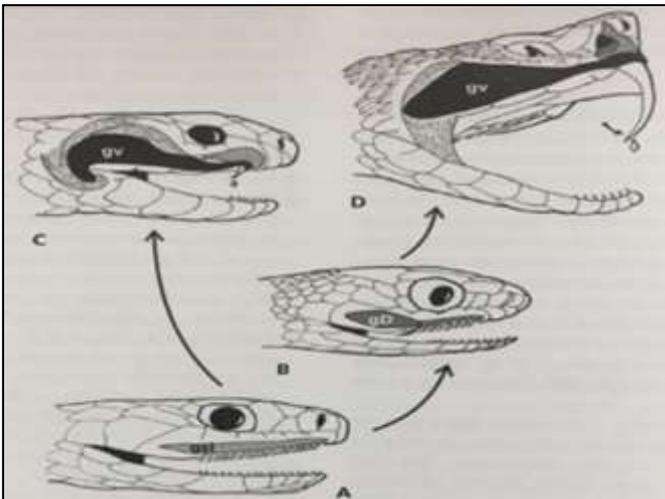
No mundo, atualmente são descritas cerca de 3.496 espécies de serpentes (BÉRNILS & COSTA 2015). A superfamília Colubroidea engloba as serpentes conhecidas como as mais “modernas e evoluídas” (MELGAREJO 2009), subdivida nas famílias: *Colubridae*, *Dipsadidae*, *Atractaspididae*, *Elapidae* e *Viperidae*. No Brasil foram registradas 826 espécies de serpentes, as quais estão alocadas nas famílias: *Colubridae (sensu lato)*, *Boidae*, *Aniliidae*, *Elapidae* e *Viperidae*. Os membros da subordem *Serpentes/Ophidia*, são caracterizados pelo corpo alongado, ausência de membros locomotores e do osso esterno, as maxilas ligadas fracamente entre si; pois a sínfise mandibular é composta de tecido conjuntivo, e a presença do quadrado mandibular no crânio, lhes permitem maior abertura da boca, facilitando assim a ingestão de presas com diâmetro superior ao seu próprio (BERNARDE et al. 2014; CARDOSO et al. 2003; UETZ 2019).

Comumente o tipo de dentição é utilizado na identificação e classificação das diversas famílias de serpentes, elas podem ser divididas em quatro tipos: Áglifa, Opistóglifa, Proteróglifa e Solenóglifa (CARDOSO et al. 2003):

A dentição áglifa (Figura. 1A) é caracterizada por apresentar dentes maciços, distribuídos por toda boca do animal sem qualquer tipo de diferenciação, esta dentição é encontrada em serpentes da família *Boidae* e alguns gêneros da família *Colubridae*. (GOMES et al. 1989; GOPALARISHNAKONE, 1991; BRASIL 1998). As serpentes que apresentam dentição opistóglifa (Figura. 1B) possuem um par de dentes diferenciados (inoculadores de peçonha) e, em muitas espécies, estes dentes são sulcados, facilitando a inoculação da peçonha. Encontram-se na região posterior da maxila superior da boca do animal. Este tipo de dentição é observado em vários gêneros da família *Colubridae*. (WÜSTER et al. 1988). A dentição proteróglifa (Figura. 1C) é caracterizada por apresentar um par de dentes diferenciados, localizados na região anterior da boca do animal. Estes dentes possuem um sulco bem mais acentuado do que aqueles presentes na presa opistóglifa. As serpentes pertencentes a família *Elapidae* exibem esta dentição (BERNARDE et al. 2014). A dentição solenóglifa (Figura. 1D) é a mais

especializada, sendo caracterizada por um par de dentes diferenciados, móveis e caniculados. Estes dentes encontram-se na região anterior da boca do animal, onde ainda são recobertos por uma bainha protetora, denominada *vagina dentalis*. O canal interno do dente inoculador comunica-se diretamente com as glândulas de veneno. As serpentes representantes da família *Viperidae*, apresentam esta dentição (DO AMARAL 1978; LEMA 1978; BRASIL 1998).

**Figura 1** - Tipos de dentição de serpentes.



**Fonte:** (BERNARDE 2014).

Representação dos diversos tipos de dentição presentes em ofídios; A) dentição áglifa; B) dentição opistóglifa; C) dentição proteróglifa; D) dentição solenóglifa. gsl: glândula supralabial; gD: glândula de Duvernoy; gv: glândula de veneno.

A OMS (Organização Mundial de Saúde) calcula que ocorram no mundo 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 30.000 a 40.000 mortes (SWARROP & GRAD 1954), A mortalidade dos acidentados varia nas diferentes regiões do mundo. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorrem entre 19 mil a 22 mil acidentes ofídicos por ano (BRASIL 1991).

## 1.2 Venenos ofídicos

Com a evolução da dentição e da cinética craniana, ocorreu, simultaneamente, o desenvolvimento da glândula de veneno, provavelmente a partir de estruturas salivares especializadas do lábio superior, como a Glândula de Duvernoy (CARDOSO et al. 2003). (Figura.1)

O estudo da composição dos venenos colabora com o contínuo avanço biotecnológico, como desenvolvimento de fármacos e na compreensão dos processos bioquímicos e fisiopatológicos nos organismos. Os venenos de serpentes são misturas complexas constituídas, em grande parte, de proteínas enzimáticas ou não; somando aproximadamente 90% do peso seco do veneno; como as fosfolipases, proteases, oxidases, acetilcolinesterases, lectinas, peptídeos, compostos orgânicos de baixa massa molecular como carboidratos, serotonina, histamina, e íons inorgânicos como o cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro, potássio, e os inibidores enzimáticos (STOCKER 1990; MIRANDA et al. 2016). Venenos ofídicos também podem apresentar variações entre famílias, gêneros e espécies e mesmo intraespecíficas, alterando sua composição, geralmente devido a variações sexuais, ontogenéticas, geográficas, sazonais, bem como variações individuais (ARAÚJO 2007).

### 1.3 Grupo *atrox*

O grupo *Bothrops atrox* corresponde a um conjunto de serpentes peçonhentas amplamente distribuídas na região neotropical e que apresentam um complexo padrão de variações morfológicas interespecífico e intraespecífico. Atualmente seus principais representantes são: *B. atrox* Linnaeu, 1758 (região norte da América do sul, Amazônia); *B. leucurus* Wagler, 1824 (costa leste do Brasil); *B. moojeni* Hoge, 1966 (predominante Cerrado); *B. marajoensis* Hoge, 1966 (Ilha de Marajó); *B. asper* Garman, 1883 (América Central e noroeste da América do Sul); *B. isabellae* Sandner Montilla, 1979 (Venezuela); *B. colombienses* Hallowell, 1845 (noroeste da América do Sul); e exemplares insulares do Caribe com a *B. caribbaeus* Garman, 1887 (Ilha de Santa Lúcia) e *B. lanceolatus* Bonnaterre, 1790 (Ilha de Martinica). (NASCIMENTO 2014).

#### 1.3.1 *Bothrops atrox* (Linnaeu, 1758)

Indivíduos da espécie *Bothrops atrox* (comumente conhecida como Comboia ou Jararaca da Amazônia) (Figura 2 A.) são encontrados na região Norte do país, nas áreas de floresta e algumas áreas antropizadas, apresentam dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas podem alcançar até 1,72m de comprimento; enquanto os machos chegam até 1m (CAMPBELL & LAMAR 2004). Possuem hábitos noturnos principalmente, mas podem também ser encontradas durante o dia. Em relação à

alimentação, apresentam variação ontogenética, sendo que os filhotes se alimentam preferencialmente de presas ectotérmicas (anfíbios, répteis e invertebrados), enquanto os adultos consomem presas endotérmicas (pequenos mamíferos) (BERNARDE 2014; CAMPBELL & LAMAR 2004).

#### 1.3.2 *Bothrops leucurus* (Wagler, 1966)

Serpentes da espécie *Bothrops leucurus* (vulgarmente conhecidas como Malha-de-Sapo ou Jararaca do Rabo Branco) (Figura 2 B.) ocorrem comumente nas regiões de Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, podendo atingir normalmente 1,20m de comprimento (BERNARDE 2014). Normalmente, permanecem inativas durante o dia, iniciando suas atividades ao entardecer ou início da noite e apresentam variação na sua alimentação, se alimentando de pequenos anfíbios e lagartos enquanto jovens e quando adultas, se alimentam de roedores principalmente. (BERNARDE 2014; CAMPBELL & LAMAR 2004).

