

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

Análise da variação sexual e ontogenética de venenos da espécie
***Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854.**
(Serpentes, Viperidae)

Ariel Rodrigues Gomes Vilarinho

São Paulo
2019

Ariel Rodrigues Gomes Vilarinho

**Análise da variação sexual e ontogenética de venenos da espécie
Bothrops alternatus Duméril, Bibron & Duméril, 1854.
(Serpentes, Viperidae)**

Monografia de Conclusão do Curso de Especialização
Toxinas de Interesse em Saúde do Instituto Butantan, sob
orientação de Dra. Marisa Maria Teixeira da Rocha

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Vilarinho, Ariel Rodrigues Gomes

Análise da variação sexual e ontogenética de venenos da espécie *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854. (Serpentes, Viperidae) / Ariel Rodrigues Gomes Vilarinho; orientador Dra. Marisa Maria Teixeira da Rocha; – São Paulo, 2019.

31 p.: 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. Assunto. I.Rocha, Marisa Maria Teixeira da. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

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

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Ariel Rodrigues Gomes Vilarinho, aluno(a) do curso 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
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 15 de março de 2019

Ariel R. Gomes Vilarinho
aluno(a)

De acordo: [Assinatura]
Orientador(a):

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Rogério e Tatiana, pois sem eles nada disso seria possível, além de todo apoio e incentivo desde o início dessa “pequena jornada”;

A minha orientadora Dra. Marisa Maria Teixeira da Rocha, que se propôs a me orientar na elaboração desse estudo. Sou grato pela paciência que teve comigo durante todo esse tempo, inclusive todos os ensinamentos, as conversas, as pequenas broncas e todo apoio para que esse trabalho “saísse”! ;

A coordenadora do Curso de Toxinas de Interesse em Saúde, Dra. Sônia Aparecida de Andrade;

A Dra. Kathleen Fernandes Grego, chefe do Laboratório de Herpetologia, por ter permitido o desenvolvimento deste estudo no laboratório;

A Dra. Silvia Regina Travaglia do Museu Biológico, que cedeu algumas fotos de espécimes de *Bothrops alternatus* para este trabalho e também por realizar as extrações dos venenos das serpentes e doar as amostras.

Ao Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP (CEFOR);

Ao Instituto Butantan, onde foi possível eu realizar esse trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Acidentes ofídicos no Brasil.....	1
1.3 Venenos de serpentes.....	1
1.3 Espécie <i>Bothrops alternatus</i> Duméril, Bibron & Duméril, 1854.....	3
2 OBJETIVO.....	4
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
3.1 Materiais.....	4
3.1.1 Venenos.....	4
3.1.2 Animais.....	5
3.2 Métodos.....	5
3.2.1 Caracterização Bioquímica e Biológica.....	5
3.2.1.1 Teor proteico.....	5
3.2.1.2 Eletroforese em SDS-Page.....	5
3.2.1.3 Atividade Gelatinolítica (Zimografia).....	5
3.2.1.4 Atividade Caseinolítica.....	6
3.2.1.5 Atividade Coagulante.....	6
3.2.1.6 Atividade Hemorrágica.....	6
3.2.1.7 Atividade Miotóxica.....	7
3.2.2 Análises Estatísticas.....	7
4 RESULTADOS.....	7
4.1 Caracterização Bioquímica e Biológica.....	7
4.1.1 Teor Proteico.....	7
4.1.2 Eletroforese em SDS-PAGE.....	8
4.1.3 Atividade Gelatinolítica (Zimografia).....	8
4.1.4 Atividade Caseinolítica.....	9
4.1.5 Atividade Coagulante.....	10
4.1.6 Atividade Hemorrágica.....	10
4.1.7 Atividade Miotóxica.....	11
5 DISCUSSÃO.....	12
6 CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS.....	18
ANEXOS.....	22

RESUMO

Os venenos ofídicos são misturas complexas e tem como funções principais a paralisação e o abate da presa, bem como a promoção inicial da digestão e suas ações podem variar de acordo com a idade, a distribuição geográfica e o caráter individual de cada serpente. O veneno de *Bothrops alternatus*, assim como a maioria dos venenos botrópicos, tem como principais ações, as atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica. O objetivo desse estudo foi avaliar as possíveis variações dos venenos de serpentes machos e fêmeas da espécie *Bothrops alternatus* ao longo do desenvolvimento, através de caracterização bioquímica (dosagem de proteínas, eletroforese em SDS-PAGE, atividade gelatinolítica, atividade caseinolítica e atividade coagulante) e caracterização biológica (atividade hemorrágica e miotóxica). Como resultados, teor proteico dos venenos de machos e fêmeas não apresentou variação ontogenética ou sexual, com teor entre 90 e 100% de proteína. Os perfis eletroforéticos dos venenos foram semelhantes, porém uma proteína com peso molecular aproximado de 17.0 kDa variou entre os sexos e conforme o desenvolvimento das serpentes. Por meio das técnicas de zimografia em SDS-PAGE e atividade caseinolítica foi possível observar que a ação proteolítica dos venenos de fêmeas apresentou-se pouco ativo, com ação somente no terceiro e quarto ano, enquanto que os venenos de machos mostraram atividade somente no primeiro ano de vida. Os venenos de *B. alternatus* tiveram a capacidade de coagular o plasma equino citratado em 60 segundos e os venenos de ambos os sexos foram mais coagulantes no primeiro ano de vida, sofrendo um declínio na ação ao longo do desenvolvimento. Na atividade hemorrágica as amostras de venenos apresentaram variação sexual, sendo a variação ontogenética só observada nos venenos de machos, onde foram mais ativos no quarto ano de idade. A atividade miotóxica dos venenos de *B. alternatus* mostrou que existe variação sexual, enquanto que a variação ontogenética só foi identificada nos venenos de machos, apresentando oscilações dos valores da atividade específica para a enzima CK. Por meio da análise conjunta dos dados gerados, concluímos que existe variação sexual e ontogenética em venenos da espécie *B. alternatus* e que diversos fatores podem influenciar no desencadear de suas ações e atividades, visto que, fatores ambientais e genéticos são a chave para a manutenção das espécies no habitat em que vivem.

Palavras chave: *Bothrops alternatus*; Venenos; Variação ontogenética; Variação sexual.

ABSTRACT

Snakes are complex mixtures whose main functions are the stoppage and the killing of prey as well as the initial promotion of digestion and their actions may vary according to the age, geographical distribution and individual character of each snake. The venom of *Bothrops alternatus*, as well as most of the botrópico venoms, has as main actions, proteolytic, coagulant and hemorrhagic activities. The objective of this study was to evaluate the possible variations of venoms of male and female snakes of the *Bothrops alternatus* species throughout the development, through biochemical characterization (protein dosage, SDS-PAGE electrophoresis, gelatinolytic activity, caseinolytic activity and coagulant activity) and biological characterization (hemorrhagic and myotoxic activity). As a result, protein content of male and female venoms did not show ontogenetic or sexual variation, with 90 to 100% protein content. The electrophoretic profiles of the venoms were similar, but a protein with an approximate molecular weight of 17.0 kDa varied between the sexes and as the snakes developed. By means of the SDS-PAGE zimography and caseinolytic activity, it was possible to observe that the proteolytic action of the female venoms was not very active, with action only in the third and fourth year, whereas the male venoms showed activity only in the first year of life. The *B. alternatus* venoms had the ability to coagulate citrated equine plasma in 60 seconds and venoms of both sexes were more coagulant in the first year of life, suffering a decline in action throughout development. In the hemorrhagic activity the venom samples presented sexual variation, and the ontogenetic variation was only observed in the venoms of males, where they were more active in the fourth year of age. The myotoxic activity of *B. alternatus* venoms showed that there is sexual variation, whereas ontogenetic variation was only identified in the venom of males, with oscillations of the specific activity values for the CK enzyme. By means of the joint analysis of the data generated, we conclude that there is sexual and ontogenetic variation in venoms of the species *B. alternatus* and that several factors can influence in the triggering of their actions and activities, since environmental and genetic factors are the key to the maintenance species in the habitat in which they live.

