

Airton Lourenço Junior

“VARIÇÃO SEXUAL, ONTOGENÉTICA E AMBIENTAL DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* DA REGIÃO DE BOTUCATU – SÃO PAULO: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA, BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior, CEVAP/FMB/UNESP

Co-Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, FCFRP/USP

Botucatu

2011

Airton Lourenço Junior

“VARIÇÃO SEXUAL, ONTOGENÉTICA E AMBIENTAL DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* DA REGIÃO DE BOTUCATU – SÃO PAULO: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA, BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior, CEVAP/FMB/UNESP

Co-Orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, FCFRP/USP

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Lourenço Junior, Airton.

Variação sexual, ontogenética e ambiental do veneno de *Crotalus durissus* terrificus da Região de Botucatu - São Paulo : caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica / Airton Lourenço Junior. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Co-orientador: Andreimar Martins Soares

Capes: 40100006

1. Cobra venenosa - Veneno. 2. Botucatu (SP).

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*; Crotamina; Variação ambiental; Variação ontogênica; Variação sexual; Veneno.

“A natureza reservou para si tanta liberdade que não a
podemos nunca penetrar completamente com o nosso
saber e a nossa ciência”

Goethe

DEDICATÓRIA

Não há palavras que possam descrever meu profundo agradecimento aos meus pais, que merecem mais do que eu este título que agora obtenho, pelo esforço e dedicação incansáveis em auxiliar minha formação profissional.

Também dedico ao meu irmão (André) e a Mariana (Mãe) por tudo que passamos juntos.

À Débora, por tudo, e mais ainda pelo filho maravilhoso que me deu (Raul).

À Luciana, pela transparência, sinceridade e pela amizade verdadeira, e também por ter estado presente nos momentos mais críticos durante o desenvolvimento desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Rui Seabra Ferreira Junior, meu orientador, pela amizade, constante incentivo e apoio, por acreditar na minha capacidade de trabalho e por me mostrar sempre o melhor caminho, mesmo não sendo o mais fácil.

Ao Professor Doutor Benedito Barraviera, pela ajuda dentro do departamento, confiança, paciência, amizade e principalmente pelas preciosas oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal, além das broncas por me pegar de bermuda no laboratório.

Ao Professor Doutor Andreimar Martins Soares, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Aos funcionários, pós-graduandos, aprimorandos e estagiários do Grande Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, principalmente a Camila por quase desenvolver “LER” de tanto escrever minhas fichas.

Ao Professor Doutor Daniel Carvalho Pimenta do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pelas análises cromatográficas.

Ao Professor Doutor Patrick Jack Spencer do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo auxílio na padronização das técnicas.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, meu sincero obrigado.

SUMÁRIO

SÚMARIO

SÚMARIO	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivos gerais	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Descrição da Área de Estudo	10
3.2. Venenos e Animais	12
3.2.1. Serpentes	13
3.2.2. Camungongos	14
3.3. Plasma humano	14
3.4. Comitê de Ética	14
3.5. Caracterização bioquímica dos venenos	14
3.5.1. Determinação do teor protéico	14
3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	15
3.5.3. Perfil cromatográfico (HPLC-RP)	17
3.5.4. Determinação da sequência N-terminal	17
3.6. Caracterização enzimática dos venenos	17
3.6.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano	17
3.6.2. Índice de coagulação	18
3.6.3. Atividade caseinolítica	18
3.7. Caracterização farmacológica dos venenos	18
3.7.1. Toxicidade (DL ₅₀)	18
3.7.2. Atividade da crotamina	19
3.8. Análise estatística	20

4. RESULTADOS	21
4.1. Caracterização bioquímica dos venenos	22
4.1.1. Determinação do teor protéico	22
4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	23
4.1.3. Perfil cromatográfico (HPLC-RP)	32
4.2. Caracterização enzimática dos venenos	34
4.2.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano e índice de coagulação	34
4.2.2. Atividade caseinolítica	36
4.3. Caracterização farmacológica dos venenos	36
4.3.1. Toxidade (DL ₅₀)	36
4.3.2. Atividade da crotamina	38
5. DISCUSSÃO	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7. RESUMO	50
8. ABSTRACT	52
9. REFERÊNCIAS	54
10. ANEXOS	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Grupos, número de animais por grupo e concentrações inoculadas para a DL ₅₀	19
TABELA 2: Animais que apresentaram veneno com coloração amarela	23
TABELA 3: Animais que apresentaram presença da banda com peso molecular de 60 KDa	24
TABELA 4: Amostras de veneno que apresentaram perfil cromatográfico mais básico	32
TABELA 5: Comparação entre os tempos de coagulação do veneno referência e das amostras de veneno referente aos grupos de 1 a 7	35
TABELA 6: Comparação do índice de coagulação do veneno referência e do “pool” de veneno referente aos grupos de 1 a 7 de serpentes	35
TABELA 7: Comparação da atividade caseinolítica do veneno referência e do “pool” de veneno referente aos grupos de 1 a 7	36
TABELA 8: Caracterização das atividades tóxicas (DL ₅₀) das amostras de veneno referentes aos grupos 1 ao 7	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa da região de Botucatu e localização dos municípios limítrofes	10
FIGURA 2: Procedimentos para microchipagem e leitura do microchip	12
FIGURA 3: Extração de veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	13
FIGURA 4: Curva e equação padrão da albumina bovina	15
FIGURA 5: Teor protéico das amostras referentes aos grupos de 1 a 7	22
FIGURA 6: Perfil eletroforético do grupo 1	25
FIGURA 7: Perfil eletroforético do grupo 2	26
FIGURA 8: Perfil eletroforético do grupo 3	27
FIGURA 9: Perfil eletroforético do grupo 4	28
FIGURA 10: Perfil eletroforético do grupo 5	29
FIGURA 11: Perfil eletroforético do grupo 6	30
FIGURA 12: Perfil eletroforético do grupo 7	31
FIGURA 13: (A) Perfil cromatográfico de uma amostra crotanima-positiva, (b) Perfil cromatográfico de uma amostra crotanima-negativa	33
FIGURA 14: Atividade coagulante das amostras de veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> . (A) Coágulo de fibrina formado após incubação do plasma humano com veneno; (B) Detalhe da formação da rede de fibrina.	34

FIGURA 15: Atividade da crotamina de *Crotalus durissus terrificus*. (A) hipertonicidade das patas posteriores, (B) paralisia completa das patas posteriores de camundongos.

1.INTRODUÇÃO

1. Introdução

As serpentes são animais temidos pela maior parte da população do planeta, principalmente da metade ocidental, de cultura cristã. Na população influenciada pela cultura budista, a serpente é respeitada como animal sagrado, sendo símbolo de prosperidade (1). De forma geral, as serpentes representam o bem e o mal em diversas culturas, sendo consideradas como símbolos de força e poder (2).

No Brasil foram catalogadas até o ano de 2010 o total de 371 espécies de serpentes, divididas em 10 famílias (3), das quais cerca de 50 são peçonhentas e despertam interesse na Saúde Pública.

As serpentes da superfamília *Viperidae* estão distribuídas na Europa, África, Madagascar Região leste temperada da Ásia, sul da Ásia, Região australiana, Américas do Sul, Central e do Norte e Índia (4). A família *Viperidae* é formada pelos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*. O gênero *Bothrops* ocorre em todo território nacional enquanto *Lachesis* em áreas úmidas, em regiões de floresta e na Região Amazônica. Em contraste, o *Crotalus* não é encontrado nestas regiões e no litoral, preferencialmente em áreas secas (5).

A espécie *Crotalus durissus* é a mais amplamente distribuída, ocorrendo desde o sul do México até Uruguai e Argentina, em regiões com menos de 700m de altitude e em geral semi-áridas (6). Segundo Hoge e Romano-Hoge (5), no Brasil são encontradas cinco subespécies:

- *Crotalus durissus cascavella*;
- *Crotalus durissus colilineatus*;
- *Crotalus durissus marajoensis*;
- *Crotalus durissus ruruima*;
- *Crotalus durissus terrificus*.