#### 1.3.3 *Bothrops marajoensis* (Hoge, 1966)

Encontrados principalmente na Ilha de Marajó (Figura 2 C.), indivíduos podem também ser encontrados nas regiões costeiras da Amazônia e em partes do Amapá. Possuem hábitos terrestres e podem atingir até 1,50m de comprimento (CAMPBELL et al. 2004) e assim como as demais serpentes do gênero *Bothrops*, possui hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares (FRANÇA; FAN, 1992).

#### 1.3.4 *Bothrops moojeni* (Hoge, 1966)

A espécie *Bothrops moojeni* (popularmente conhecida como Caiçaca ou Jararacão) (Figura. 2 D.), é uma das mais importantes serpentes responsáveis por acidentes ofídicos nas áreas de cerrado em que ocorre, podendo atingir até 1,60m. Normalmente, permanecem inativas durante o dia, iniciando suas atividades ao entardecer ou início da noite. Possuem hábitos generalistas, alimentando-se principalmente de pequenos mamíferos, anfíbios, lagartos e aves. Seus predadores naturais incluem gaviões, garças, emas e gambás. (NOGUEIRA et al. 2003; CAMPBELL & LAMAR 2004). Distribuem-se em áreas de cerrado, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, também sendo encontradas no Nordeste e até mesmo em algumas áreas da região Sul do Brasil. (CAMPBELL et al. 2004)

**Figura 2** – Indivíduos das espécies pertencentes ao Grupo *atrox*.



**Fonte:** Acervo pessoal Sávio Sant'Anna.

*B. atrox* (A.); *B. leucurus* (B.); *B. marajoensis* (C.) e *B. moojeni* (D.).

## 2 OBJETIVOS

- ✓ Caracterizar comparativamente os venenos das espécies de serpentes pertencentes ao “grupo *atrox*”, por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*.
- ✓ Contribuir para o melhor entendimento das variações interespecíficas, bem como da filogenia dentro do complexo que segundo WÜSTER (1996), há uma constante mudança de nomenclatura das espécies no continente americano, em razão de distintas características morfológicas e geográficas.
- ✓ Fornecer subsídios no que se refere ao preparo do soro antibotrópico e sua capacidade de neutralização, uma vez que dentre as espécies que serão estudadas, apenas a *B. moojeni* está presente no “Pool” de venenos para a imunização, enquanto as demais (*B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. atrox*), não estão presentes na formulação, apesar de serem nativas da fauna brasileira e serem responsáveis por parte dos acidentes ofídicos no país.

### 3 METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Foram utilizadas 4 amostras de *pools* de venenos de serpentes, de ambos os sexos e variadas idades das espécies *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni*, sendo 1 *pool* de venenos para cada espécie.

#### 3.1 ANIMAIS

##### 3.1.1 Serpentes

Serpentes de diferentes faixas etárias, machos e fêmeas das espécies *Bothrops atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, são mantidas em cativeiro, no Biotério de Manutenção de Serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, em gaiolas individuais, recebendo água a vontade e alimentação constituída basicamente de roedores, a cada 30 dias (LELOUP,1984). Aproximadamente três semanas após a alimentação são realizadas as extrações de veneno, conforme cronograma estabelecido pelos responsáveis.

##### 3.1.2 Camundongos

Para os ensaios de atividade hemorrágica e letalidade; assim como suas respectivas soroneutralizações; camundongos Swiss, machos pesando de 18 a 22 g provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório e Herpetologia com água e ração *ad libitum* e período de luz de 12 horas durante o andamento dos experimentos. Os ensaios foram realizados segundo as normas determinadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan e sob condições estabelecidas por esta Comissão (Protocolo nº CEUA 5109060919).

## 3.2 VENENOS

### 3.2.1 Obtenção dos venenos

Mensalmente os venenos de grupos de serpentes de uma mesma espécie, foram extraídos e reservados em copo de Becker, mantido em banho de gelo. Posteriormente o material foi centrifugado e armazenado em freezer em temperatura de -20°C até o momento da preparação dos antígenos e das amostras de venenos individuais. As amostras de venenos utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan na forma liofilizada.

## 3.3 Quantificação de proteínas

As análises dos venenos foram realizadas utilizando o método de quantificação de proteínas; seguindo o protocolo estabelecido por Lowry et al. (1951) e modificado por Markwell et al. (1978).

### 3.3.1 Solução A:

Carbonato de sódio 2% (Nuclear-Brasil), hidróxido de sódio 4% (Merck-Brasil), tartarato de sódio 0,16% (Eoibra-Brasil) Lauril sulfato de sódio (SDS) 1% (Sigma-Brasil), água d.d. q.s.p.

### 3.3.2 Solução B:

Sulfato de Cobre 4% (neon-Brasil), água d.d. q.s.p.

### 3.3.3 Solução C:

1 parte de **solução B** + 100 partes de **solução A**.

### 3.3.4 Solução D:

1 parte de solução fenólica (Cell-Brasil) + 1 parte de água.

Inicialmente, foram estabelecidas a Curva Padrão de Albumina bovina (Sigma-USA) e a relação entre valores obtidos nas diferentes concentrações dentro de um

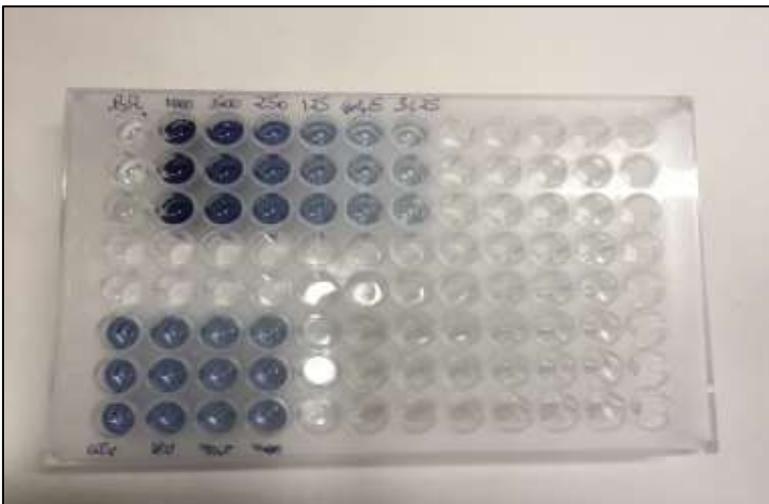
intervalo de 1000 a 31,25  $\mu\text{g}$ , e escolhidas as concentrações dos venenos (em  $\mu\text{g}$ ) a serem usadas nos testes.

Os venenos foram diluídos em solução salina 0,85%, em seguida foram pipetados 50  $\mu\text{l}$  da destas soluções de veneno em uma placa para a realização do experimento (Figura 3). Em seguida foram adicionados 150  $\mu\text{l}$  de solução C (item 2.1.3.) e colocados em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz, logo após, foram adicionados 15  $\mu\text{l}$  da solução D (item 2.1.4.) em cada poço e novamente colocadas em repouso, por 45 minutos.

Ao término do período de incubação, procedeu-se a leitura das absorbâncias a 660nm em Leitor de Placas (SpectraMax i3 – Molecular Devices), utilizando-se como “branco” a amostra na qual o veneno não foi adicionado. A quantidade de proteínas foi expressa em mg de proteína por mg de veneno.

Os testes foram realizados em triplicata e considerados os valores médios entre as amostras como teor proteico final.

**Figura 3** - Quantificação proteica



**Fonte:** autor.

Apresentação do ensaio de dosagem de proteínas com a Curva de Albumina bovina (porção superior da placa) e dos venenos de *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* (porção inferior da placa).

### 3.4 Eletroforese SDS-PAGE

3.4.1 Solução A (Tampão de concentração – pH 6,8 - 0,25 M):

Tris (hidroximetil) amino metano (Nuclear-Brasil), SDS, água d.d. q.s.p.

3.4.2 Solução B (Tampão de separação – pH 8,8 – 0,75 M):

Tris (hidroximetil) amino metano (Nuclear-Brasil), SDS, água d.d. q.s.p.