Keywords: *Bothrops alternatus*; Venoms; Ontogenetic variation; Sexual variation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidentes ofídicos no Brasil

Um dos maiores problemas de Saúde Pública na América Latina são os agravos por animais peçonhentos, sendo as serpentes os principais agentes etiológicos (CAMPBELL & LAMAR, 1989; WARREL, 2004). No Brasil aproximadamente 16% espécies de serpentes descritas são consideradas peçonhentas (BÉRNILS, 2015). E as de maior importância estão distribuídas entre as famílias Viperidae e Elapidae, possuindo glândulas especializadas ligadas a um aparato apropriado para inoculação de suas secreções tóxicas, ocasionando acidentes sérios ao homem e em animais domésticos (MELGAREJO, 2009). Os principais gêneros de interesse médico são: *Bothrops* (jararacas) as principais responsáveis pelos acidentes ofídicos no Brasil (86,23%), *Crotalus* (cascavéis) ficam em segundo lugar (9,17%), e *Lachesis* (surucucus) ocorrem com menos frequência (3,72%), compõem a família Viperidae e o gênero *Micrurus* (cobras corais), aquelas que apresentam o menor índice de acidentes, com 0,86% fazendo parte da família Elapidae (CARDOSO *et al.* 2003; BERNARDE, 2014).

1.2 Venenos de serpentes

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas por 20% de compostos orgânicos e inorgânicos, sendo que aproximadamente 90% são proteínas com atividade enzimática ou não, lipídeos, aminas biogênicas, carboidratos, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos e compostos inorgânicos (IWANAGA & SUZUKI, 1979; FRIEDERICH & TU, 1971). Os venenos exercem um papel fisiológico importante para as serpentes que possuem a capacidade de produzi-lo, como a paralisação e o abate da presa, promover o processo de digestão e defender-se de agentes agressores/ predadores (HABERMEHL, 1981; ROCCO *et al.* 2013).

Diversas classes de toxinas estão presentes nos venenos das serpentes, dentre elas, as mais expressivas são: as metaloproteases, serinoproteases e fosfolipases (ZELANIS, 2006).

As metaloproteases são enzimas proteolíticas de grande abundância em venenos botrópicos e estão envolvidas em diversos processos decorrentes do envenenamento, como: dermonecrose, hemorragia, edema e degradação de fatores da cascata de coagulação sanguínea (FOX & SERRANO, 2008; OLIVEIRA *et al.* 2010).

As serinoproteases são enzimas que apresentam massa molecular variando entre 26.0 e 67.0 kDa e a maioria delas atua na disfunção do processo hemostático agindo diretamente sobre os fatores da cascata de coagulação e sistema fibrinolítico (SERRANO & MAROUN, 2005).

As fosfolipases são enzimas catalisadoras da hidrólise dos fosfolípidos que compõem as membranas celulares e podem receber designações dependendo do local da hidrólise. O tipo de fosfolipase mais encontrada nos venenos é a do tipo A2, que hidrolisam especificamente a posição sn-2 dos fosfolípidos de membranas biológicas e artificiais. As fosfolipases A2 presentes nos venenos podem induzir vários efeitos farmacológicos, como miotoxicidade, cardiotoxicidade, edema, hipotensão, entre outros (KUDO & MURAKAMI, 2002).

Os venenos de serpentes podem apresentar variações em sua composição e atividades biológicas. Essas variações vêm sendo documentadas e observadas em diversos níveis: variações interfamiliares, intergêneros, interespecíficas e intraespecíficas. E dentro de uma mesma espécie podem apresentar variações sexuais, ontogenéticas, geográficas, sazonais, em como variações individuais (CHIPPAUX, 1991).

ROCHA & FURTADO (2005) mostraram que a variação individual dos venenos de *Bothrops alternatus* prevalece, quando correlacionadas a distribuição geográfica das serpentes. RAFAEL (2005) em estudos com venenos de *Bothrops jararacussu* de diferentes localidades atestou diferenças significantes nas atividades biológicas (atividade hemorrágica e miotóxica) dos venenos desta espécie.

FURTADO *et al.* (1991) ao testarem as atividades hemorrágica, edematogênica, necrosante, coagulante e proteolítica dos venenos de oito espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (*Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*) demonstraram a variabilidade existente entre os venenos dentro de um mesmo grupo.

Na maioria das pesquisas que versam sobre a variabilidade de venenos, aqueles relacionados à variação ontogenética estão presentes, pois seu entendimento é de fundamental importância por contribuir para a compreensão da complexidade e diversidade dos venenos ofídicos (SAAD, 2011). KAMIGUTI *et al.* (1986), observaram diferenças no tempo de coagulação sanguínea em acidentados por espécimes filhotes e adultos de *Bothrops jararaca*.

Nos estudos de ZELANIS *et al.* (2010) sobre variação ontogenética e análise protéômica do veneno de *Bothrops jararaca* foi possível observar que os venenos de serpentes adultas e filhotes apresentaram valores para atividade hemorrágica semelhantes, porém o veneno de serpentes adultas é mais letal em camundongos. Na ação coagulante, o veneno de filhotes da espécie *Bothrops jararaca* foi dez vezes mais potente quando comparadas as serpentes na fase adulta.

Tendo em vista a diversidade de serpentes que causam acidentes no Brasil e a variabilidade de seus venenos, muitas vezes o tratamento desses pode não evoluir de forma adequada, colocando em questionamento a eficácia dos soros produzidos, bem como o diagnóstico em relação ao gênero causador do agravo. WARREL (1997) afirma que é importante conhecer a variabilidade dentro dos venenos de serpentes, para correlacionar com o tratamento dos envenenamentos, visto que podem ocorrer diferenças nos quadros clínicos de pacientes que foram picados por serpentes de diferentes idades, regiões, entre outros. As pesquisas mais recentes com venenos ofídicos buscam um melhor entendimento dos aspectos clínicos de envenenamentos em humanos, como também dos mecanismos de ação dos venenos e toxinas presentes nos mesmos. Sendo assim, propomos um estudo de variabilidade sexual e ontogenética que pode ocorrer na composição e em algumas atividades do veneno da espécie *Bothrops alternatus*, levando em conta que esse tipo de estudo é de grande relevância científica e médica, podendo colaborar no tratamento de acidentados por serpentes peçonhentas.

1.3 Espécie *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854

A espécie *Bothrops alternatus* (Fig. 1) uma importante representante do gênero *Bothrops*, destaca-se por ser encontrada desde o Sul de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul para o Sul (MELGAREJO, 2009). Segundo NUNES (2006) e MARTINS *et al.* (2002), a dieta dessa espécie se baseia principalmente em pequenos mamíferos como roedores, desde o nascimento, ou seja, sem variação ontogenética. Seu veneno é caracterizado por apresentar três atividades fisiopatológicas “básicas”: proteolítica, melhor definida como inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica (Acidente Botrópico) (ROSENFELD, 1971). Essas atividades são extremamente complexas e podem ser atribuídas a componentes específicos do veneno, como proteases (metaloproteases e serinoproteases) e fosfolipases A₂ (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003). Há ditado popular que “quando a Urutu não mata, aleija” (PEREIRA, 1939), felizmente

isso parece não passar de uma crença popular, pois segundo estudos, seu veneno é pouco ativo, quando comparado com os de outras espécies do mesmo gênero (ROCHA & FURTADO, 2005).



Figura 1. Exemplar fêmea jovem de *Bothrops alternatus*. **Foto:** Silvia Travaglia Cardoso

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar as variações que podem ocorrer na composição e em algumas atividades dos venenos de serpentes machos e fêmeas da espécie *Bothrops alternatus* ao longo do desenvolvimento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Venenos

Os venenos de 11 exemplares (9 fêmeas e 2 machos), foram extraídos individualmente, de duas ninhadas de *Bothrops alternatus* ao longo de cinco anos (2000-2004), nas dependências do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Após coletados, os venenos foram imediatamente processados (centrifugados e congelados) e posteriormente liofilizados, sendo mantidos em freezer -20°C até o momento do uso. Para a realização dos experimentos desse estudo, foram testados *Pools* elaborados a partir dos venenos de machos ou de fêmeas de cada ano de vida, exceto para o ano de 2000 (neonatos), em que o rendimento de veneno extraído foi baixo.