A classificação de McDowell (7) propõe que a subespécie *Crotalus durissus terrificus* pertence à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*, gênero *Crotalus* e espécie *Crotalus durissus*

Durante o processo evolutivo as modificações osteológicas cranianas em ancestrais permitiram o desenvolvimento de um complexo mecanismo de inoculação de substâncias biologicamente ativas através do desenvolvimento de glândulas secretoras orais modificadas e da especialização de presas inoculadoras (8).

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas e peptídios que possuem diversas atividades biológicas, os quais compreendem cerca de 90 a 95% de seu peso seco (9). Também estão presentes outros componentes tais como, cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas, lipídios e aminoácidos de baixo peso molecular (10).

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* tem sido considerado como de pouca complexidade. Seu fracionamento por cromatografia de exclusão molecular evidencia cinco principais toxinas: Convulxina (11), Giroxina (12), Crotoxina (13), Inter-cro (14), e Crotamina (15).

A convulxina, com aproximadamente 70 Kilodaltons (kDa), se comporta como proteína homogênea quando examinada por cromatografia de gel filtração e imunoelektroforese (11). Quando administrada por via intravenosa em camundongos, a convulxina provoca dentro de 20 minutos uma breve fase de apnéia, seguida de perda de equilíbrio e convulsões. No envenenamento é responsável por convulsões, distúrbios respiratórios e circulatórios (16).

Primeiramente isolada por Barrio em 1961 (17), e posteriormente com técnicas de isolamento mais modernas por Alexander et al.(18), a giroxina pertence ao grupo das enzimas trombina-símile, sendo assim uma importante serinoprotease. Raw et al. em 1986 (19), determinaram por análise eletroforética que a giroxina apresenta uma massa molecular de 34 kDa, alta atividade coagulante com pH ótimo próximo de 8,0. Possuindo também atividade proteolítica sobre a cadeia A α do fibrinogênio, amidolítica e esterásica. Esta neurotoxina não é letal, mas causa uma síndrome nos animais, caracterizada por movimentos rotacionais em volta do eixo central do seu corpo, daí a origem do seu nome (17). A giroxina atua sobre o fibrinogênio humano e animal, atividade que pode ser observada a partir da incoagulabilidade sanguínea encontrada em casos graves de pacientes picados por serpentes do gênero *Crotalus* (20).

A fração do veneno mais bem conhecida do ponto de vista fisiopatológico é a crotoxina, que representa 40 a 60% do peso seco do veneno, constitui o seu principal componente tóxico (21) e também é a principal neurotoxina desta peçonha (22). Possui duas sub-unidades com ligação não covalente: crotapotina (ácida) com peso molecular entre 8,0 e 9,0 kDa e fosfolipase A₂ com peso molecular entre 14,5 e 16,0 kDa (23).

Laure (1990), mostrou um perfil cromatográfico com a presença de uma fração denominada Inter-cro, posicionada entre o complexo crotoxina e crotamina, por isso sendo considerada uma iso-crotoxina (14).

A crotamina, primeiramente isolada por Gonçalves em 1956 (24), possui peso molecular de 4,8 kDa, composta de 42 aminoácidos (25). É composta por nove lisinas e duas argininas, e extremamente básica, com p_i igual a 10,3 (24). A presença de seis cisteínas interligadas por ponte dissulfeto confere à crotamina alta estabilidade estrutural (26). Essa toxina se caracteriza pela ação miotóxica sobre células musculares esqueléticas, causando danos ou até sua morte. Estudos cromatográficos mostraram que a crotamina é composta de uma mistura de quatro isoformas, mas com duas principais (F22 e F32). Como as isoformas, quando associadas à proporção de 1:1, não produziram efeito cumulativo no aumento das contrações do músculo, concluiu-se que as isoformas possuem diferentes graus de afinidades pelas subunidade dos canais de sódio (27).

Ao contrário das outras frações, a crotamina encontra-se apenas na peçonha de *Crotalus durissus terrificus* de algumas regiões, tais como Argentina, Bolívia, e, no Brasil, no Norte do Paraná e uma parte do Estado de São Paulo (28).

Barrio e Vital Brazil (29) identificaram duas variedades regionais de veneno de de *Crotalus durissus terrificus* em função da presença ou não de crotamina:

Tipo I – (Brasil e Argentina)– “crotamina-positiva”: em camundongos e ratos, primeiramente induz ataques espasmódicos e rigidez muscular, posteriormente, hipotonia muscular e paralisia flácida.

Tipo II – (Brasil)– “crotamina-negativa”: produz apenas hipotonia muscular e paralisia flácida.

Gonçalves e Arantes (1956), demonstraram através de análises eletroforéticas que haviam amostras individuais de veneno de *Crotalus durissus terrificus* que possuíam ou não crotamina. Entre os que possuíam esta toxina ocorria uma grande variação dessa toxina no seu rendimento perfazendo de 9,6 a 53,7% do veneno bruto (30).

Observando a paralisia dos membros posteriores de camundongos injetados por via intraperitoneal com veneno, Schenberg (31,32) mostrou que havia um padrão geográfico, no Estado de São Paulo quanto às populações de

casavéis crotamina-positivas e crotamina-negativas, em que as serpentes da Região Nordeste do Estado eram predominantemente positivas, corroborando os resultados obtidos por Barrio e Vital Brazil (29). Posteriormente, essas observações foram confirmadas no que se refere aos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (33), nordeste de São Paulo (29) e Minas Gerais (34) que se mostraram crotamina-negativas, com exceção de algumas provenientes do Ceará. Em contraste com a variação encontrada no Brasil (31,33,34), todos os espécimes de serpentes provenientes da Argentina apresentaram venenos crotamina-positivos (32).

Por outro lado, além da variação intra-específica exemplificada pela ausência ou presença da crotamina, há ainda a variação ambiental que, em numerosos estudos, tem evidenciado uma significativa variação inter e intra-específica na composição e nos efeitos dos venenos de serpentes (35). Estas variações apresentam consequências clínicas e implicações terapêuticas como o descrito por Warrel (36), que indicou diferenças nos quadros clínicos de pacientes picados por serpentes de diferentes idades. Atualmente, estudos envolvendo venenos de serpentes têm servido à sistemática até mesmo em nível filogenético, permitindo determinar novas linhas de segregações por meio do estudo do veneno de diferentes populações (37).

Estudos prévios têm documentado uma variação geográfica e ontogênica nas atividades bioquímica e farmacológica dos venenos de *Crotalus durissus* da Costa Rica e da Guatemala, quando comparadas com várias subespécies do Brasil. Gutiérrez *et al.* (38), mostraram que atividades do veneno de recém-nascidos de *Crotalus durissus durissus* da Costa Rica apresentam grande similaridade às de espécimes de *Crotalus durissus terrificus* do Brasil, com elevada atividade letal e miotóxica e baixa atividade proteolítica, hemorrágica e edematogênica quando comparado com o adulto de *Crotalus durissus terrificus*, evidenciando que o espécime adulto apresenta menor concentração de crotoxina. Também foi mostrado por Saravia *et al.*(39) que os venenos de *Crotalus durissus terrificus* (Brasil), *Crotalus durissus cumanensis* (Venezuela) e *Crotalus durissus durissus* recém-nascidos (Costa Rica) quando comparados com o veneno dos exemplares de *Crotalus durissus durissus* adultos (Costa Rica) apresentaram maior atividade letal e miotóxica. Por outro lado, os venenos dos espécimes de *Crotalus durissus durissus* e *Crotalus durissus cumanensis* induziram atividade

hemorrágica, o que não foi observado nos de espécimes de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus durissus* recém-nascidos.

Estes resultados vêm corroborar estudos desenvolvidos por Lomonte *et al.* (40) que, avaliando o veneno de espécimes recém-nascidos e adultos de *Crotalus durissus durissus*, encontrou alta atividade edematogênica e hemorrágica no do adulto mas não no do recém-nascido e, por outro lado, o espécime recém-nascido apresentou elevada letalidade e atividade hemolítica quando comparado ao adulto, demonstrando uma grande variação ontogênica. Outras observações acerca da variação ontogênica e geográfica foram feitas em espécimes de *Crotalus atrox* nos Estados Unidos (41), onde os exemplares do sudeste apresentaram maior letalidade quando comparados com os do nordeste. Também foram observadas diferenças na composição protéica do veneno do leste em comparação ao Oeste, e veneno de jovens do norte do Texas apresentaram atividade letal maior que os indivíduos adultos da mesma região, mas com menor atividade proteolítica. Os venenos se tornaram equiparados aos quinze meses de idade do filhote, quando se observou declínio da atividade letal e a atividade proteolítica se aproximou ao nível do adulto.