3.4.3 Solução C (Acrilamida – Bis-acrilamida):

Acrilamida (Sigma USA), bis-acrilamida (Sigma USA), glicerol (Nuclear-Brasil), água d.d. q.s.p.

3.4.4 Tampão de corrida – pH 8,3:

Tris (hidroximetil) amino metano (0,025 M) (Nuclear-Brasil), glicina (0,192 M) (Nuclear-Brasil), SDS (0,1%), água d.d. q.s.p.

3.4.5 Tampão de amostra – 0,0625 M – Tris HCl – pH 6,8:

Solução A, SDS 10%, glicerol, azul de bromofenol, água d.d. q.s.p.,  $\beta$ -mercaptoetanol (Merck-Brasil)

3.4.6 Solução Corante:

Etanol (Merck-Brasil), ácido acético (Synth-Brasil), água d.d. q.s.p., corante Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck-Brasil)

3.4.7 Solução descorante:

Etanol (Merck-Brasil), ácido acético (Synth-Brasil), água d.d. q.s.p., formaldeído (Nuclear-Brasil).

A técnica de eletroforese em SDS-PAGE foi realizada conforme Laemmli (1970). Os géis foram preparados em gradiente de 12,5% para o gel de separação e 4% para o gel de concentração. Foi utilizado o equipamento da marca Amerschan Bioscience; cuba e placas, e fonte da marca Pharmacia Biotech; sendo a última padronizada com voltagem de 200V e miliamperagem fixada em 150mA. (Figura. 4) Foram aplicados 20  $\mu$ L (na proporção de 1,0 mg/mL - em solução salina 0,85%) com adição de 5 $\mu$ L de tampão de amostra com  $\beta$ -mercaptoetanol, de cada uma das amostras de veneno por poço, conforme descrito acima. Em seguida o material foi

homogeneizado e centrifugado por 5 minutos. Após este processo, as amostras foram colocadas em banho seco por mais 5 minutos.

Ao final da corrida, o gel foi submerso em solução corante de Comassie B. Blue, por no mínimo 3 horas e logo após foram colocados em solução descorante, para que as bandas de proteínas pudessem ser visualizadas em suas respectivas *lines*, e por fim, submersos em água para serem hidratados e documentados.

Após estes processos, o gel foi escaneado, e assim, feita a análise densitométrica dos perfis de cada amostra de veneno ofídico, com o uso do programa digital Gel Analyzer.

**Figura 4** - Ensaio de eletroforese



**Fonte:** autor.

Apresentação do equipamento utilizado nos experimentos de eletroforese e eletroforese em SDS-PAGE com a cuba pequena ligada à fonte de energia.

### **3.5 Atividade gelatinolítica (Zimografia)**

A técnica de zimografia tem como princípio a utilização da metodologia de eletroforese conforme Heussen & Dowdle (1980), possibilitando a análise qualitativa da atividade proteolítica dos venenos em estudo.

Os géis foram preparados na concentração 12% e copolimerizados com 20 mg de gelatina. Após o final de cada corrida, os géis foram lavados três vezes por 20 minutos, com tampão de lavagem I (Tris (hidroximetil) amino metano, Triton X-100 2,5% e Água destilada) e por fim incubados por 24 horas em tampão de ativação (Tris (hidroximetil) amino metano 50 mM, Cloreto de Cálcio, Cloreto de Sódio e Água destilada) a temperatura de 37°C. Após este período de incubação, cada gel foi

corado com Comassie B. Blue por no mínimo três horas e posteriormente descorado.

### **3.6 Atividade proteolítica sobre caseína**

A atividade proteolítica sobre a caseína é determinada através do método de LOMONTE & GUTIÉRREZ (1983), em que 1 mL de cada uma das amostras de veneno foi adicionado a uma solução de 10 caseína à 1% e a mistura incubada por 30 minutos, em temperatura de 37°C. Posteriormente a reação foi interrompida pela da adição de 3 mL ácido tricloroacético 5%. Em seguida os tubos, centrifugados por 10 minutos, a 4000 rpm em temperatura ambiente, e as absorbâncias dos sobrenadantes lidas em Leitor de Placas (SpectraMax) em densidade óptica de 280 nm. A atividade caseinolítica foi expressa em U/mg de veneno, obtida pela seguinte fórmula:  $U/mg = A_{280} \times 100 / mg \text{ de veneno}$ .

### **3.7 Dose mínima coagulante sobre o plasma (DMC-P)**

O teste de atividade coagulante determina a Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma (DMC-P), que corresponde a menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução de plasma equino citratado em 60 segundos a 37°C.

As amostras dos venenos foram diluídas em salina 0,85%, em concentrações decrescentes (1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg, 31,2 µg, 15,6 µg, 7,8 µg e 3,9 µg). O ensaio consiste em adicionar 100 µl de solução de veneno em 200 µl de plasma equino citratado. O tempo de coagulação (TC) foi verificado através do fibrômetro BBL® FibroSystem® (Figura 5) e os valores da DMC-P obtidos através de análise de regressão linear do “tempo de coagulação” sobre a “quantidade de veneno”. Todas as amostras foram testadas em triplicata, como descrito por Theakston & Reid (1983).

**Figura 5 - Fibrômetro**



**Fonte:** autor

Apresentação do equipamento utilizado para determinação dos tempos de coagulação.

### **3.8 Atividade hemorrágica**

Grupos de 5 camundongos foram inoculados via intradérmica (i.d.), na região ventral, com 5,0  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  (média das DMH conforme Assakura et al. (1992) e Sanchez et al. (1992)) de cada uma das amostras de veneno (*B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni*), com uma repetição, totalizando 10 animais por espécie. Após o período de observação de 3 horas, os animais foram eutanasiados com o uso de uma câmara de  $\text{CO}_2$  em concentrações crescentes do gás, e a pele das regiões inoculadas, removidas e examinadas em placa de vidro. Com auxílio de transluminador foram medidos os diâmetros das áreas hemorrágicas conforme Kondo et al. (1960), modificado por Gutiérrez et al. (1985).

### **3.9 Neutralização da Atividade hemorrágica**

Grupos de 5 camundongos foram inoculados via intradérmica (i.d.), na região ventral, com uma solução contendo 25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  (sendo esta a dose desafio igual DMH x5), de cada uma das amostras de veneno (*B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* - com uma repetição, totalizando 10 animais por espécie) incubadas com o soro antibotrópico por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após o período de observação de 3 horas, os animais foram eutanasiados com o uso de uma câmara de  $\text{CO}_2$  em concentrações crescentes do gás, e a pele das regiões inoculadas, removidas e examinadas em placa de vidro. Com auxílio de

transluminador foram medidos os diâmetros das áreas hemorrágicas conforme Kondo et al. (1960) modificado por Gutiérrez et al. (1985).

### **3.10 Letalidade**

Grupos de 5 camundongos foram inoculados, pela via intraperitoneal (i.p.), com uma única dose (115 µg/0,5 mL por animal = média das DL50 conforme Furtado et al. (1991), Assakura et al. (1992) e Sanchez et al. (1992)) dos venenos de cada uma das espécies de serpentes que serão estudadas (*B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* - com uma repetição, totalizando 10 animais por espécie) e o número de animais mortos, o tempo de óbito e o comportamento dos animais foi observado em 24 e 48 horas. Seguindo protocolo estipulado por DEL-REI et al. (2019).

### **3.11 Neutralização da letalidade**

Grupos de 5 camundongos foram inoculados, por via intraperitoneal (i.p.) com os venenos das espécies estudadas (*B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* - com uma repetição, totalizando 10 animais por espécie) (dose desafio igual a DL50 x5) pré incubados com o antiveneno por 30 minutos, em temperatura de 37°C. Os resultados foram avaliados pela capacidade de neutralização do antiveneno, levando em consideração o número de animais vivos após 48 horas da inoculação.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Teor proteico:**

Os resultados obtidos em relação ao teor proteico dos quatro diferentes venenos, mostraram valores de conteúdo total aproximado de até 1,1 mg de proteína/mg de peso seco (Tabela 1.).