3.1.2 Animais

Para a realização dos ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss Outbred machos com peso entre 18 e 22g - provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan (CEUAIB nº1364/15). Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Herpetologia, com ração e água a vontade e período de luz de 12 horas.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização bioquímica e biológica

3.2.1.1 Teor proteico

A concentração do teor proteico dos venenos foi quantificada para cada um dos pools, utilizando-se o método descrito por LOWRY *et al.* (1951), e modificado por MARKWELL *et al.* (1978). A albumina bovina foi utilizada para elaboração da curva padrão, utilizando-se diluições seriadas em solução salina 0,85%. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e as absorbâncias lidas em leitor de placa (SpectraMax) no comprimento de onda de 660 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteína por mg de veneno seco.

3.2.1.2 Eletroforese em SDS-PAGE

Os padrões eletroforéticos das proteínas dos venenos foram determinados utilizando a técnica de eletroforese em SDS-PAGE, conforme o método de LAEMMLI (1970). Um gel foi preparado na concentração de 12,5% e foram aplicados 20 µg de amostra de cada *Pool*. As corridas ocorreram em aproximadamente de 200 v e após o término da corrida o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue por 24 horas.

3.2.1.3 Atividade Gelatinolítica (Zimografia)

A zimografia dos venenos foi realizada conforme HEUSSEN & DOWDLE (1980), para detecção das enzimas proteolíticas presentes nos venenos. O gel de foi preparado na concentração de 10%, sendo este copolimerizado com substrato gelatina. A corrida foi realizada à temperatura de 4°C e após o gel foi lavado com tampões específicos (tampão de lavagem I (Tris (hidroximetil) amino metano, Triton X-100 2,5% e água destilada) por 30 minutos, posteriormente lavado por 10 minutos no tampão de lavagem II (Tris (hidroximetil) amino metano e água destilada)) e por fim

incubado por 24 horas a 37°C no tampão de ativação (Tris (hidroximetil) amino metano 50 mM, Cloreto de Cálcio, Cloreto de Sódio e água destilada). O gel foi corado com Comassie B. Blue e em seguida descorado, até que as áreas de digestão estivessem nítidas.

3.2.1.4 Atividade Caseinolítica

A atividade proteolítica sobre a caseína foi determinada através do método de LOMONTE & GUTIÉRREZ (1983), em que 1 mL das amostras de veneno na concentração de 200 µg, conforme ROCHA *et al.* (2005), foram adicionadas a uma solução de caseína à 1%. A mistura foi incubada por um período de 30 minutos, a temperatura de 37°C. Interrompeu-se a reação através da adição de ácido tricloroacético 5%, os tubos foram centrifugados por 10 minutos e as absorbâncias dos sobrenadantes da reação lidas em leitor de placa (SpectraMax) em densidade óptica de 280 nm.

A atividade caseinolítica foi expressa em U/mg de veneno, obtida pela seguinte fórmula: $U/mg = A_{280} \times 100 / \text{mg de veneno}$.

3.2.1.5 Atividade Coagulante

A atividade coagulante é determinada através da 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 (100 µg-1,5µg). O tempo de coagulação (TC) foi verificado através do fibrômetro BBL® FibroSystem® e os valores da DMC-P obtidos através de análise de regressão linear do “tempo de coagulação” sobre a “quantidade de veneno”.

3.2.1.6 Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica foi determinada segundo o método de KONDO *et al.* (1960), modificado por GUTIERREZ (1985), onde grupos de cinco camundongos (Swiss Outbred - peso entre 18 e 22 g) foram inoculados, i.d, na região ventral com 100 µl de veneno na concentração de 15 µg, conforme FURTADO *et al.* (1991), e como grupo controle cinco animais foram inoculados com solução salina 0,85%. Após o período de duas horas, os animais foram eutanaziados em câmara de CO₂ conforme descrito por GAY *et al.* (2005). Posteriormente os tecidos foram removidos e colocados sobre um suporte translúcido, para análise e quantificação dos

diâmetros dos halos hemorrágicos formados. Visto que a Dose Mínima Hemorrágica para o veneno de *B. alternatus* já foi estabelecida em outros estudos, a atividade hemorrágica foi realizada de modo comparativo baseando-nos na intensidade da atividade dos venenos.

3.2.1.7 Atividade Miotóxica

A atividade miotóxica foi avaliada através, da quantificação dos níveis séricos da enzima creatino-quinase (CK), que é liberada após uma lesão muscular. Grupos de cinco camundongos (Swiss Outbred - machos com peso entre 18 e 22g) foram injetados com 100 µl de solução veneno na concentração de 50 µg, por via intramuscular no músculo gastrocnêmico, enquanto que os animais controles foram injetados apenas com solução salina 0,85%. Após 3 horas, o sangue dos animais foi coletado via plexo ocular, conforme estipulado nos estudos de ROCHA *et al.* (2005), e as amostras de sangue centrifugadas, para obtenção dos soros. Os níveis séricos de CK foram determinados utilizando-se o Kit comercial CK-UV (Bioclin), como descrito no método de GUTIÉRREZ *et al.* (1980).

3.2.2 Análises Estatísticas

Os resultados apresentados nesse estudo representam a média e \pm DP (Desvio Padrão). Para esse estudo foi adotada a análise de variância dos resultados através do teste t de *Student*, utilizando-se o programa Extat e os valores de $p \leq 0,05$ ou 5% foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização bioquímica e biológica

4.1.1 Teor proteico

Os resultados mostraram que os teores proteicos das amostras dos *pools* de venenos de machos ou fêmeas, nas diferentes variáveis em estudo (idade e sexo) foram semelhantes, com concentração entre 90 e 100%. Para os testes subsequentes adotou-se, para as amostras de venenos, o valor de 1,0 mg proteína/peso seco de veneno. Sabendo que alguns métodos de dosagem de proteínas podem superestimar os valores, foi considerado o conteúdo em 100%.

4.1.2 Eletroforese em SDS-PAGE

Ao analisar os padrões eletroforéticos dos *pools* de fêmeas ou machos nos diferentes estágios de desenvolvimento, pode-se observar que os perfis são muito semelhantes, porém, algumas peculiaridades puderam ser destacadas:

- O *pool* de venenos de fêmeas no primeiro ano apresentou 14 bandas, e no segundo ano 15 bandas. A partir do terceiro ano de vida mantiveram-se com 16 bandas proteicas (Fig. 2). No *pool* de venenos de machos, o número de bandas permanece igual do primeiro ano até o terceiro ano (16 bandas), e no quarto ano de vida ocorre à redução de uma banda (15 bandas) (Fig. 2);
- As bandas de proteínas de aproximadamente 37.0 kDa são mais intensas no primeiro ano de vida em ambos os sexos, e diminuem sua intensidade no decorrer dos anos (Fig. 2);
- Observa-se maior diferença entre os sexos, e mesmo entre as diferentes idades, no que diz respeito a uma proteína com peso molecular aproximado de 17.0 kDa. Os venenos de fêmeas apresentam essa proteína desde o primeiro ano de vida, enquanto que nos venenos de machos só começa aparecer a partir do segundo ano (Fig. 2)

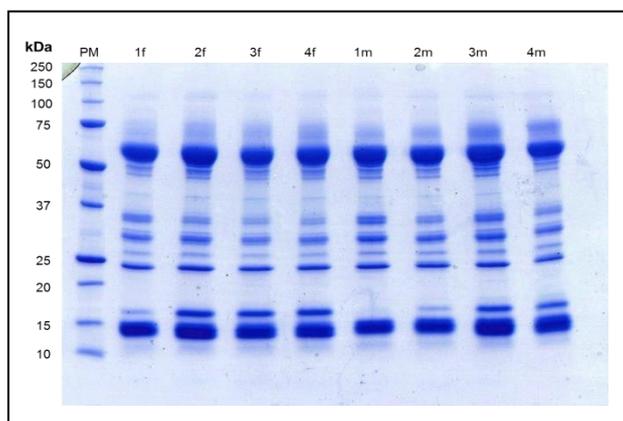


Figura 2 – Eletroforese dos *Pools* de fêmeas e de machos ao longo da ontogênese. **PM**, Padrão de peso molecular; **1f**, primeiro ano de idade das fêmeas; **2f**, segundo ano de idade das fêmeas; **3f**, terceiro ano de idade das fêmeas; **4f**, quarto ano de idade das fêmeas; **1m**, primeiro ano de idade dos machos; **2m**, segundo ano de idade dos machos; **3m**, terceiro ano de idade dos machos e **4m**, quarto ano de idade dos machos.