A variação geográfica na composição dos venenos também foi observada em outras espécies de cascavéis, tais como *Crotalus viridis viridis*, *Crotalus adamanteus*, *Crotalus horridus* (42) e *Crotalus scutulatus scutulatus* (43). A comparação do veneno de animais provenientes de Tucson (Norte de Arizona), apresentaram uma DL_{50} de 2,0 a 6,0 mg/kg de peso corporal de camundongo, com o de espécimes provenientes do Sudoeste desse Estado, com DL_{50} de 22,0 a 46,0 mg/kg, correspondendo aos valores encontrados por Glenn e Straight (44).

Essa variação na composição dos venenos tem sido associada com fatores como origem geográfica (45), estação do ano (46), sexo (47), idade (48), dieta (49), e pode ser influenciada pelo tempo decorrido entre duas extrações consecutivas de veneno (50).

Assim, o conhecimento das variações dos venenos de serpentes é de extrema importância para a confecção de antivenenos com maior especificidade e de maior eficácia nos tratamentos de envenenamentos em humanos (35).

2.OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

A presente pesquisa teve como objetivo geral caracterizar o atual veneno de *Crotalus durissus terrificus* da micro-região de Botucatu (São Paulo) pela determinação de suas propriedades bioquímicas, farmacológicas e enzimáticas. Para isso, foi realizada a comparação de venenos de serpentes recém capturadas da natureza com o de serpentes de cativeiro, para verificar a influência da variação sexual, ambiental e ontogenética na composição do veneno, bem como o tempo decorrido de cativeiro.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair e liofilizar individualmente veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* de todos os grupos do estudo;
- Caracterização individual e/ou do “pool” de venenos por meio das:
 - Caracterização bioquímica: Determinação da dosagem protéica, determinação do perfil eletroforético e cromatográfico;
 - Caracterização enzimática: Atividade coagulante, determinação do índice de coagulação e atividade proteolítica sobre a caseína;
 - Caracterização farmacológica: Atividade tóxica e atividade da crotamina;

3.MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e métodos

3.1. Descrição da área de estudo

O estudo foi desenvolvido na Região de Botucatu, localizada na Região Centro-Oeste do Estado de São Paulo – Brasil De acordo com a Constituição brasileira de 1988 (51), a micro-região é constituída de um agrupamento de municípios limítrofes. Assim, a Região de Botucatu é constituída pelos municípios de Anhembi, Bofete, Pardinho, Itatinga, Avaré, Pratânia, São Manoel, Dois Córregos e Santa Maria da Serra, além de Botucatu (Figura 1). Além destes, foram adicionados os municípios de Porangaba, Laranjal Paulista e Conchas.



Figura 1- Mapa do município de Botucatu e localização dos municípios limítrofes (52)

A área em que foi realizado o estudo tem como ponto central a cidade de Botucatu localizada a $22^{\circ}53'09''$ de latitude sul, $48^{\circ}26'42''$ de longitude oeste, tendo ao norte o município de Santa Maria da Serra, localizado à latitude de $22^{\circ}34'02''$ sul e longitude de $48^{\circ}09'38''$ oeste; ao leste o município de Anhembi localizado a uma latitude de $22^{\circ}47'21''$ sul e longitude de $48^{\circ}07'22''$ oeste; ao sul o município de Pardinho, à latitude $23^{\circ}04'52''$ sul e longitude de $48^{\circ}22'25''$

oeste; e a oeste o município de Avaré localizada à latitude de 23°05'56" sul e longitude de 48°55'33" (52).

A Região de Botucatu apresenta-se com formações naturais (cuesta, bacias hidrográficas, solos) e climas marcantes, que interferem na formação de sua paisagem vegetal.

O patrimônio natural em parte constituído por espessa sucessão de rochas paleozóicas e mesozóicas, e pela própria cuesta, que é uma feição geomorfológica (da forma do relevo), tem enorme importância ambiental. Por sua porosidade, as rochas formadoras da Região de Botucatu, constituem importante aquífero (Aquífero Guaraní) (53). Seu relevo abrange regiões distintas: uma região no topo da cuesta de Botucatu, com altitudes oscilando entre 700 e 950 metros, e uma região na Depressão Periférica, com altitudes entre 400 e 600 metros (54).

A vegetação nativa total da Região de Botucatu abrange 10,45% de sua área total, no topo da cuesta, cerrado com manchas de mata. Por outro lado o município encontra-se dentro da área de domínio da Mata Atlântica, em uma região considerada de transição fitogeográfica, com influências da mata fluvial perenifólia da costa atlântica, da mata mista latifoliada com araucária do cerrado, do chaco e do pampa (52,53). Além disso, a Região de Botucatu tem como característica a presença de grandes áreas de cultivo de cana-de-açúcar, citrus e madeira de reflorestamento, bem como de pastagens.

O enquadramento das condições climáticas do município de Botucatu não é tarefa fácil devido à heterogeneidade do seu relevo, pois parte do município localiza-se na Depressão Periférica e parte no Planalto Ocidental, originando, assim, um considerável gradiente de altitude. Contudo, considerando os dois fatos regionais (Depressão Periférica e Planalto Ocidental), o município de Botucatu recebeu a classificação climática pelo método de Köppen, de clima temperado quente úmido. No entanto, pela classificação de Thornthwaite, em função de uma pequena diferença em função do índice de umidade, o caracterizou como clima úmido com pequena deficiência hídrica (55) (Anexo I).

3.2. Venenos e Animais

Os venenos foram obtidos de serpentes da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, recebidas pelo CEVAP, provenientes da área de abrangência do estudo e devidamente microchipadas, além das já mantidas no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP – CEVAP, localizado na Fazenda Experimental Lageado na UNESP, Campus de Botucatu.

Para a realização da microchipagem foram utilizados transponders ou "microchips", que são micro-circuitos eletrônicos constituídos de um código exclusivo e inalterável e encapsulados em bio-vidro cirúrgico, medindo 11,2 mm de comprimento por 1,2 mm de circunferência, que foram implantados com o auxílio de um aplicador que se assemelha a uma seringa (figura 2).

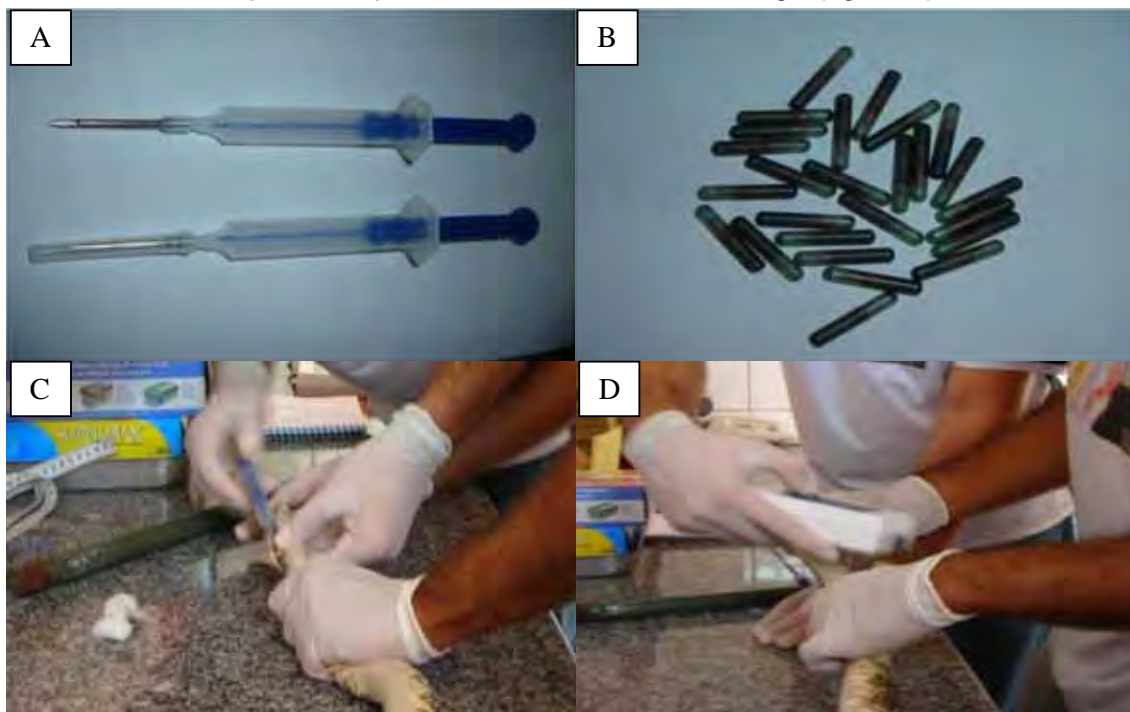


Figura 2 – Aplicador (A); Microchips (B); Implantação dos microchips na região esquerda ventro-lateral (C); Procedimento de leitura do microchip (D).