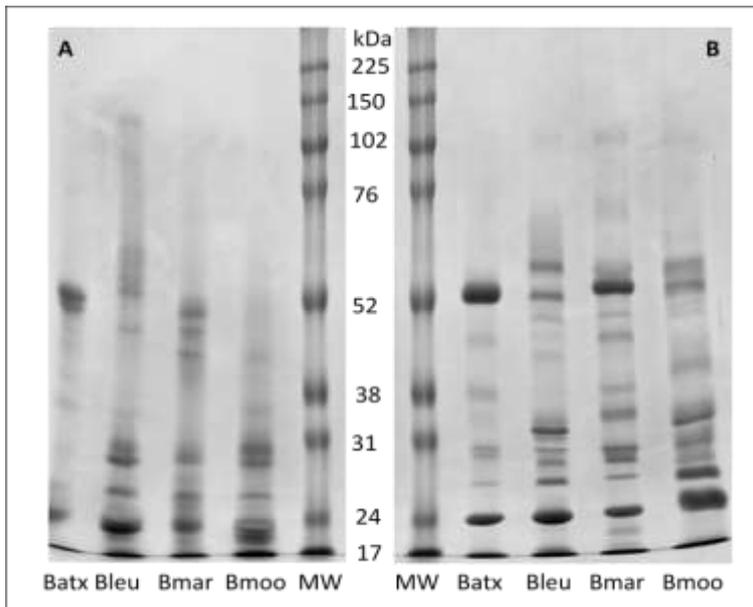
**Tabela 1** - Teor proteico (mg de proteína/mg de veneno seco) das amostras dos venenos das serpentes em estudo.

Conteúdo proteico		
Grupo <i>atrox</i>		
Espécies	Média (mg/mg de peso seco)	± SD
<i>B. atrox</i>	0,5	0,01
<i>B. leucurus</i>	1,0	0,02
<i>B. marajoensis</i>	1,1	0,02
<i>B. moojeni</i>	1,1	0,04

#### 4.2 Eletroforese em SDS-PAGE

A análise dos perfis eletroforéticos dos venenos de *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* mostrou haver um padrão comum de distribuição das proteínas com algumas regiões mais destacadas pela presença de bandas majoritárias: na região de massa molecular de 24 kDa e 17 kDa para todas as amostras, na região de 31 kDa para *B. leucurus* e *B. moojeni*; na região de 52 kDa para *B. atrox* e *B. marajoensis*. (Figura. 6)

**Figura 6** - Gel de eletroforese

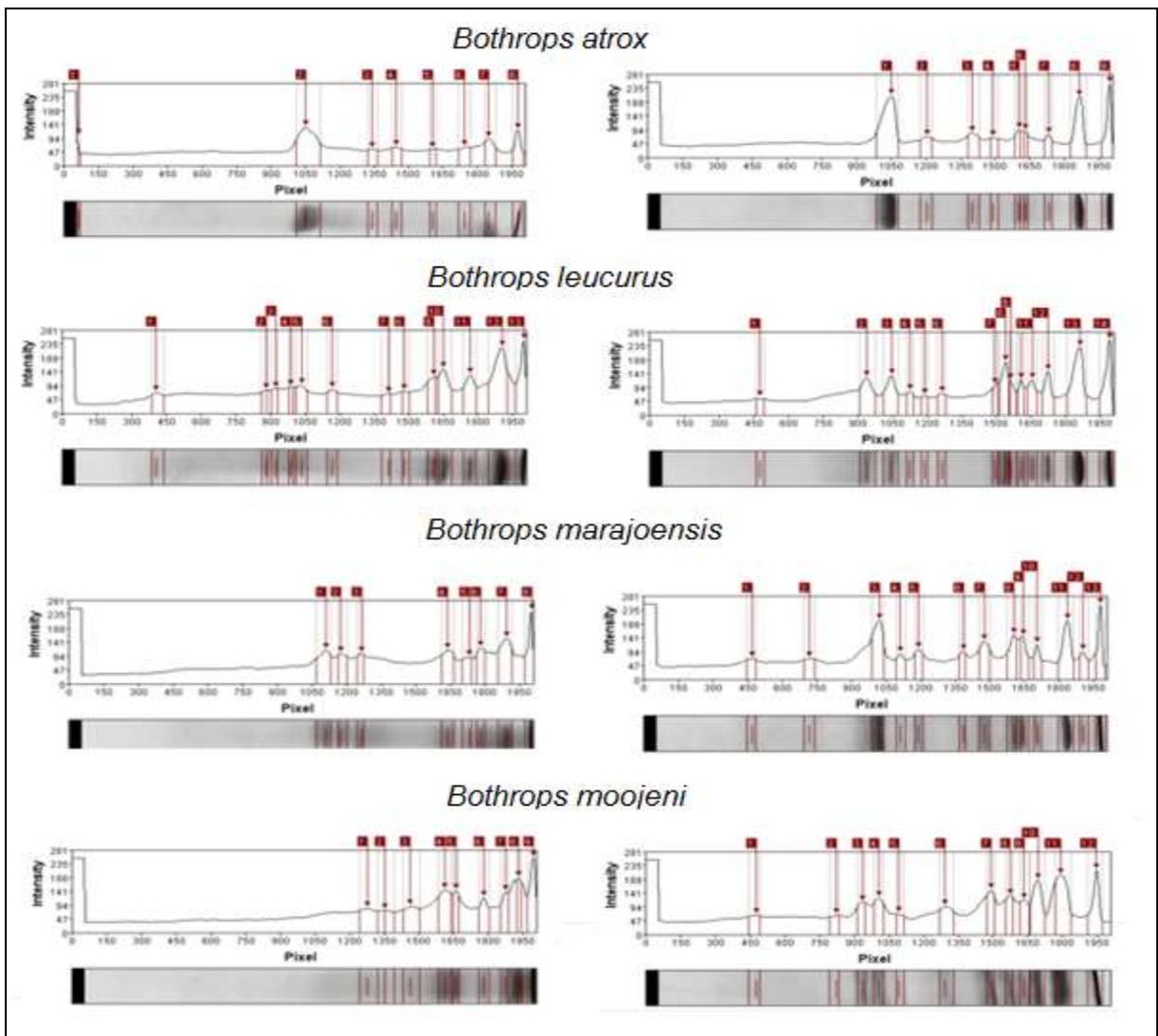


**Fonte:** autor

Perfis eletroforéticos das amostras não reduzidas (A) e reduzidas (B) dos venenos de *B. atrox* (*Batx*), *B. leucurus* (*Bleu*), *B. marajoensis* (*Bmar*) e *B. moojeni* (*Bmoo*). **MW:** Molecular Weight = Padrão Peso Molecular.

A análise dos perfis densitométricos possibilita a melhor quantificação das bandas proteicas, também devido ao uso do  $\beta$ -mercaptoetanol, e indica que as amostras possuem algumas bandas semelhantes entre si, tanto nas amostras reduzidas quanto as não reduzidas, na região de baixa massa molecular e de massa intermediária também. (Figura. 7). Os resultados mostraram que os venenos em estudo apresentaram número total de bandas de proteínas entre 8 e 13, além de variações importantes nas concentradas das mesas nas diferentes regiões.

**Figura 7** - Perfis densitométricos



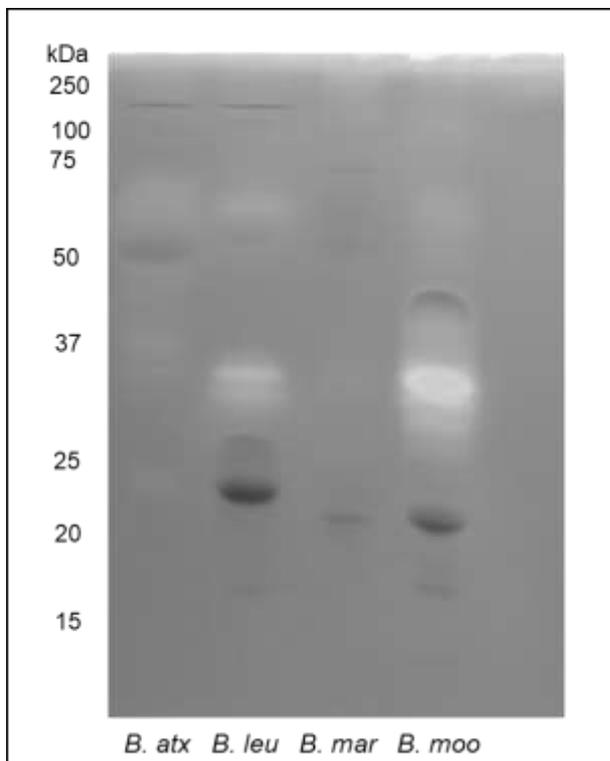
Fonte: autor

Perfis densitométricos dos venenos de *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni*; não reduzidos (esquerda) e reduzidos com adição de  $\beta$ -mercaptoetanol (direita)

### 4.3 Atividade gelatinolítica (Zimografia)

Com uso da técnica de zimografia em SDS-PAGE foi possível observar a presença e ação de enzimas proteolíticas nos venenos de *B. leucurus* e *B. moojeni*, sobre o substrato gelatina, com ação mais concentrada na região de massa molecular entre 37.0 kDa até 25.0 kDa, enquanto o veneno de *B. atrox* apresentou menor ação enzimática, na região de massa molecular de 75.0 kDa seguindo até a região de 50.0 kDa. E em contra partida, o veneno de *B. marajoensis* demonstrou atividade enzimática nula sobre o substrato (Figura. 8).