4.1.3 Atividade Gelatinolítica (Zimografia)

Mediante a técnica de zimografia em SDS-PAGE foi possível observar a presença e ação de enzimas proteolíticas nos venenos de *Bothrops alternatus*, sobre o substrato gelatina. Os venenos de fêmeas apresentaram-se pouco ativos sobre o

substrato gelatina, com ação somente no terceiro e quarto ano (Fig. 3), entre as áreas de massa molecular 50.0 e 75.0 kDa. Enquanto que os venenos de machos demonstraram atividade apenas no primeiro ano (Fig. 3). O veneno de *Bothrops jararaca* foi utilizado como controle positivo e foi mais proteolítico do que os venenos de *Bothrops alternatus*.

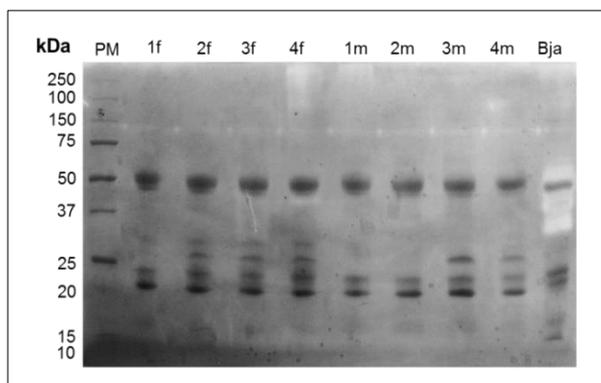


Figura 3 – Zimografia em SDS- PAGE dos *pools* de fêmeas e de machos de *Bothrops alternatus* ao longo da ontogênese: **PM**, Padrão de peso molecular; **1f**, primeiro ano de idade das fêmeas; **2f**, segundo ano de idade das fêmeas; **3f**, terceiro ano de idade das fêmeas; **4f**, quarto ano de idade das fêmeas; **1m**, primeiro ano de idade dos machos; **2m**, segundo ano de idade dos machos; **3m**, terceiro ano de idade dos machos e **4m**, quarto ano de idade dos machos; **Bja**, *Bothrops jararaca*.

4.1.4 Atividade Caseinolítica

A atividade caseinolítica foi testada em triplicata e todos os *pools* de veneno mostraram essa ação. O veneno das fêmeas apresentou maior atividade proteolítica no quarto ano de vida. Ao contrário, o veneno de machos apresentou maior atividade na amostra de venenos de animais de primeiro ano, demonstrando que a sua atividade se mantém durante o desenvolvimento e decai no quarto ano de idade (Anexo- I; Fig. 4). Estatisticamente, o veneno de fêmeas no quarto ano é o mais ativo em relação às outras amostras (Anexos- I e II).

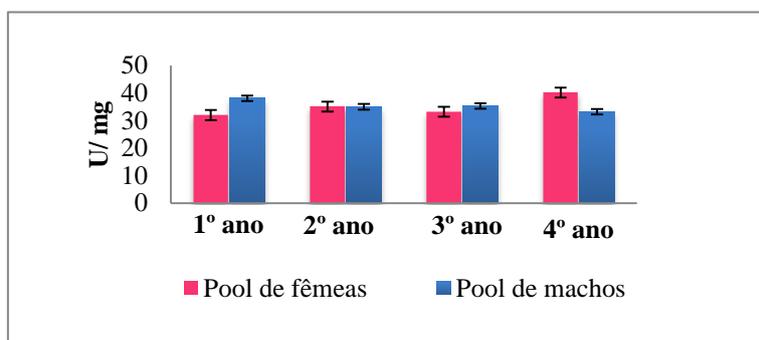


Figura 4- Atividade proteolítica sobre a caseína dos *pools* de fêmeas e machos ao longo do desenvolvimento. Os valores representam média e \pm desvio Padrão.

4.1.5 Atividade Coagulante

Os venenos tanto de fêmeas quanto de machos, dos diferentes anos, foram capazes de coagular o plasma equino citratado em 60 segundos. Os resultados obtidos para as amostras de venenos de fêmeas mostraram que o primeiro ano de vida não é significativamente diferente do segundo e terceiro ano, demonstrando manter sua atividade durante esse período. No quarto ano observa-se uma redução da sua atividade (Anexo- I; Fig. 5).

A amostra de veneno de machos de primeiro ano foi a mais ativa, com DMC-P de 2,9 $\mu\text{g/mL}$, porém também mantém a ação coagulante nos anos subsequentes (Anexo- I; Fig. 5).

Analisando estatisticamente os *pools* de fêmeas e de machos observa-se que as amostras apresentaram valores semelhantes (no segundo e terceiro ano de vida), mas nota-se que os venenos de machos são mais coagulantes que os venenos de fêmeas. (Anexos- I e II; Fig. 5).

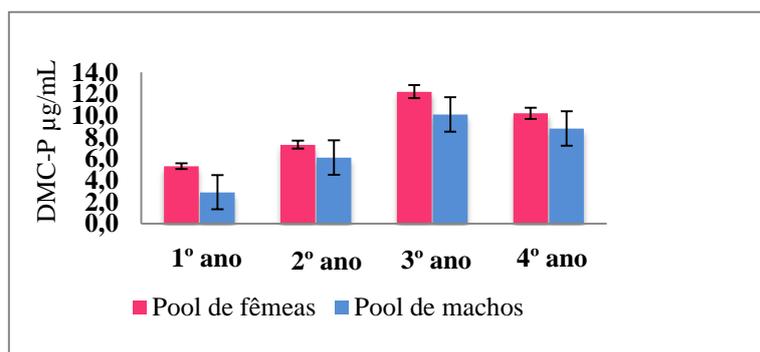


Figura 5- Dose mínima coagulante sobre o plasma dos *pools* de fêmeas e machos ao longo do desenvolvimento. Os valores representam média e \pm desvio Padrão.

4.1.6 Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica dos venenos de fêmeas ou machos de *Bothrops alternatus* foi determinada através da análise dos diâmetros dos halos hemorrágicos formados. Os venenos de fêmeas não apresentaram variação significativa entre as idades (Anexo- I; Fig. 6). Os resultados estabelecidos para os venenos de machos mostraram que são menos hemorrágicos no primeiro ano de vida, porém eles se mantêm com valores aproximados no segundo e terceiro ano e aumentam sua ação no quarto ano de vida, com diâmetro de $18,2 \pm 0,7\text{mm}$ (Anexo- I; Fig. 6).

Comparando estatisticamente os resultados obtidos da ação dos venenos de machos e de fêmeas, observa-se que no primeiro ano de vida ambos os sexos apresentam atividade hemorrágica semelhante, mas que a partir do segundo ano de idade os venenos de machos se tornam mais hemorrágicos que os de fêmeas (Anexos- I e II; Fig. 6).