As amostras individuais de veneno foram coletadas em microtubos estéreis do tipo eppendorff®, segundo metodologia de extração desenvolvida pela equipe técnica do Laboratório de Extração de Veneno do CEVAP, com auxílio de gás carbônico (CO₂) para a sedação dos animais (Figura 3). Após as extrações, os venenos foram liofilizados, aliquotados e estocados em freezer a - 20°C até o momento de sua utilização.



Figura 3 – Extração do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

3.2.1. Serpentes

As serpentes incluídas no estudo foram divididas em sete grupos, a saber:

Grupo 1 : 16 machos adultos (mantidos em regime de quarentena*);

Grupo 2 : 12 machos adultos (com três anos de cativeiro**);

Grupo 3 : 16 fêmeas adultas (mantidas em regime de quarentena*);

Grupo 4 : 16 fêmeas adultas (com três anos de cativeiro**);

Grupo 5 : 16 machos adultos (recém-chegados da natureza***);

Grupo 6 : 16 fêmeas adultas (recém-chegados da natureza***);

Grupo 7 : 18 filhotes (nascidas no CEVAP e não alimentadas).

*Serpentes mantidas em regime de quarentena e alimentadas.

**Serpentes mantidas no serpentário do CEVAP por três anos.

*** Serpentes recém-chegadas e não alimentadas.

Para a formação do grupo de filhotes, foram utilizados neonatos de *Crotalus durissus terrificus* (com um mês de idade) nascidos de serpentes provenientes da região do estudo, em regime de quarentena no CEVAP, totalizando três ninhadas com seis animais cada uma.

As tabelas de 1 a 6, presentes no anexo 2, descrevem as serpentes incluídas no estudo, bem como seu número de microchip, número de registro no CEVAP, cidade de procedência e biometria.

3.2.2. Camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, adultos, pesando entre 18 e 22 gramas, criados e mantidos pelo Biotério Central da UNESP – Botucatu e pelo Biotério de Experimentação do CEVAP, para os testes de toxicidade e de atividade da crotamina.

3.3. Plasma humano

O plasma humano utilizado para os experimentos de coagulação foi obtido de doadores voluntários, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 18 a 42 anos, que se dispuseram a doar sangue para o Banco de Sangue da Divisão Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

As amostras de sangue foram coletadas de doadores sadios em presença de citrato de sódio a 3,8%, na proporção de 9:1 e centrifugadas a 2500 xg a 4°C por 15 minutos para a obtenção do plasma.

3.4. Comitê de Ética

O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em 26 de março de 2009, sob o protocolo numero 724 (anexo 3).

3.5. Caracterização bioquímica dos venenos

3.5.1. Determinação da dosagem protéica

A dosagem de proteínas foi determinada pelo teor de proteínas totais de cada um dos venenos, segundo o método descrito por Bradford (56). Inicialmente, foi determinada em duplicata a curva padrão de albumina bovina (Sigma-USA) e a correspondência entre os valores obtidos nas diferentes concentrações dentro de um intervalo de 0,0625 a 1,0000 mg/mL (na razão de 1:2) como foi demonstrado na figura 4.

As amostras foram preparadas utilizando 100 µL de uma solução de 1mg/mL de veneno, com 3,0 mL do reagente de Bradford para cada amostra de veneno. Para o branco foi feito com 100 µL de solução fisiológica 0,95% com adição de 3,0 mL do reagente. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm (SP-220, Bioespectro®).

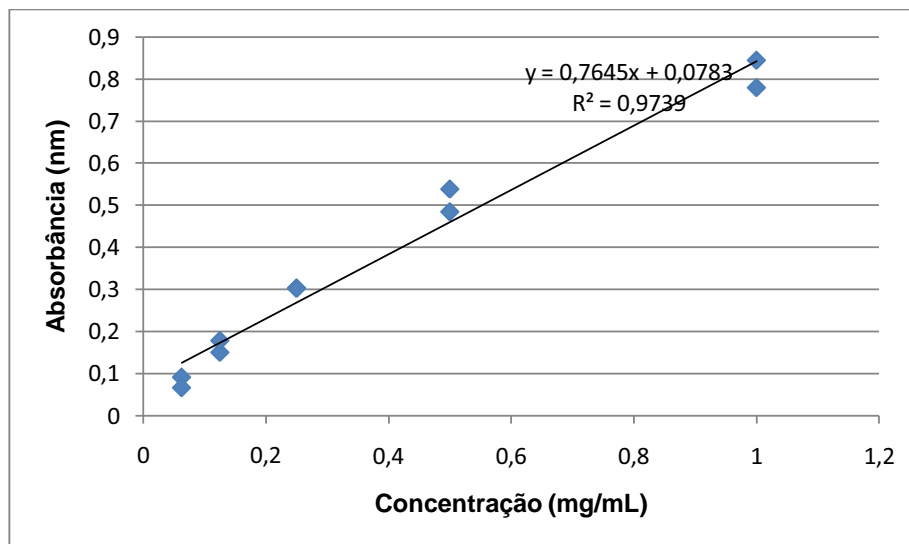


Figura 4 – Curva e equação padrão da albumina bovina utilizada neste estudo.

3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS (SDS-PAGE) em um sistema desnaturante e reduzido, foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli (57).

Para o gel de separação foram utilizadas as seguintes soluções:

- Tampão de separação Tris-HCl pH 8,8;
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Água destilada;
- Acrilamida:Bis 30,0:0,8 (Sigma Chem. Co);
- Persulfato de amônio (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Temed (N',N',N',N' - tetrametilenodiamino) (Sigma Chem. Co).

Para o gel de empilhamento (4%) foram utilizados:

- Tampão de empilhamento Tris-HCl pH 6,8;
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Água destilada;

- Acrilamida:Bis 30,0:08 (Sigma Chem. Co);
- Persulfato de amônio (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Temed (N',N',N',N'- tetrametilenodiamino) (Sigma Chem. Co).

Uma solução contendo Tris-base, glicina e SDS 10% com pH 8,6 foi utilizada como tampão de corrida para o cátodo e a mesma solução para o ânodo.

Para as amostras foram utilizados 80µL de uma solução-mãe contendo 1mg/mL do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, que foram dissolvidas em 20µL do tampão de amostra constituído por:

- β-mercaptoetanol (Sigma Chem. Co);
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) 10%;
- Tampão de empilhamento Tris-HCl pH 6,8;
- Glicerol;
- Azul de bromofenol (Sigma Chem. Co);
- Água destilada.

Em seguida, as amostras foram aquecidas por cinco minutos a 70°C. A eletroforese foi conduzida a uma voltagem constante de 150V, com a amperagem aberta (corrente variável), por 12 minutos. Após o término desta corrida, a fonte foi programada para uma voltagem de 200V, com a amperagem aberta por 40 minutos até o indicador azul de bromofenol alcançar a porção inferior do gel.

Terminada a migração das proteínas, o sistema foi desligado e o gel foi transferido para um recipiente contendo a solução corante composta por Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma Chem. Co), metanol, água destilada e ácido acético. Este gel foi corado por 40 minutos e então descorado, também por 40 minutos, com uma solução contendo ácido acético, etanol comercial e água destilada. Esta solução foi trocada periodicamente até que as bandas fossem visualizadas.

As imagens foram trabalhadas usando o programa Microsoft Office Picture Manager e apenas ajustes finos como brilho e contraste foram utilizados.