**Figura 8** - Gel de zimografia



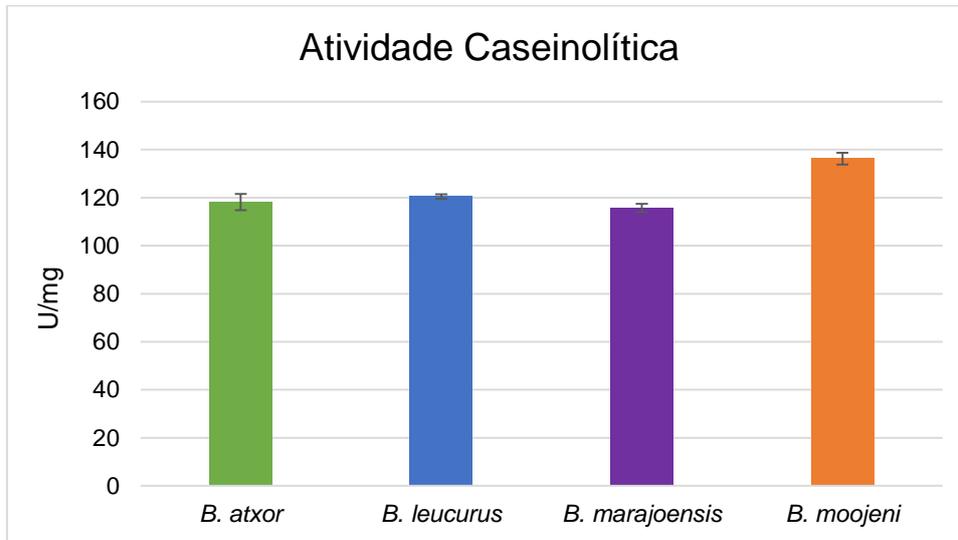
**Fonte:** autor

Atividade proteolítica dos venenos de *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* sobre o substrato gelatina.

### 4.4 Atividade proteolítica sobre caseína

Os venenos estudados apresentaram ação proteolítica sobre o substrato caseína, com valores de 118,16 – 120,5 – 115,75 - 137,5 U/mg para *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* respectivamente. Sendo o veneno de *B. moojeni* o de maior atividade, enquanto os demais apresentaram valores semelhantes (Figura. 9).

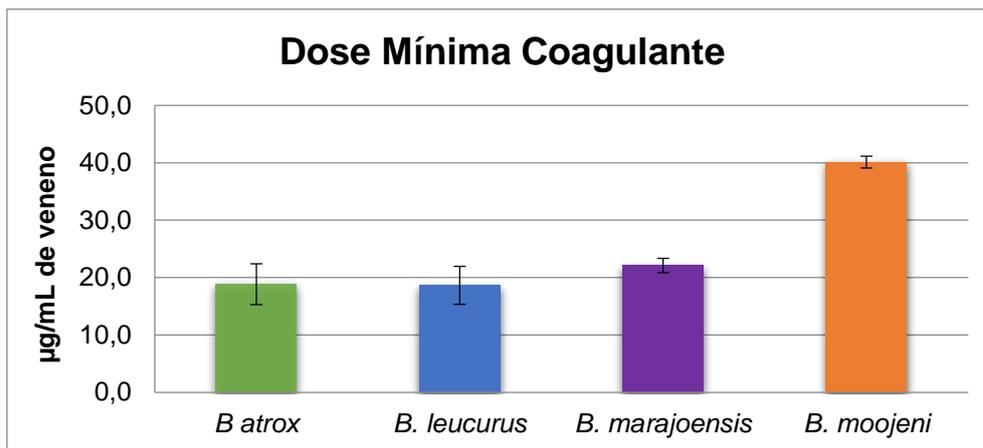
**Figura 9** - Gráfico de atividade caseinolítica.



#### 4.5 Dose mínima coagulante sobre o plasma (DMC-P)

O ensaio que testa a ação coagulante dos venenos mostrou que as amostras de *B. moojeni* foram as menos ativas quando comparadas com as demais amostras de veneno, com DMC-P média de 40,1  $\mu\text{g/mL}$ , que apresentaram valores de aproximadamente duas vezes menor (Figura. 9).

**Figura 10** - Gráfico da atividade coagulante sobre o plasma equino citratado com o erro padrão.

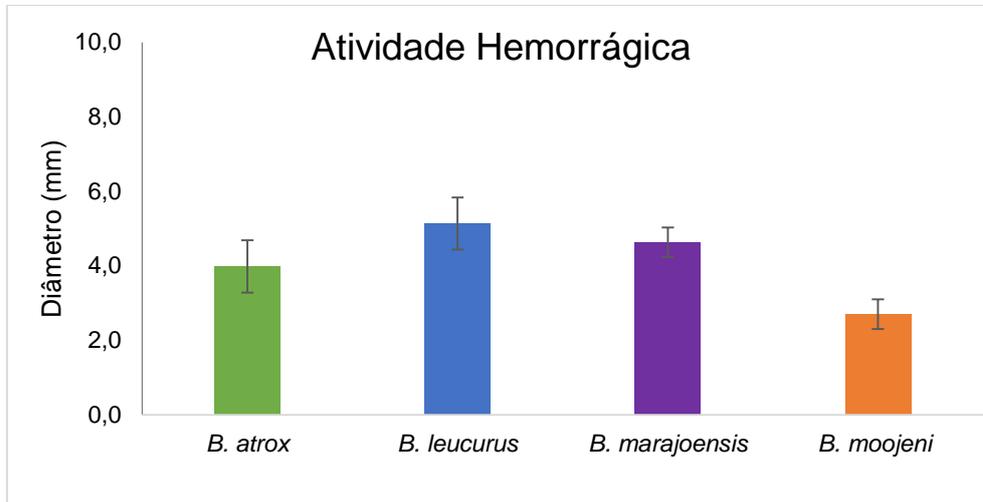


#### 4.6 Atividade hemorrágica

Os venenos de *B. leucurus* e *B. marajoensis* expressaram maior atividade hemorrágica, pois foram capazes de causar uma lesão hemorrágica de até 5 mm de diâmetro, enquanto os venenos de *B. atrox* e *B. moojeni* formaram halos

hemorrágicos de 4 mm e 3 mm de diâmetro, respectivamente, utilizando as mesma dose de veneno para todos os animais (Figura. 11).