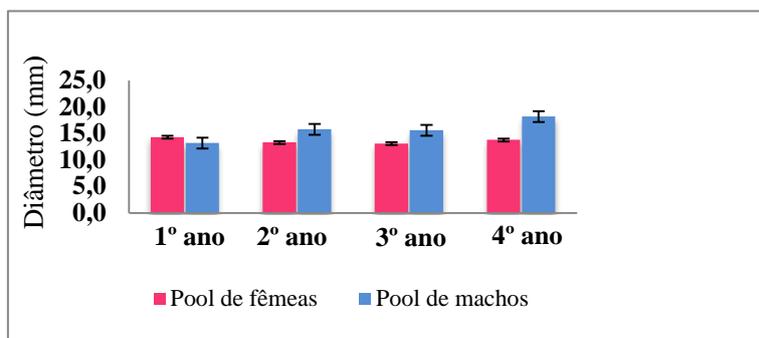


Figura 6- Atividade Hemorrágica dos *pools* de fêmeas e machos ao longo do desenvolvimento (diâmetro do halo hemorrágico (mm)). Os valores representam média e \pm desvio padrão.

4.1.7 Atividade Miotóxica

A ação miotóxica dos *pools* de venenos de fêmeas ou machos de *Bothrops alternatus*, ao longo do desenvolvimento, foi avaliada através da injeção intramuscular (50 μ g/animal) e quantificação dos níveis séricos de CK (Creatinquinase) no soro de camundongos. Os animais controles foram injetados apenas com solução salina 0,85%. Os resultados mostram que os venenos foram capazes de elevar os níveis séricos de CK em camundongos, quando comparados aos animais injetados somente com salina (controles) (Anexo- I; Fig. 7).

Os valores de CK estimados para as amostras de fêmeas ou machos, nas diferentes idades foram semelhantes, porém é possível constatar estatisticamente que o veneno de fêmeas no segundo ano e o de machos no terceiro ano foram menos ativos (Anexos- I e II; Fig 7).

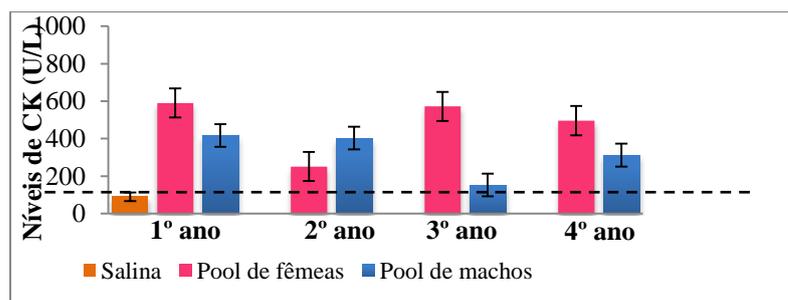


Figura 7- Atividade Miotóxica dos *pools* de fêmeas e machos ao longo do desenvolvimento (Níveis séricos de CK (U/L)). Os valores representam média e \pm desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes são misturas complexas constituídas em sua maior parte por proteínas, podendo apresentar ou não atividades enzimáticas. Além disso, fazem parte da composição dos venenos os lipídeos, carboidratos, amins biogênicas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos e componentes inorgânicos (IWANAGA & SUZUKI, 1979), contudo, podem ocorrer variações em sua composição e também nas atividades biológicas desencadeadas pelos mesmos (CHIPPAUX *et al.* 1991).

Diversos autores vêm desenvolvendo estudos de variabilidade entre os venenos de serpentes, e estas podem ser observadas em diversos níveis, tais como: interfamiliares, intergêneros, interespecíficas e dentro de uma mesma espécie com variações sexuais, ontogenéticas, geográficas, sazonais e também individuais (CHIPPAUX *et al.* 1991; SANCHEZ *et al.* 1992). Há uma relação entre a composição dos venenos e o tipo de dieta que determinada espécie possa ter (KOCHVA, 1987).

Os resultados obtidos nos ensaios desse estudo demonstram variação ontogenética e sexual em sua maioria. Apesar dessa espécie de serpente se alimentar durante toda a vida de mamíferos (não possuir variação ontogenética alimentar), pôde-se observar variações significativas nos venenos, isto mostra que a alimentação talvez não seja um fator determinante na composição e ação dos venenos (ANDRADE, 1995).

Os venenos são compostos por aproximadamente 25% de sólidos, dos quais 90% são proteínas. Os teores proteicos apresentados para as amostras de venenos de fêmeas ou machos, nos quatro anos foram semelhantes entre si, com valores entre 90 e 100% de proteínas, confirmando os achados da literatura para venenos botrópicos (FURTADO *et al.* 1991).

Segundo estudos clássicos, a eletroforese é uma técnica que possibilita uma grande resolução dos padrões de proteínas de venenos, conseqüentemente, permitindo a identificação e separação de seus componentes (MOURA DA SILVA, 1992; TAN & PONDURAI, 1992). Os perfis eletroforéticos mostraram que os venenos de machos e de fêmeas são semelhantes, sendo que as fêmeas apresentam número maior de bandas quando comparados com os venenos de machos. Nos venenos de *Bothrops jararaca*, foi observado o contrário por FURTADO *et al.* (2006), onde os machos mostraram número maior de bandas proteicas.

A maioria dos venenos de serpentes de o gênero *Bothrops* podem apresentar diferentes classes de proteínas na região de peso molecular de aproximadamente 24.0

kDa, compreendendo as serinoproteases e metaloproteases (SERRANO & MAROUN, 2005; SERRANO *et al.* 2005). Bandas próximas a essa faixa de peso molecular foram identificadas nos venenos de *B. alternatus* em todas as variáveis analisadas. ZELANIS (2006) mostrou que no veneno de *Bothrops insularis* apresenta uma banda de proteína nessa mesma faixa de peso molecular, e que a abundância relativa da mesma, aumentava durante o desenvolvimento dos animais, o que não foi observado nos venenos de *Bothrops alternatus*.

SERRANO *et al.* (1993a) indicam que proteínas com massas moleculares entre 46.0 e 36.0 kDa possam ser compostos relacionados a atividade proteolítica e também sobre a cascata de coagulação. Uma banda nítida nos venenos de *Bothrops alternatus* de massa de 44.0 kDa se apresentou com baixa intensidade nos diferentes sexos e idades, podendo estar relacionada com a ação proteolítica, visto que o veneno dessa espécie já foi caracterizado em outros estudos como pouco proteolítico quando comparados a outras espécies do mesmo gênero (FURTADO *et al.* 1991a).

Alguns estudos (MOURA DA SILVA, 1992; GUTIÉRREZ *et al.* 1986; NINSENBOM *et al.* 1986) propuseram que as proteínas relacionadas à atividade miotóxica dos venenos, estariam localizadas aproximadamente entre 13.0 e 16.0 kDa. Nos perfis eletroforéticos analisados nesse trabalho foi identificada uma banda próxima a 17.0 kDa, independente das variáveis analisadas, apresentando-se nos venenos de fêmeas desde o primeiro ano de idade até o quarto ano. Nos venenos de machos essa banda só aparece a partir do segundo ano de idade e sua intensidade é mais baixa quando comparada aos venenos de fêmeas.

Segundo BRAZIL (1984), em todos os venenos do gênero *Bothrops* está presente uma proteína entre 30.0 e 40.0 kDa, e esta possui atividade “Tipo trombina”, relacionada a ação sobre a coagulação sanguínea. Assim como foi identificada a Bhalternin, uma thromin-like específica do veneno de *B. alternatus* nos estudos de COSTA *et al.* (2010), na análise da eletroforese aqui apresentada foi possível observar a presença dessa enzima, estando mais intensa nos venenos de machos, durante todo desenvolvimento. Nas fêmeas, a sua intensidade foi maior somente no primeiro e segundo ano. Indicando possíveis variações da atividade coagulante dos venenos de *B. alternatus* nas diferentes fases de vida e entre os sexos.

Os venenos das serpentes da família Viperidae são caracterizados por apresentarem alta atividade proteolítica (TU, 1977), decorrente da presença de proteases, hialuronidas, fosfolipases entre outras enzimas. Tendo em vista tais

informações, a atividade proteolítica dos venenos de *Bothrops alternatus* foi avaliada através de dois diferentes substratos, a gelatina e a caseína.