O peso molecular foi estimado pela comparação com o padrão de peso molecular Kaleidoscope (Bio-Rad Co).

3.5.3 Perfil cromatográfico HPLC – RP

O perfil cromatográfico foi realizado por meio HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em coluna de fase reversa C8 (50,0 x 4,6mm) em um sistema Shimadzu Proeminence 20A, com detecção por PDA (arranjo de diodos). A coluna foi equilibrada nos solventes de corrida (solvente A: 0,1% TFA (Ac. Trifluoroacético); solvente B: 90% acetonitrila com 0,1% de TFA), e a eluição foi feita com gradiente de concentração de 20% do solvente B por dois minutos e em seguida de 20 a 70% de B em 10 minutos com um fluxo de 1,2mL/min durante 25 minutos. Os picos foram monitorados através da determinação da absorvância a 214nm.

3.5.4 Determinação da sequência N-terminal

A análise da sequência N-terminal da serinoprotease purificada nativa foi realizada em um sequenciador automático de proteínas da Shimadzu (modelo PPSQ-23A). Uma solução com aproximadamente 1mg/mL da enzima foi aplicada no sequenciador e sua sequência foi determinada pelo método de degradação de Edman (58).

Após a determinação da sequência, foi comparada a sua homologia de aminoácidos com outras anteriormente sequenciadas e obtidas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As seqüências foram analisadas por alinhamento usando programa BLAST (59). Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

3.6. Caracterização enzimática dos venenos

3.6.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano

A atividade foi realizada utilizando 200 µL de plasma humano citratado incubados em 100µL do “pool” de veneno na concentração de 1,0 mg/mL. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 37°C e o tempo de formação da rede de fibrina foi cronometrado. Para cada amostra de veneno, o teste foi realizado em duplicata, sendo considerada a mediana dos valores obtidos.

3.6.2. Índice de coagulação

Para comparação das atividades coagulantes das amostras foram calculados os índices coagulantes (I.C.), definidos pela equação (60) e expressada em porcentagem:

$$I.C. = \frac{1000}{T.C.}$$

Onde: T.C. é o tempo de coagulação, em segundos, obtido por uma amostra de veneno em uma dada concentração.

3.6.3. Atividade caseinolítica

A hidrólise da caseína pelo “pool” de veneno total de cada grupo, foi avaliada utilizando-se protocolo descrito por Kunitz (61). Em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 9,0, foi adicionado o volume de proteína com a concentração desejada (10 a 60 µg), sendo completado para volume final de 250µL (amostra + tampão). Adicionaram-se então, 750µL de caseína a 1% totalizando um volume de 1000µL, os quais foram incubados por 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 1,5mL de ácido tricloroacético (TCA) a 30%.

Os produtos de proteólise, presentes no sobrenadante obtido, foram aferidos pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 280nm após centrifugação a 1600 xg por 20 minutos. Uma unidade de atividade caseinolítica por minuto corresponde à mudança de 0,001 na absorbância.

3.7. Caracterização farmacológica dos venenos

3.7.1. Toxicidade

A determinação da atividade tóxica do “pool” de veneno de cada um dos sete grupos utilizados foi realizada pelo cálculo da dose letal 50%, que é aquela capaz de levar a óbito 50% dos animais do experimento (DL₅₀). Para tal, foram utilizados 50 camundongos Swiss machos, com pesos entre 18 e 22 gramas, divididos em cinco grupos contendo 10 animais cada um, mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha de pinho, com alimentação e água *ad libitum*.

Foram inoculados 500µL por animal, por via intraperitoneal, de uma solução composta de veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e solução

salina a 0,95%. A razão da variação das quantidades de veneno entre os cinco grupos foi de 1:2 (tabela 1).

Tabela 1: Grupos de camundongos, número de animais por grupo e concentrações inoculadas para a DL₅₀

Grupos	Nº de Animais por grupo	µg de veneno p/ 12 animais	Volume (mL) de veneno a 0,1mg/mL/animal
1	10	1,250	0,0104
2	10	1,500	0,0125
3	10	1,800	0,0150
4	10	0,216	0,0180
5	10	0,259	0,0216

Após a inoculação, os animais foram mantidos em observação e os óbitos ocorridos foram registrados após 48 horas. Os resultados foram analisados pelo teste de Probit (62).

3.7.2. Atividade da crotamina

A atividade da crotamina é caracterizada pela ação miotóxica sobre células musculares esqueléticas, causando paralisia e espasmos nos membros posteriores.

Essa atividade foi determinada segundo método padronizado pela Farmacopéia Brasileira (63), utilizando três grupos de seis camundongos cada um:

- Grupo 1: Controle (Solução salina);
- Grupo 2: Veneno crotamina positiva;
- Grupo 3: Veneno crotamina negativa.

O método consistiu na inoculação de 0,5 mL por via intraperitoneal, na concentração de 250µg/animal de veneno de *Crotalus durissus terrificus* crotamina positiva (G2) e negativa (G3), previamente identificados pelas análises eletroforéticas e cromatográficas. O grupo controle recebeu 0,5 mL de solução salina. Os animais foram observados por 30 minutos após inoculação e foi considerado positivo quando houve aparecimento de paralisia ou espasmos dos membros posteriores durante a observação.

3.8. Análise estatística

Os testes estatísticos utilizados para análise foram o teste paramétrico ANOVA, para a análise dos resultados dos perfis protéicos, e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para análise comparativa dos resultados das atividades coagulantes e caseinolítica. Por fim, o pós teste utilizado foi Dunn's e Tukey para identificação dos grupos que apresentaram diferenças significativas, com o auxílio do programa GraphPad InStat (Programs GraphPad InStat tm, version 2.01).

As diferenças foram consideradas significativas utilizando-se um erro tipo α igual ou menor que 0,05.

4.RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Caracterização bioquímica dos venenos

4.1.1. Determinação da dosagem protéica

A análise do perfil protéico das amostras do veneno de *Crotalus durissus terrificus* não apresentou diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de I a VI (adultos), os quais obtiveram uma média de 75% de proteína, mas que apresentaram diferença ($p < 0,01$) quando comparados com o grupo 7 (filhotes). Estes resultados demonstrando que não houve perda protéica no veneno durante o tempo decorrido de cativeiro, mas apresentando sim, diferença na quantidade de proteína entre filhotes e adultos, conforme figura a 5.

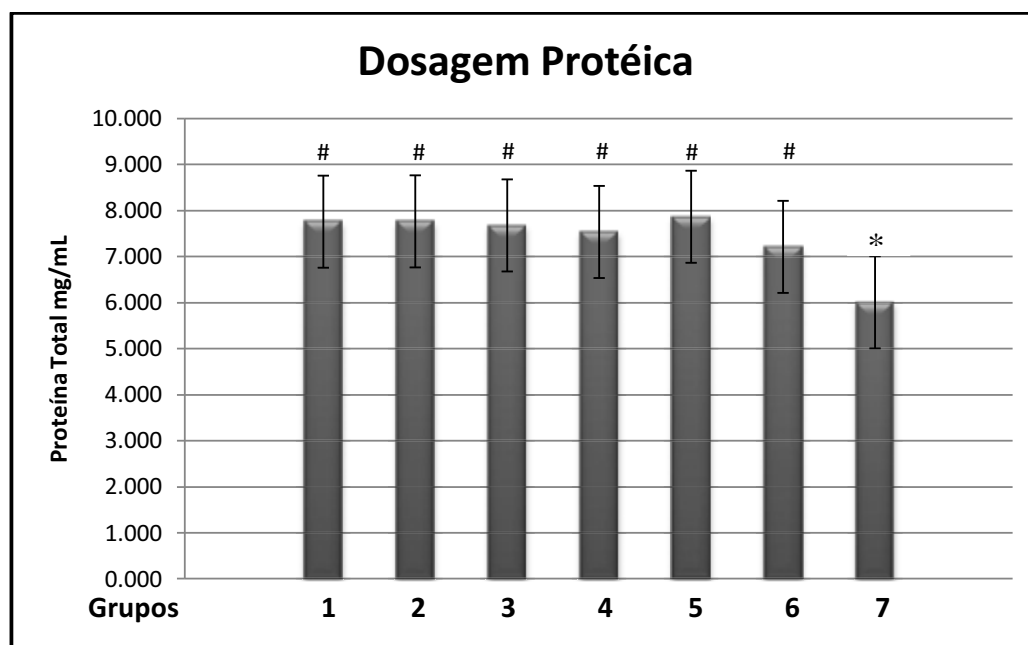


Figura 5 – Comparação das dosagens protéicas das amostras de veneno de *Crotalus durissus terrificus*. G1:16 machos adultos em quarentena; G2:12 machos adultos com três anos de cativeiro; G3:16 fêmeas adultas em quarentena; G4:16 fêmeas adultas com três anos de cativeiro; G5:16 machos adultos recém-chegados da natureza; G6:16 fêmeas adultas recém-chegadas da natureza; G7:18 filhotes nascidas no CEVAP e não alimentadas. Os grupos de 1 a 6 (#) indicaram médias que não diferem entre si, $p < 0,05$, e o grupo 7 (*) indicou média que diferiu dos demais grupos, $p < 0,001$.