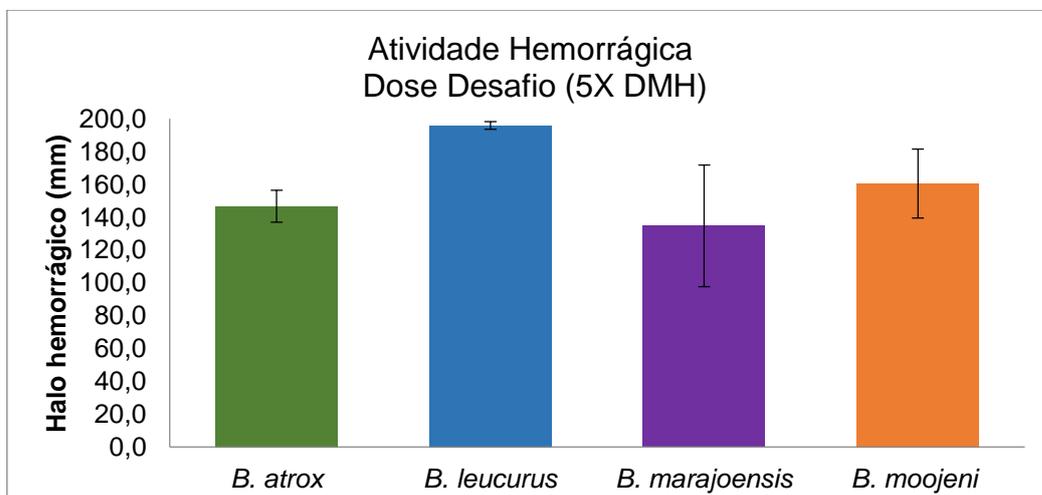
**Figura 11** - Gráfico de atividade hemorrágica.

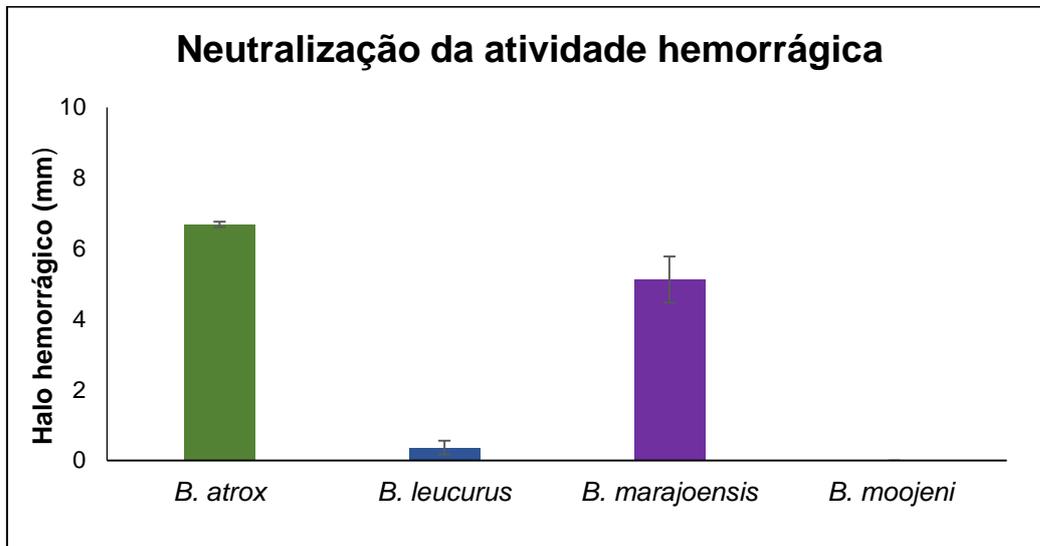


#### 4.7 Soroneutralização da atividade hemorrágica

A o soro antibotrópico comercial, foi capaz de neutralizar a ação hemorrágica dos venenos, em média 99,63% para o veneno de *B. leucurus*; 97% e 95% para os venenos de *B. marajoensis* e *B. atrox*, respectivamente (Figura. 13); enquanto o veneno de *B. moojeni* foi completamente neutralizado pela ação do antiveneno, quando comparado com o grupo controle, que recebeu a mesma dose de veneno/animal, porém sem a adição do soro (Figura. 12) (Tabela. 2).

**Figura 12** -Gráfico de atividade hemorrágica do grupo controle.



**Figura 13** - Gráfico de neutralização da atividade hemorrágica**Tabela 2**- Diâmetro dos halos hemorrágicos (mm)

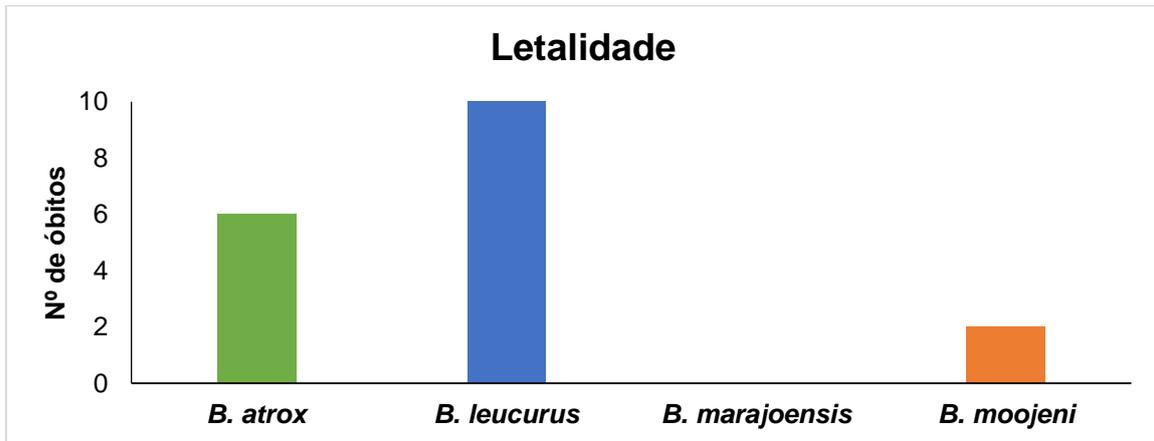
	<i>B. atrox</i>	<i>B. leucurus</i>	<i>B. marajoensis</i>	<i>B. moojeni</i>
<b>Média</b>	6,7	0,4	5,1	0,0
<b>±EP</b>	0,1	0,2	0,7	0,0
<b>% Neutralização</b>	<b>93,0%</b>	<b>99,8%</b>	<b>97,5%</b>	<b>100%</b>

#### 4.8 Letalidade

De acordo com a literatura cada um dos venenos das espécies em estudo apresentam valores de DL50 diferentes, procurando utilizar um único parâmetro, foi estabelecida a concentração de 115,0 µg/animal para todas as amostras de venenos, possibilitando assim uma análise comparativa da letalidade entre eles.

Os resultados mostraram que quando utilizada uma mesma dose de veneno, *B. leucurus* foi mais letal, enquanto *B. atrox* e *B. moojeni* apresentaram resultados 2x e 3x menores, respectivamente. *Bothrops marajoensis* não apresentou atividade letal nesta mesma concentração estipulada (Figura. 14).

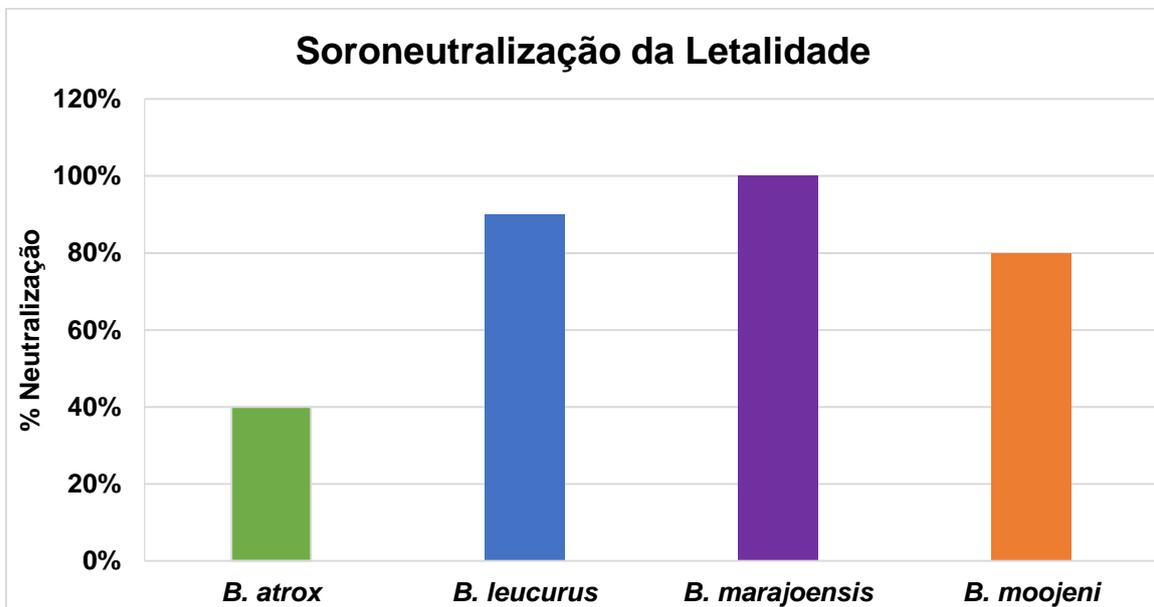
**Figura 14** - Número de óbitos ao inocular 115,0 µg de veneno/animal.