A atividade gelatinolítica foi avaliada através da técnica de zimografia em gel de SDS-PAGE, onde podem ser identificadas enzimas que tem a capacidade de digestão do substrato. Os resultados obtidos demonstraram que os venenos de fêmeas ou de machos possuem ação proteolítica sobre a gelatina, porém com variação de acordo com a ontogenia da espécie. O *pool* de venenos de fêmeas apresentou atividade gelatinolítica somente a partir do terceiro ano de idade, nas regiões de peso molecular entre 37.0 e 50.0 kDa, confirmando o estabelecido por SERRANO *et al.* (1993b) para proteínas com ação proteolítica. No *pool* venenos de machos a atividade só foi observada no primeiro ano de vida e com intensidade menor quando comparada ao veneno de fêmeas.

ZELANIS (2006) sugere que há uma possível regulação ontogenética da expressão de proteases, sobretudo metaloproteases no veneno de *Bothrops insularis*. Além disso, de acordo com a banda de proteína em que foi observada a atividade proteolítica sobre a gelatina, demonstrou a presença de duas classes de metaloproteases: metaloproteases da classe P-III, localizadas na região de 45.0 kDa e metaloproteases da classe P-I, localizadas na região de 27.0 kDa. OHLER *et al.* (2010), identificaram através da análise do proteoma de *Bothrops alternatus*, que metaloproteases da classe P-III são predominantes. Desta forma, podemos inferir que as metaloproteases da classe P-III sejam responsáveis pela digestão do substrato gelatina, dos venenos de *B. alternatus* nas variáveis analisadas.

Quando testada a ação proteolítica sobre o substrato caseína, os venenos de fêmeas apresentaram-se mais ativos no quarto ano de vida. Enquanto que o veneno dos machos teve ação mais expressiva no primeiro ano, coincidindo com os resultados obtidos na técnica de zimografia. Talvez essa variação ontogenética dos venenos de machos quanto à atividade proteolítica, esteja relacionada à alimentação, visto que consideravelmente os machos são menores que os exemplares de fêmeas, e possam dispor de um veneno mais proteolítico para auxiliar no abate de presas maiores.

ZELANIS *et al.* (2010), sugere que espécies que apresentam variação ontogenética na alimentação possam apresentar diferenças na ação proteolítica, devido ao tamanho das presas. No veneno de *B. alternatus* não ocorre variação ontogenética alimentar, então nota-se que esta hipótese sugerida por ZELANIS *et al.* (2010) não corresponde aos resultados aqui apresentados, podendo realmente esta variação estar mais relacionada ao dimorfismo sexual.

FURTADO *et al.* (2006), determinaram para os venenos de *Bothrops jararaca* que a atividade caseinolítica é semelhante em machos e fêmeas. Já ZELANIS (2006), observou que a mesma atividade é mais expressiva nos venenos de machos dentro da espécie *Bothrops insularis*.

Comumente as toxinas dos venenos de viperídeos, sobretudo dos botrópicos, têm como alvo os processos hemostáticos (KAMIGUTI & CARDOSO, 1989). Esses venenos apresentam componentes capazes de atuar sobre os diversos fatores da coagulação sanguínea (KAMIGUTI *et al.* 1986). Nos acidentes botrópicos, a alteração no tempo de coagulação sanguínea e também o quadro de incoagulabilidade são os sinais clínicos clássicos, devido à ação desses componentes, que em sua maioria são as proteases (SWENSON & MARKLAND, 2005; KINI, 2005).

A partir dos resultados obtidos para a atividade coagulante das amostras utilizadas nesse estudo, os venenos de fêmeas ou machos foram capazes de coagular o plasma equino citratado em 60 segundos. Foi observada variação da ação conforme o período de vida, onde os venenos de ambos os sexos mostraram-se mais ativos no primeiro ano, mantendo-se com os mesmos valores de DMC-P a partir do segundo ano. SALDARRÍAGA *et al.* (2003) identificaram maior atividade coagulante nos venenos de exemplares juvenis de *Bothrops asper* e *Bothrops atrox* da Colômbia. ZELANIS (2006) também apontou que os venenos de *Bothrops insularis* quando jovens, são mais ativos.

Quando comparados fêmeas e machos, os venenos de machos foram significativamente mais ativos. FURTADO *et al.* (2006), não constataram diferença significativa na atividade coagulante dos venenos de machos e de fêmeas de *Bothrops jararaca*.

Presente nos venenos de serpentes, a capacidade de induzir hemorragia, tanto local e sistêmica é típica dos venenos botrópicos. O efeito hemorrágico é causado principalmente pela ação proteolítica de metaloproteases, essas enzimas agem sobre os componentes da membrana basal do endotélio vascular, principalmente laminina, colágeno e proteoglicanas (BARAMOVA *et al.* 1989; SHANNON, *et al.* 1989).

Em relação à atividade hemorrágica, os venenos de fêmeas não apresentaram variação ontogenética e foram menos ativos do que os venenos de machos, a partir do segundo ano de vida. Enquanto que as amostras de venenos de machos de *B. alternatus* apresentaram variação da atividade hemorrágica durante o desenvolvimento. Nos venenos de *Bothrops jararaca* não é o que ocorre, FURTADO *et al.* (2006), mostraram que os venenos de fêmeas foram mais hemorrágicos do que os venenos de machos.

Os venenos de machos foram mais ativos no quarto ano de vida. Este efeito hemorrágico pode ser devido ao aumento da expressividade de metaloproteases em sua composição no decorrer de seu desenvolvimento (BARAMOVA *et al.* 1989). ÖHLER *et al.* (2010) através das análises proteômicas e venômicas de venenos da espécie *B. alternatus*, identificaram maior porcentagem de metaloproteases quanto aos outros componentes. ZELANIS (2006) mostrou que venenos de indivíduos adultos da espécie *Bothrops insularis* foram mais hemorrágicos, atribuindo essa diferença à maior expressividade de metaloproteases na fase adulta.

Os venenos botrópicos são capazes de desencadear uma série de efeitos fisiopatológicos, dentre eles a ação mionecrótica, que é uma das mais relevantes (GUTIÉRREZ, 2009). As proteínas miotóxicas podem ou não estar ligadas à Fosfolipases A₂ (KINI, 1997). Um dos métodos para detecção de ação miotóxica dos venenos é através da quantificação dos níveis séricos da enzima creatino-fosfoquinase (CK), que é liberada após uma lesão muscular (GUTIÉRREZ *et al.* 1980).

Os venenos de fêmeas foram mais ativos, sem variação significativa dos níveis de CK, exceto para o segundo ano de vida. Os venenos de machos apresentaram declínio desta atividade a partir do terceiro ano. Observa-se que nos segundo e terceiro ano de fêmeas e machos, respectivamente, não houve diferença significativa dos níveis de CK quando comparados ao grupo controle. Um dos fatores que pode ter implicado nessa resposta é a variação individual (ROCHA, 1995).

Através da análise conjunta dos resultados da atividade miotóxica dos venenos e seus respectivos perfis eletroforéticos, destaca-se uma banda majoritária de 17.0 kDa, próxima as regiões ricas em proteínas de ação miotóxica ou PLA₂ (13.0 a 16.0 kDa). Assim observamos importante variação entre as amostras de venenos de fêmeas e machos, quanto à proteína de 17.0 kDa, podendo tratar-se de uma a PLA₂. Em fêmeas esta proteína está presente em todos os anos de vida, porém em menor concentração na amostra de filhotes (primeiro ano). Enquanto, notadamente o “pool” de venenos de machos de primeiro ano, não apresenta esta mesma banda. Em machos, a proteína de 17.0 kDa está presente a partir do segundo ano de vida e sua concentração é igual ao apresentado para o veneno de fêmeas de 1 ano.