4.1.2. Eletroforese em gel da poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise do perfil de migração eletroforética das amostras individuais do veneno de *Crotalus durissus terrificus* apontou para perfis semelhantes (Figuras 6 a 12).

Todas as amostras puderam ser divididas em dois grupos: venenos crotamina-positiva e venenos crotamina-negativa, proteína esta com 4,8 kDa. Não foi observada relação com a distribuição nos grupos, no entanto, não foi realizada individualmente para o grupo 7, que devido a quantidade de veneno produzida pelos filhotes foi feito a partir de um “pool” de veneno.

Dentro de todas as amostras experimentadas foi observado que a variação crotamina-positiva nos venenos ocorreu em 32 amostras, representando 35%, e a variação crotamina-negativa ocorreu em 61 amostras, totalizando 65% dos venenos.

Das 92 amostras de veneno utilizadas para o experimento, 13 apresentaram coloração amarela, totalizando 14% dos venenos, distribuídos dentro dos grupos de 1 a 6, conforme tabela 2. Todos os animais que apresentaram coloração amarela se mostraram também crotamina-negativos.

Tabela 2: Distribuição das serpentes *Crotalus durissus terrificus* que apresentaram veneno com coloração amarela, nos 6 grupos estudados.

Grupos	Serpente N ^o
01	07, 11, 14
02	01
03	01, 06
04	06
05	06, 07
06	01, 04, 10, 11

As bandas protéicas mais observadas compreenderam os pesos moleculares aproximados a 5 kDa, 20 kDa, 30 kDa e 80 kDa. Além destas bandas apresentadas pela maioria das amostras, houve também outra banda observada em 13 amostras incluindo o veneno referência do Instituto Butantan,

que tratava-se de uma proteína com peso molecular aproximado de 60 kDa, que totalizou 14% dos venenos estudados (Tabela 3).

Com a observação do aparecimento da banda de peso molecular de 60 kDa, houve uma sobreposição dos grupos de amostras com veneno amarelo, crotamina-negativa e as que apresentaram a presença da mesma (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição das serpentes *Crotalus durissus terrificus* que apresentaram a presença da banda com peso molecular de 60 kDa, dentro dos grupos estudados.

Grupos	Serpentes N ^o
Referência	01(+)
01	07 ^(a) , 11 ^(a) , 14 ^(a)
03	02(-), 06 ^(a) , 08(-)
05	04(-), 06 ^(a)
06	01 ^(a) , 04 ^(a) , 09(+), 10 ^(a) , 11 ^(a)

Onde:^(a) Amostras de veneno amarelo;(+) Amostras crotamina-positiva;(-) Amostras crotamina-negativa e sua distribuição dentro dos grupos.

Apenas a amostra 7, do grupo 6, apresentou outras duas bandas, com peso aproximado de 23 kDa e 42 kDa (figura 6, amostra 7).

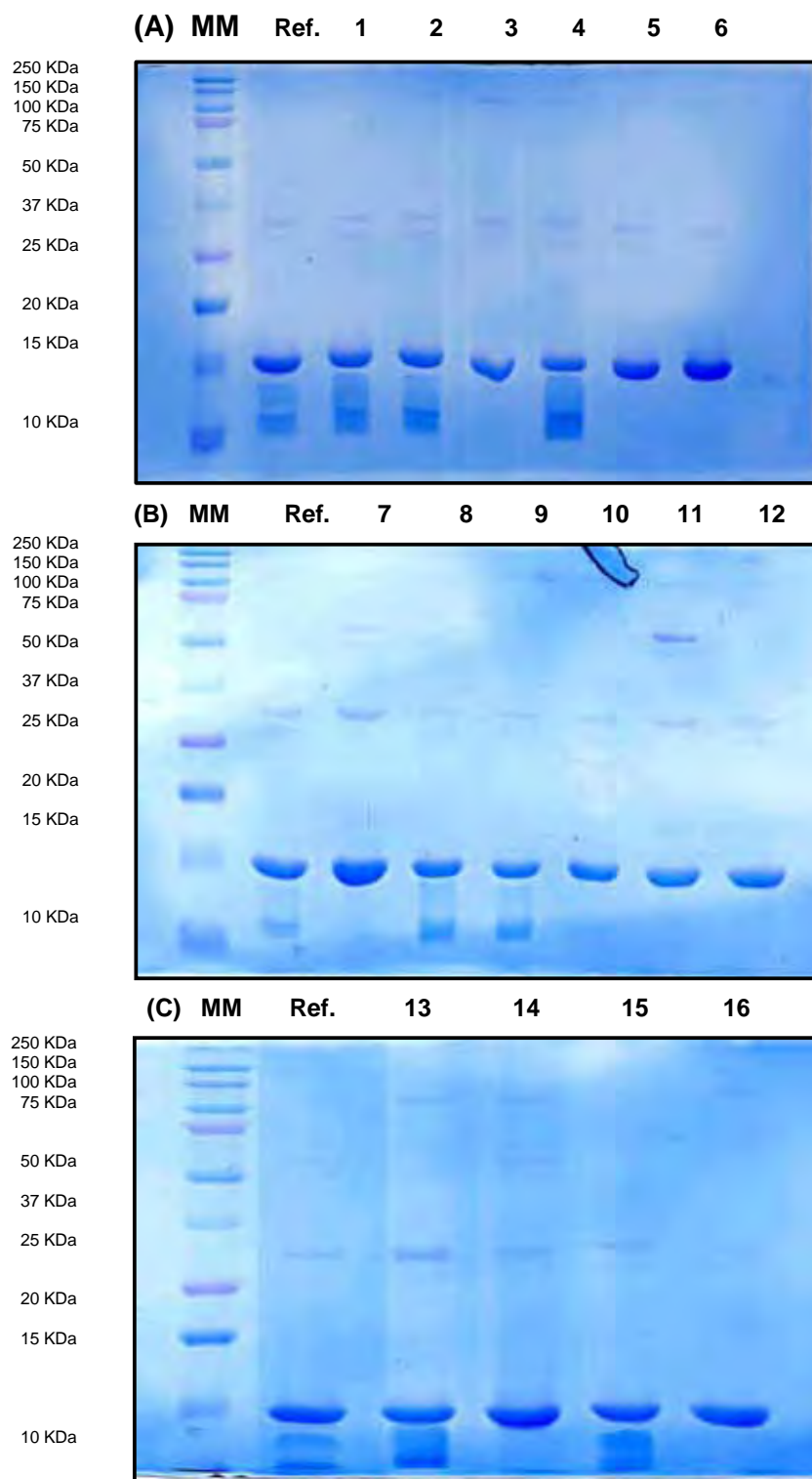


Figura 6 – Análise eletroforética em SDS-PAGE 15%, sob condições desnaturantes e reduzidas, das 16 amostras individuais provenientes do Grupo 1. (MM) Marcador molecular, (Ref.) Veneno Referência Nacional, (A) Serpentes de nº 1 a 6, (B) Serpentes de nº 7 a 12, (C) Serpentes de nº 13 a 16.