#### 4.9 Soroneutralização da letalidade

Quando incubados os venenos em concentração de 575 µg com adição de 115 µL de soro, após 48 horas da inoculação, pôde-se observar que o veneno de *B. atrox* foi o menos reconhecido de todos, enquanto o veneno de *B. marajoensis* foi o mais reconhecido pelo soro antitoxinático. (Figura 15.).

**Figura 15** - Gráfico de neutralização da atividade hemorrágica



## 5 DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes são misturas complexas constituídas, em grande parte, de proteínas enzimáticas ou não; somando aproximadamente 90% do peso seco do veneno; como as fosfolipases, proteases, oxidases, acetilcolinesterases, lectinas, peptídeos, compostos orgânicos de baixa massa molecular como carboidratos, serotonina, histamina, e íons inorgânicos como o cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro, potássio, e os inibidores enzimáticos (STOCKER 1990; MIRANDA et al. 2016), contudo, podem ocorrer variações em sua composição e também nas atividades biológicas desencadeadas pelos mesmos. Há uma relação entre a composição dos venenos e o tipo de dieta que determinada espécie possa ter (GANS & ELLIOT 1968; KOCHVA 1987). Os venenos de serpentes apresentam grande variabilidade entre si, como: sexual, ontogenética, geográfica, interfamiliar, intergênero, inter e intraespecífica (CHIPPAUX et al. 1991).

O gênero *Bothrops* apresenta grande diversidade de espécies, muitas delas demonstrando variações ontogenéticas em suas alimentações (MARTINS et al. 2002). Estudos filogenéticos tem constantemente mostrado grupos de espécies, como os grupos *alternatus* e *neuwiedi* (presentes em locais de vegetação aberta), *atrox*, *jararaca* e *jararacussu* (encontrados em zonas de vegetação densa), sendo categorizados como monofiléticos (MARTINS et al. 2002; CAMPBELL et al. 2004).

De acordo com FURTADO et al. (1991), os venenos do gênero *Bothrops* foram padronizados a aproximadamente 1,0 mg de proteína por 1 mg de veneno seco e neste trabalho, os venenos estudados estão com valores próximos a este padrão, com exceção da amostra de *B. atrox*, que apresentou valor inferior ao indicado.

A eletroforese é uma técnica que possibilita maior visualização dos padrões de distribuição de proteínas dos venenos, conseqüentemente, permitindo a identificação e separação de seus componentes (VILARINHO 2018). A análise dos perfis eletroforéticos demonstrou que houve um padrão comum de distribuição das proteínas com algumas regiões mais destacadas pela presença de bandas majoritárias: na região de massa molecular de 24 kDa e 17 kDa para todas as amostras, na região de 31 kDa para *B. leucurus* e *B. moojeni*; na região de 52 kDa para *B. atrox* e *B. marajoensis*. PEREIRA (2016) identificou bandas proteicas, ao analisar o veneno de *B. leucurus*, nas regiões de massa molecular de 75 kDa até 50 kDa e 25 kDa até 20 kDa, corroborando com os achados neste estudo, enquanto LÓPEZ-LOZANO et al. (2002) em seus estudos com *B. atrox*, mostraram bandas

majoritárias nas regiões de massa molecular de 67 kDa até 43 kDa e também entre 30 kDa e 20 kDa, estando de acordo com os achados por SALAZAR et al. (2012), que foram capazes de visualizar bandas majoritárias nas regiões de 50 kDa até 45 kDa e 27 kDa até 20 kDa nos venenos de *B. atrox*, além disso, também verificou alta atividade coagulante deste veneno sobre o plasma.

A atividade gelatinolítica foi avaliada através da técnica de zimografia em gel de SDS-PAGE, possibilitando a identificação de enzimas que tem a capacidade de digestão do substrato. LUCAS (2013) demonstrou ação enzimática do veneno de *B. moojeni* na região de aproximadamente 30 kDa, como o obtido neste trabalho. MENEZES et al. (2006) aponta que os venenos de *B. jararaca* apresentam atividade enzimática nas regiões de 68 kDa até 43 kDa e na região de 24 kDa, áreas próximas de onde ocorreu a ação gelatinolítica dos venenos de *B. atrox*; *B. leucurus* e *B. moojeni*.

As toxinas dos venenos de viperídeos, sobretudo dos venenos botrópicos, têm comumente ação sobre os processos hemostáticos. Esses venenos apresentam componentes capazes de atuar sobre os diversos fatores da coagulação sanguínea (KAMIGUTI et al. 1986). De acordo com CARDOSO et al.(2003) é típico dos acidentes botrópicos a alteração no tempo de coagulação sanguínea e também o quadro de incoagulabilidade. Os resultados obtidos em relação a atividade coagulante mostraram que todos os venenos foram capazes de coagular o plasma em 60 segundos, porém as amostras de veneno de *B. moojeni* apresentaram maior DMC-P, enquanto os venenos de *B. atrox* e *B. moojeni* mantiveram-se com valores mais próximos entre si, se mostrando mais ativos com DMC-P média de 18,9 e 18,7 µg/mL de veneno. FURTADO et al.(1991), testaram a atividade coagulante de nove serpentes do gênero *Bothrops* com resultados de mostrando variações importantes desta atividade.

Os venenos botrópicos capazes de desencadear um processo inflamatório e hemorrágico importantes devido à presença de proteases. TORRES-HUACO et al. (2010) mostrou que o veneno de *B. marajoensis* tem baixa atividade hemorrágica, ao testar em camundongos em diferentes concentrações. Utilizando uma concentração mediana (das DMH descritas na literatura) e apesar destas não produzirem resultados abaixo de 10mm de diâmetro dos halos hemorrágicos, os venenos de *B. atrox*, *B. leucurus* e *B. marajoensis* expressaram maior atividade hemorrágica utilizando uma única concentração, pois foram capazes de causar uma

lesão hemorrágica de até 5 mm de diâmetro, enquanto o veneno de *B. moojeni* gerou halos hemorrágicos duas vezes menores.

Conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010) para os testes de neutralização das atividades biológicas de venenos são utilizadas as “doses desafio” que normalmente correspondem a cinco vezes aquela concentração ou dose determinadas anteriormente pela “Dose Mínima” ou pela “Dose Mediana”, desta forma, quando utilizada a concentração de 5x aquela estipulada para os testes de hemorragia, foi observado que de um modo geral, os venenos não apresentaram diferenças significativas quando inoculadas grandes concentrações de venenos.

A letalidade dos venenos ofídicos é decorrente da ação sinérgica das toxinas neles presentes (FURTADO et al. 1991) e os efeitos podem variar de espécie para espécie (CHIPPAUX et al. 1991). Os dados gerados aqui, mostraram que a letalidade decorrente dos venenos de *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* é muito variável e principalmente quando utilizada uma mesma concentração de veneno.

O antiveneno ou soro antiofídico é o único medicamento capaz de neutralizar as atividades enzimáticas e biológicas dos venenos de serpentes (CAMEY et al. 2002). Procurando avaliar comparativamente a capacidade de neutralização dos venenos pelo antiveneno botrópico e a atividade hemorrágica foi neutralizada em mais de 90%, utilizando dose de 25 µg de veneno incubados com 5 µL de Soro Antibotrópico (SAB), corroborando com os achados de SOUSA et al.(2013), que foram capazes de neutralizar mais de 50% desta atividade ao utilizar a concentração de 1mL SAB/5 mg de veneno de *B. atrox*. Ao testar a capacidade de soroneutralização da letalidade somente obtive resultados positivos após dobrar a proporção de 1 mL SAB/5 mg de veneno para 2 mL de SAB/5 mg de veneno, utilizando uma dose de 225 µg de veneno por animal. Em nosso estudo, utilizando a dose de 575 µg de veneno na proporção de 1mL/5 mg a neutralização da letalidade (em um grupo e 10 animais para cada amostra) foi de 80 a 100% para os venenos de *B. moojeni*, *B. leucurus* e *B. marajoensis* enquanto o veneno de *B. atrox* foi o que apresentou o maior número de óbitos, mostrando que o SAB não foi capaz de neutralizar completamente as ações sistêmicas do envenenamento experimental.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo de algumas análises bioquímicas e biológicas dos venenos de *Bothrops atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* observamos que existem variações importantes nas diferentes atividades testadas,

influenciando direta ou indiretamente na biologia dos animais, mas ainda assim reforçando a monofilia do grupo à qual estas serpentes pertencem. Talvez estas variações não reflitam drasticamente no prognóstico e na fisiopatologia dos envenenamentos, onde estas espécies são os agentes etiológicos, certamente estudos mais aprofundados versando sobre a variabilidade dos mesmos, serão de grande importância para a pesquisa e conseqüentemente para saúde pública, uma vez que somente o veneno de *B. moojeni* faz parte da composição do “pool” de imunização para produção do Soro Antibotrópico.