FURTADO *et al.* (2006) mostraram que os venenos de machos de *B. jararaca* causam maior efeito miotóxico do que os venenos de fêmeas, o que não foi observado nos dados estabelecidos para os venenos de *B. alternatus*. Contudo, os valores identificados para atividade miotóxica dos venenos de *B. alternatus* utilizados

nesse estudo, independente das variáveis analisadas, foram considerados baixos ao comparar-se com os valores das outras espécies do gênero *Bothrops*, corroborando com os achados de MOURA DA SILVA *et al.* (1991).

Por meio da análise conjunta dos dados gerados, concluímos que existe variação sexual e ontogenética em venenos da espécie *Bothrops alternatus* e que diversos fatores podem influenciar no desencadear de suas ações e atividades, visto que, fatores ambientais e genéticos são a chave para a manutenção das espécies no habitat em que vivem.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse estudo de análises bioquímicas e biológicas dos venenos de fêmeas ou machos de *Bothrops alternatus* ao longo do desenvolvimento, observamos que existem variações sexual e ontogenética nas diferentes atividades testadas, influenciando direta ou indiretamente na biologia do animal. Talvez estas variações não reflitam no prognóstico e na fisiopatologia dos acidentes, onde a espécie *Bothrops alternatus* é o agente etiológico. Certamente estudos mais aprofundados versando sobre a variabilidade dos venenos desta espécie serão de grande importância para a pesquisa e conseqüentemente para saúde pública, uma vez que o seu veneno faz parte da composição do “pool” de imunização para produção do Soro Antibotrópico.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. O. V. 1995. Variação ontogenética do veneno em serpentes do gênero *Bothrops* (Squamata, Viperidae). Rio Claro, Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista.
- BARAMOVA, E. N. et al. 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, n. 275: 63-71.
- BERNARDE, P.S. 2014. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. 1Ed. Anolisbooks, São Paulo, Brasil, 224p.
- BÉRNILS, R. S. & COSTA, H. C. 2015. Répteis Brasileiros: Lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira** 4(3): 75- 93.
- BRAZIL, O. V. 1984. 71. Peçonhas, p. 1044-1074. In C.E. COBERT (ed.). **Farmacodinâmica**. 6ed. São Paulo, Guanabara Koogan.
- CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. 1989. **The Venomous Reptiles of Latin America**. 6 ed., Ithaca and London, Comstock, 425 pp.
- CARDOSO, D.F., YAMAGUCHI, I.K., SILVA, A.M.M. 2003. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de Biologia Molecular. **In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD, JR. ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL**. 1ED. Sarvier, São Paulo, Brasil, p. 367-379.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAM, V. & WHITE, J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29: 1279-1303.
- COSTA, J. O.; FONSECA, C. K.; MAMEDE, N. C. C.; BELETTI, M. E.; SANTOS FILHO, N. A.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C.; HIRAYAMA, S. N. S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; FONSECA, F.; SILVA, F. H.; SILVA, N. P.; OLIVEIRA, F. 2010. Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon** 55: 1365-1377.
- FOX, J. W., SERRANO, S. M. T. 2008a. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to snake venom complexity. **FEBS J.** 275: 3016-3030.
- FRANÇA F.O.S., MÁLAQUE C.M.S., 2003. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD, JR. **ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL**. 1ED. Sarvier, São Paulo, Brasil, p. 73-86.
- FRIEDERICH, C & TU, A. T. 1971. Role of metal in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochemistry** 18(4): 678- 684.
- FURTADO, M. F. D., MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A. S., ANTONIO, L. C. 1991. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon** 29(2):219-26.
- FURTADO, M.F.D.; DIAS DA SILVA, W. & COLLETO, G.M.D.D. 1991a. Controle de Qualidade dos Venenos Animais e dos Correspondentes Antivenenos. I 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** 53 (2): 149-159.
- FURTADO, M. F. D.; CARDOSO, S. R. T.; ROCHA, M. M. T. 2006. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). **Toxicon** 48: 401-410.
- GAY, C.C; LEIVA, L.C; MARUÑAK, S; TEIBLER, P; ACOSTA DE PÉREZ, O. 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternates* venom. **Toxicon** 46 546-554.

- GUTIÉRREZ, J. M.; ARROYO, O. & BOLAÑOS, R. 1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en raton blanco. **Toxicon** **18**: 603-610.
- GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.,; ROJAS, G & CERDAS, L. 1985 Neutralization of proteolycti and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenoms. **Toxicon** **23**: 887-893.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. & CERDAS, L. 1986. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon** **24** (9): 885-894.
- GUTIÉRREZ, J. M. 2009. Efectos locales em el envenenamento ofídico em América Latina. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD, JR. **ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL**. 2Ed. Sarvier, São Paulo, Brasil, p.352-361.
- HABERMEHL G.G. 1981. Venomous animals and their toxins. New York: Springer-Verlag, 195 p.
- HEUSSEN, C. & DOWDLE, E.B. 1980. Eletrophoretic analysis of plaminogen activators in polyacrylamide gel containing sodiu dosdecylsulfate and copolymerized substrate. **Analy. Biochem** **102**: 196-202.
- IWANAGA, S & SUZUKI, T. 1979. Enzymes in snake venom. In: Lee, CY (Ed.). **Snake Venoms**. Berlin, Springer-Velag, p.61.
- KAMIGUTI, A. S., SILVIA, M. V., CARDOSO, J. L. C. 1986. Desfibrinação do sangue no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop**. São Paulo 31: 84-90.
- KAMIGUTI, A. S. & CARDOSO, J. L. C. 1989. Hemostatic changes caused by the venoms of south american snakes. **Toxicon** **27**(9): 955-963.
- KINI, R. M. 1997. Chapter 1: Phospholipase A₂ – A complex multifunctional protein puzzle. In: KINI, R. M (Editor). **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. England: Wiley, 1-28.
- KINI, R. M. 2005. The intriguing world of prothrombin activators from snake venoms. **Toxicon** **45**: 1133-1145.
- KOCHVA, E. 1987. The origin of snake and evolution of the venom apparatus. **Toxicon** **25**(1): 65-106.
- KONDO, H.; S. KONDO; I. IKESAWA; R. MURATA; A. OHSAKA. 1960. Studies of quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology** **13**: 43-51.
- KUDO, I., MURAKAMI, M. 2002. Phospholipase A₂ enzymes. Prostag. Lipid Mediators, n.68-69, pp. 3-58.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685.
- LOMONTE, B. & GUTIÉRREZ, J. M. 1983. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. **Rev. Biol. Trop.** 31(1): 37-40.
- LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement whit the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**: 265-275.
- MARKWELL, M.A.; HASS, S.M.; BIEBER, L.L. and TOLBERT, N.E. 1978. A modification of the Lowry procedures to simplify protein determination im membrane and lipoprotein saples. **Anal. Biochem.** **87**:206-210.
- MARTINS, M.; MARQUES, O.A.V. and SAZINA, I. 2002. Ecological and phylogenetics correlates of feeding habits in neotropical pitivipers of the genus *Bothrops*. In: G. W. SHUETT; M. HOGGREN & M.E. DOUGLAS (Eds.) **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain Publishing Utah.