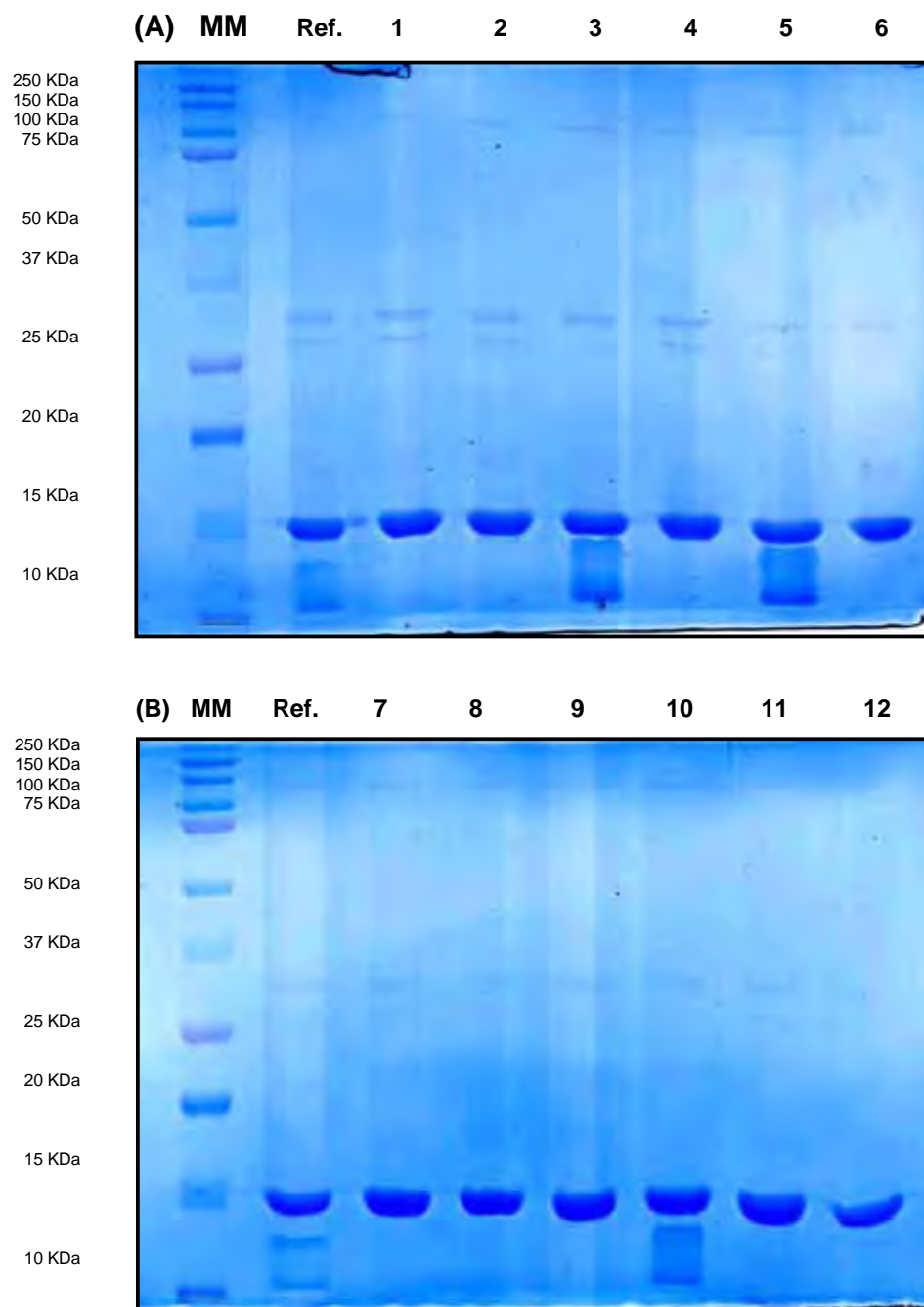


Figura 7 – Análise eletroforética em SDS-PAGE 15%, sob condições desnaturantes e reduzidas, das 16 amostras individuais provenientes do Grupo 2. (MM) Marcador molecular, (Ref.) Veneno Referência Nacional, (A) Serpentes de nº 1 a 6, (B) Serpentes de nº 7 a 12.

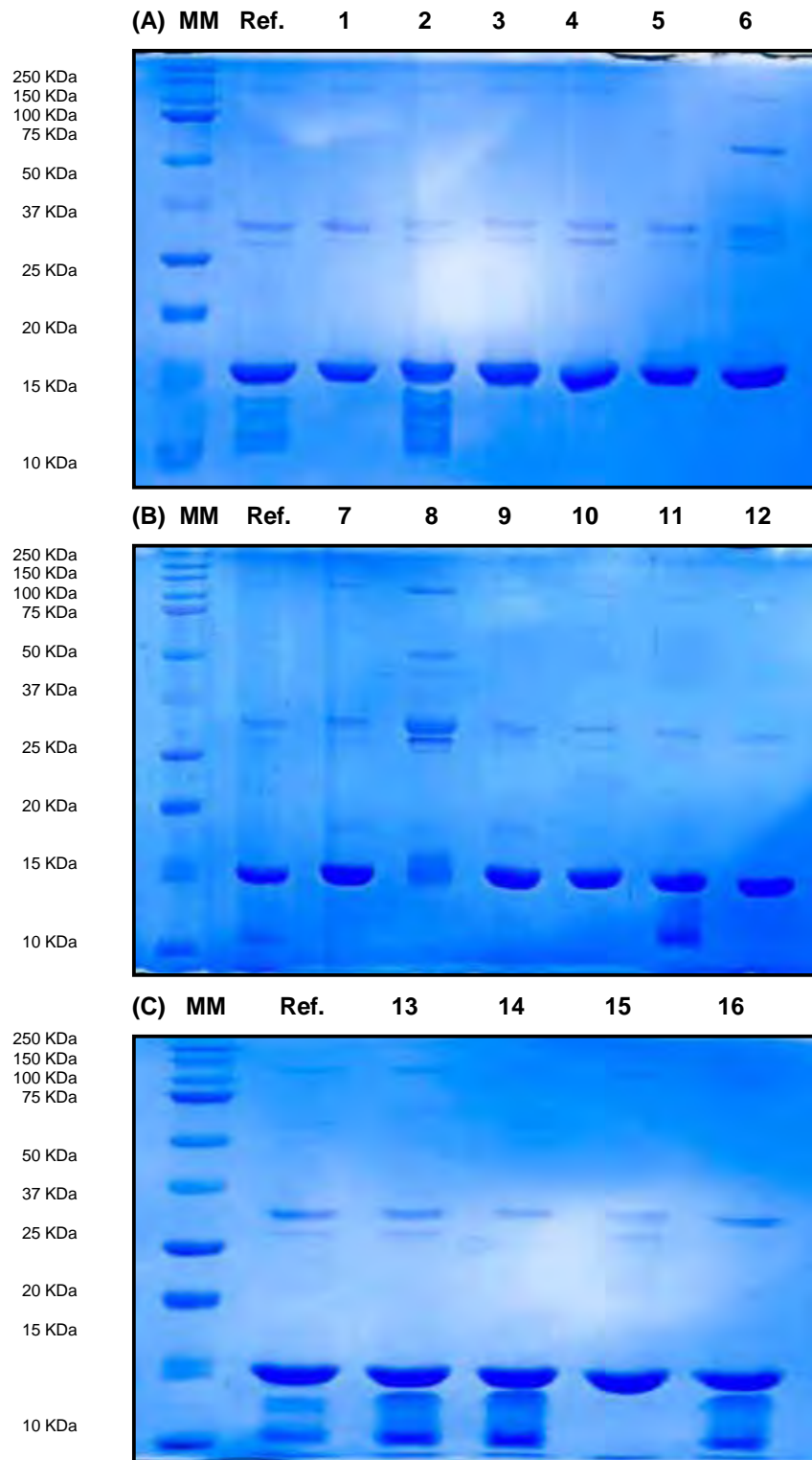


Figura 8 – Análise eletroforética em SDS-PAGE 15%, sob condições desnaturantes e reduzidas, das 16 amostras individuais provenientes do Grupo 3. (MM) Marcador molecular, (Ref.) Veneno Referência Nacional, (A) Serpentes de nº 1 a 6, (B) Serpentes de nº 7 a 12, (C) Serpentes de nº 13 a 16.