## 6 CONCLUSÕES

As espécies de serpentes *B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* compõe o “grupo *atrox*” devido aos seus caracteres filogenéticos que as unem. E os venenos de um modo geral, apresentem componentes comuns com variações dos padrões bioquímicos e efeitos biológicos dependentes do hábito e habitat de cada uma, contudo e ainda assim, o antiveneno botrópico é eficaz na neutralização de suas ações.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, Afrânio do. **Serpentes do Brasil: iconografia colorida: a colour iconography**. Melhoramentos, 1978.
- ARAÚJO, A.S. **Produção de antiveneno bothrópico em ovos de galinha**. Dissertação de mestrado em Ciência animal – Escola de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Mg: 2007.
- ASSAKURA, Marina T.; FURTADO, Maria de Fátima; MANDELBAUM, Fajga R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 727-732, 1992.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Ofidismo: Análise Epidemiológica**. Brasília, 1991.
- BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde. 1998.
- BERNARDE, P. S. **SERPENTES PEÇONHENTAS E ACIDENTES OFÍDICOS NO BRASIL**. 1ª. Edição. Curitiba - PR: Anolis Books, 2014.

BÉRNILS, R. S. & Costa, H. C. 2015. Répteis Brasileiros: Lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira** 4(3): 75- 93

CAMEY, Kyoko U.; VELARDE, David T.; SANCHEZ, Eladio F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 501-509, 2002.

CAMPBELL, Jonathan A. et al. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca [NY]: Comstock Pub. Associates, 2004.

CARDOSO, João Luiz Costa et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2003.

CHIPPAUX, Jean-Philippe; WILLIAMS, Vaughn; WHITE, Julian. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

DEL-REI, Tiago H. Moretto et al. Functional variability of Bothrops atrox venoms from three distinct areas across the Brazilian Amazon and consequences for human envenomings. **Toxicon**, v. 164, p. 61-70, 2019.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **ANVISA**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Página inicial. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia> />. Acesso em: 20 de set. de 2019.

FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. Acidente botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1992.

FURTADO, Maria de Fátima D et al. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 219-226, 1991.

FURTADO, Maria de Fátima D.; COLLETTI, G. M. D. D.; SILVA, Wilmar Dias da. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero Bothrops e Crotalus usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 53, n. 2, p. 149-59, 1991.

GANS, Carl; ELLIOTT, WILLARD B. Snake venoms: production, injection, action. In: **Advances in oral biology**. Elsevier, 1968. p. 45-81.

GOMES, N. M. B. et al. Atlas anatomico de boa constrictor linnaeus, 1758 (serpente, boidae). **Monografias do Instituto Butantan**, n. 2, p. 1-59, 1989.

GOPALARISHNAKONE, P. Structure of the sublingual salivary gland of the reticulated python, Python reticulatus. **The Snake**, v. 23, p. 19-24, 1991.

GUTIÉRREZ, JoséMaría et al. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.

HEUSSEN, Christa; DOWDLE, Eugene B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 196-202, 1980.

KAMIGUTI, A. S.; SILVA, M. V.; CARDOSO, J. L. C. Desfibrinação do sangue no envenenamento acidental por serpentes Bothrops jararaca filhotes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 19, n. suppl., p. 28, 1986.

KOCHVA, Elazar. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65-106, 1987.

KONDO, Hisashi et al. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 13, n. 1-2, p. 43-51, 1960.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LELOUP, P. 1984. Maintenance and Reproduction of Reptiles in Captivity. **Acta Zool Pathol Antverp.** 78(4): 177-198.

LEMA, Thales. Cobras não venenosas que matam. **Natureza em Revista**, v. 4, p. 38-46, 1978.

LOBO, L. M. et al. Análise comparativa dos diferentes tipos de dentição em serpentes. **ActaTecnológica**, v. 9, n. 2.

LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José María. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. **Revista de Biología Tropical**, v. 31, n. 1, p. 37-40, 1983.

LÓPEZ-LOZANO, Jorge Luis et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild Bothrops atrox specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 997-1006, 2002.

LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARKWELL, Mary Ann K. et al. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 206-210, 1978.

MARTINS, MARCIO; MARQUES, OTÁVIO AV; SAZIMA, I. V. A. N. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus Bothrops. **Biology of the Vipers**, v. 307, p. 328, 2002.

MELGAREJO, A. R., 2009. **Serpentes peçonhentas do Brasil**. In: CARDOSO, J.L.C., França, F. O. S., Wen, F.H., Málaque, C.M. S., Haddad, JR. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 42-70.

MENEZES, Milene C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304-312, 2006.

MIRANDA, Cíntia Alvarenga Santos Fraga de et al. Clotting and fibrinogenolysis inhibition by essential oils from species of the Asteraceae family. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

NASCIMENTO, Diogo dos Santos. Filogenia molecular de serpentes neotropicais do grupo Bothrops atrox (Linnaeus, 1758)(Viperidae: Crotalinae). 2014.

NOGUEIRA, Cristiano; SAWAYA, Ricardo J.; MARTINS, Marcio. Ecology of the pitviper, Bothrops moojeni, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 4, p. 653-659, 2003.

PEREIRA, Diego dos Santos. Variação sexual e ontogenética do veneno de Bothrops leucurus (Wagler, 1824)(Serpentes: Viperidae). 2016.

SALAZAR, Ana Maria et al. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (Bothrops atrox) from different geographical areas in Venezuela. **Thrombosis research**, v. 120, n. 1, p. 95-104, 2007.

SANCHEZ, E. F. et al. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95-103, 1992.

SOUSA, Leijiane F. et al. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of Bothrops complex. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 9, 2013.

STOCKER, K. F. Composition of snake venoms. **Medical use of snake venom proteins**, p. 33-56, 1990.

SWAROOP, Sitya; GRAB, B. Snakebite mortality in the world. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 10, n. 1, p. 35, 1954.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the world health organization**, v. 61, n. 6, p. 949, 1983.

TORRES-HUACO, Frank Denis et al. Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from Bothrops marajoensis snake venom. **The protein journal**, v. 29, n. 6, p. 407-416, 2010.

Uetz, Peter; Freed, Paul; Hošek, Jirí. **The Reptile Database**. Disponível em <http://www.reptil-database.org/>. Acessado em 28/08/2019.

VILARINHO, Ar. R. G., 2017; Dimorfismo sexual e variação ontogenética dos venenos de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron&Duméril, 1854 Serpentes, Viperidae.

WERMANN, S. D. Hypotheses on the historical biogeography of bothropoid pitvipers and related genera of the Neotropics. **Ecology and evolution in the tropics: a herpetological perspective**, p. 306-365, 2005.

WÜSTER, Wolfgang; GOLAY, Philippe; WARRELL, David A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. **Toxicon**, v. 35, n. 3, p. 319-340, 1997.

WÜSTER, Wolfgang; GOLAY, Philippe; WARRELL, David A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, No. 2. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 299-307, 1998.

WÜSTER, Wolfgang. El aparato venenoso de las serpientes. Evolución de los venenos. In: **PATÍÑO, RO; MEJIA, RA; GARCIA, ME Primer Simposio Colombiano de Toxicología. Toxinas y envenenamientos por animales, plantas y microorganismos. Medellín: Editorial Ecográficas Ltda. 1988. p. 27-34.**