- 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**. 2Ed. Sarvier, São Paulo, Brasil, p. 42-70.
- MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G. & THEAKSTON, R. D. G. 1991. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of diferente species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** **29(6)**: 713-723.
- MOURAS DA SILVA, A.M. 1992. Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida. **Bol. Biotecnol.** **3**: 3-7.
- NINSENBOM, H. E.; SEKI, C. & VIDAL, J. C. 1986. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (Víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon** **24 (3)**: 259-272.
- NUNES, S. F. 2006. **Dieta e biologia reprodutiva da cruzeira, *Bothrops alternatus* (serpentes-viperidae), na região sul do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 60p.
- ÖHLER, M.; GEORGIEVA, D.; SEIFERT, J.; BERGEN, M.; ARNI, R. K.; GENOV, N.; BETZEL, C. 2010. The venomics of *Bothrops alternatus* ias a Pool of acid proteins with predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. **J. Proteome Res.** **9 (5)**: 2422-2437.
- OLIVEIRA, A. K., PAES-LEME, A. F., ASEGA, A. F., CAMARGO, A. C. M., FOZ, J. W., SERRANO, S. M. T. 2010. New insights into the structural elements involved in the skin hemorrhage induced by snake venoms metalloproteinases. **Thromb. Haemost.** **104 (3)**: 485-497.
- PEREIRA, N.B. 1939/40. Lesões necróticas determinadas pela Urutu. **Revista de cirurgia de São Paulo, São Paulo**, **5** (1939-40): 477-490.
- RAFAEL, A. 2005. **Varição intraespecífica do veneno de *Bothrops jararacussu*: análises eletroforéticas, imunológicas e biológicas**. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- ROCCO, M. D; REATI, GUSTAVO; OLIVEIRA, V.C; LANARI, L.C; LASKOVVICZ, R.D; ROODT, A. R, 2013. Caracterización tóxica del veneno de *Bothrops (Rhinocerophis) alternatus* de diferentes regiones de La provincia de Córdoba (Argentina). **Revista Facultad de Ciencias Medicas** **70(1)**: 7-13.
- ROCHA M.M.T., FURTADO M.F.D., 2005. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Rev. Bras. De Zoo.** **22 (2)**: 383-393.
- ROSENFELD, G. 1971. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W., BUCKLEY, E. E., DEULOFEU, V., editors. *Venomous animals and their venoms*. New York: **Academic Press**: 345-841.
- SAAD, E. 2011. **Varição sexual, ontogenética e ambiental do veneno de *Bothrops jararaca* da Micro região de Botucatu SP: caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, Botucatu- São Paulo, 77p
- SALDARRIAGA, M. M.; OTERO, R.; NÚÑES, V.; TORO, M. F.; DÍAS, A.; GUTIÉRREZ, J. M. 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon** **42**: 405-411.
- SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COSTA, G. & DINIZ, C.R. 1992. Biological activities of venoms from south american snakes. **Toxicon** **30 (1)**: 95-103.

- SERRANO, S. M. T.; MATOS, M. F. C.; MANDELBAUM, F. R. & SAMPAIO, C. A. M. 1993a. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom- I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on syntenic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon** **31** (4): 471-481.
- SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M. & MANDELBAUM, F. R. 1993b. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom – II. Isolation of the metalloproteinases MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 1 and MSP 2. **Toxicon** **31** (4): 483-492.
- SERRANO, S. M. T. & MAROUN, R. C. 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon** **45**(8): 1115-1132.
- SERRANO, S. M. T.; SHANNON, J. D.; WNAG, D.; CAMARGO, A. C. M.; FOX, J. W. 2005. A multifaceted analysis of viperidae snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics** **5**: 501-510.
- SHANNON, J. D. et al. 1989. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. **J. Biol. Chem.** (264): 11575-11583.
- SWENSON, S.; MARKLAND Jr, F. S. 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon** **45**: 1021-1039.
- TAN, N. H.; PONNDURAI, G. A. 1992. Comparative study of the biological proprieties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American Lance-Headed Viper). **Comp. Biochem. Physiol.** 102B(1):103-9.
- TU, A. T. 1977. III. Snake venoms: Properties and actions. **In: Venoms: Chemistry and molecular biology.** New York, A Wiley- Interscience Publication. p. 151-456.
- WARREL D. A. 1997. Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes. **Sump. Zool. Soc. Lond.** 70:189 203.
- WARRELL, D. A. 2004. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, Clinical Features, and Clinical Management. **In: CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. (Eds.) The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere Vol. II.** 6 ed., Ithaca and London, Comstok, 425 pp.
- ZELANIS, A. P. P. 2006. **Análise da variabilidade ontogenética do veneno de *Bothrops insularis* (Amaral, 1921) (Serpentes Viperidae): Implicações adaptativas aos itens alimentares.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 104p.
- ZELANIS, A., TASHIMA, A. K., ROCHA, M. M. T., FURTADO, M. F., CAMARGO, A. C. M., SERRANO, S. M. T. 2010. Analysis of the Ontogenetic variation in the venom proteome / peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **J. Prot. Res.**9:2278-91.

ANEXOS

I – Médias e desvio padrão das atividades: caseinolítica, coagulante, hemorrágica e miotóxica.

Atividade/ ano de vida	Fêmeas				Machos			
	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano
At. Caseinolítica (U/mg)	32,0 ± 0,0	35,1 ± 0,9	33,2 ± 0,4	40,2 ± 0,3	38,1 ± 0,1	35,0 ± 1,4	35,2 ± 0,9	33,2 ± 0,8
Dose Mínima Coagulante (µg/ mL)	5,3 ± 0,4	7,3 ± 3,3	12,2 ± 3,1	10,2 ± 0,2	2,9 ± 1,0	6,1 ± 1,1	10,1 ± 1,8	8,8 ± 0,1
At. Hemorrágica (mm)	14,3 ± 1,6	13,3 ± 0,3	13,1 ± 1,8	13,8 ± 0,5	13,2 ± 2,2	15,8 ± 0,9	15,6 ± 0,9	18,2 ± 0,7
At. Miotóxica (U/L)	590,5 ± 46,5	251,5 ± 38,5	572,0 ± 50,3	496,5 ± 8,5	416,5 ± 15,5	403,0 ± 52,0	152,5 ± 9,5	312,0 ± 12,0

II- Nível de significância entre as comparações (teste t de *Student*) dos valores obtidos para as atividades: caseinolítica, coagulante (DMC-P: Dose mínima coagulante sobre o plasma), hemorrágica e miotóxica nas variáveis analisadas (sexo e idade). **F1**, *pool* de fêmeas 1º ano; **F2**, *pool de* fêmeas segundo ano; **F3**, *pool* de fêmeas 3º ano; **F4**, *pool* de fêmeas 4º ano; **M1**, *pool* de machos 1º ano; **M2**, *pool* de machos 2º ano; **M3**, *pool* de machos 3º ano; **M4**, *pool* de machos 4º ano. * Diferença estatística considerando $p \leq 0,05$ ou 5%.

Atividades:	At. Caseinolítica	DMC-P	At. Hemorrágica	At. Miotóxica
Comparações/ Valor de P (%)				
F1 X F2	6,684	27,04	11,011	1,634*
F1 X F3	16,705	9,554	15,487	40,290
F1 X F4	0,776*	0,619*	23,136	14,216
F2 X F3	6,795	13,190	40,161	0,756*
F2 X F4	2,989*	21,581	7,167	4,338*
F3 X F4	1,429*	26,102	25,492	13,534
M1 X M2	8,384	4,613*	2,809*	41,993
M1 X M3	5,943	3,015*	3,577*	0,480*
M1 X M4	0,113*	3,726*	0,265*	1,902*
M2 X M3	43,994	6,870	38,343	6,041
M2 X M4	12,429	8,556	0,366*	15,973
M3 X M4	8,006	24,367	0,399*	0,539*
F1 X M1	0,497*	7,218	17,764	6,917
F1 X M2	9,917*	24,367	6,161	5,826
F1 X M3	6,477	7,435	9,081	2,906*
F1 X M4	2,444*	2,306*	0,173*	4,429*
F2 X M1	5,762	14,385	43,143	5,468
F2 X M2	46,980	34,192	0,107*	7,732
F2 X M3	46,165	21,511	0,551*	11,013
F2 X M4	8,328	32,306	0,041*	17,239
F3 X M1	2,838*	6,109	48,142	4,028*
F3 X M2	12,013	9,543	2,554*	5,738
F3 X M3	6,308	25,221	3,151*	0,594*
F3 X M4	34,101	18,064	0,320*	1,502*
F4 X M1	1,712*	2,585*	28,662	3,565*
F4 X M2	4,098*	5,214	0,207*	15,854
F4 X M3	3,059*	47,463	0,930*	0,073*
F4 X M4	0,511*	2,344*	0,030*	0,460*