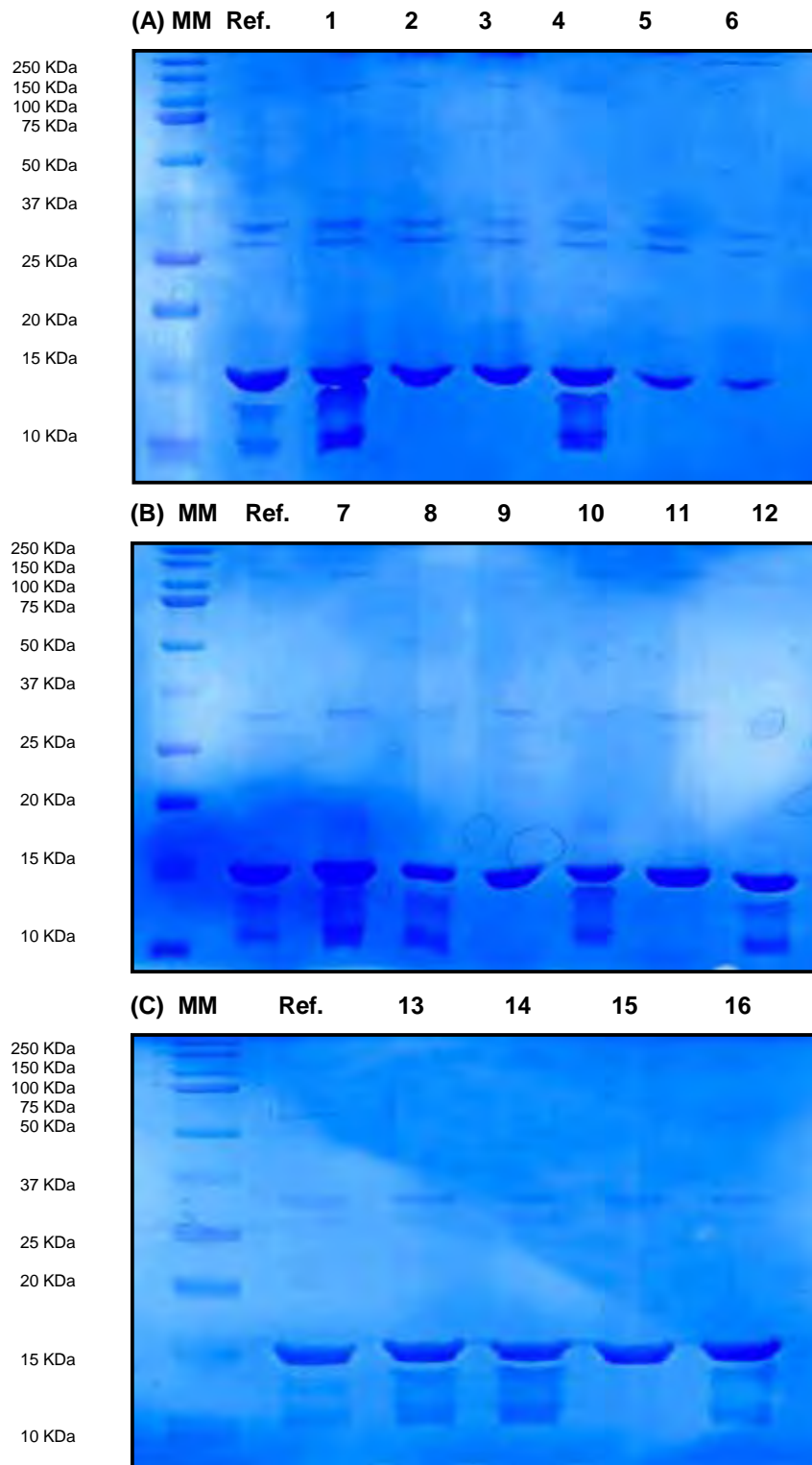


Figura 9 – Análise eletroforética em SDS-PAGE 15%, sob condições desnaturantes e reduzidas, das 16 amostras individuais provenientes do Grupo 4. (MM) Marcador molecular, (Ref.) Veneno Referência Nacional, (A) Serpentes de nº 1 a 6, (B) Serpentes de nº 7 a 12, (C) Serpentes de nº 13 a 16.

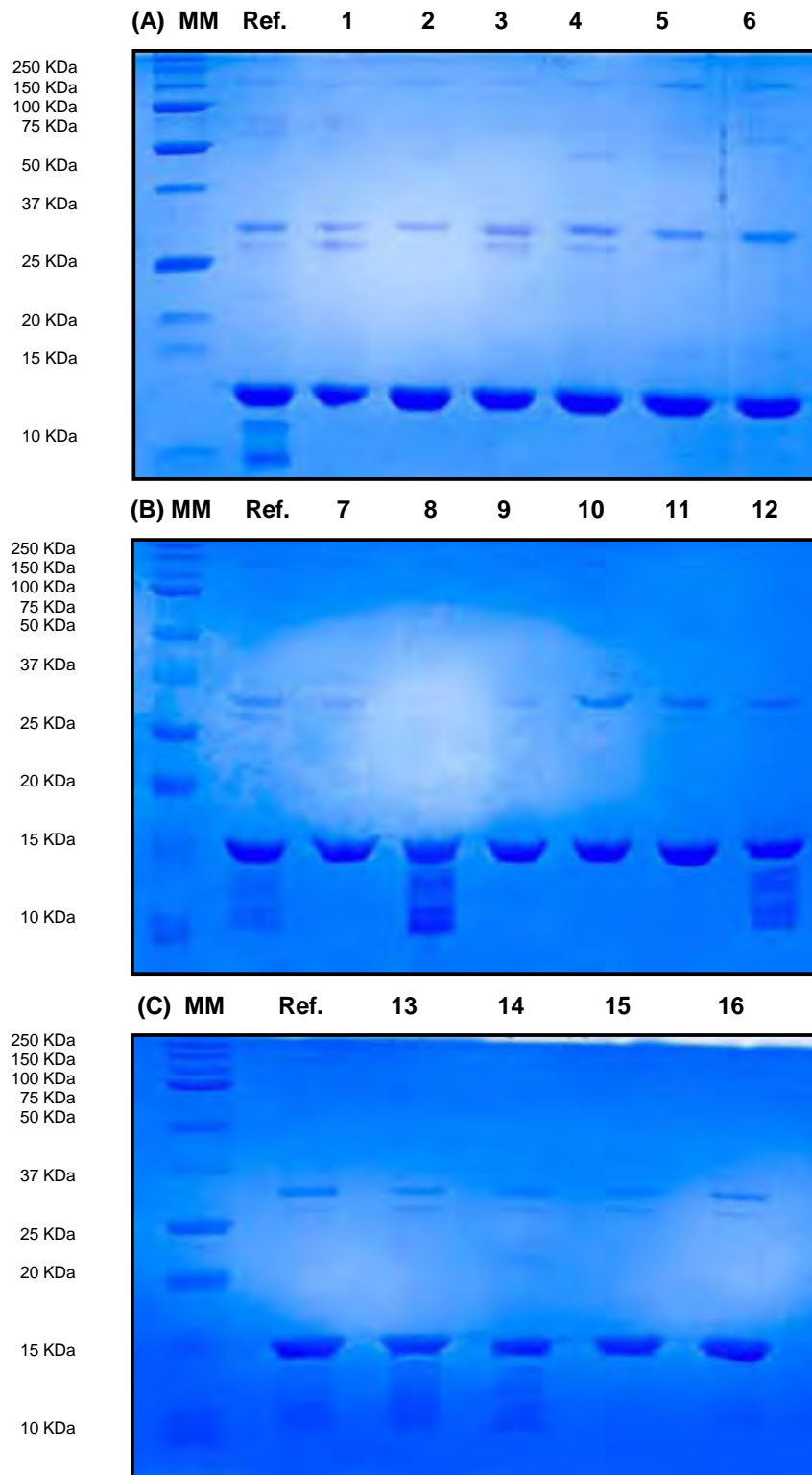


Figura 10 – Análise eletroforética em SDS-PAGE 15%, sob condições desnaturantes e reduzidas, das 16 amostras individuais provenientes do Grupo 5. (MM) Marcador molecular, (Ref.) Veneno Referência Nacional, (A) Serpentes de nº 1 a 6, (B) Serpentes de nº 7 a 12, (C) Serpentes de nº 13 a 16.

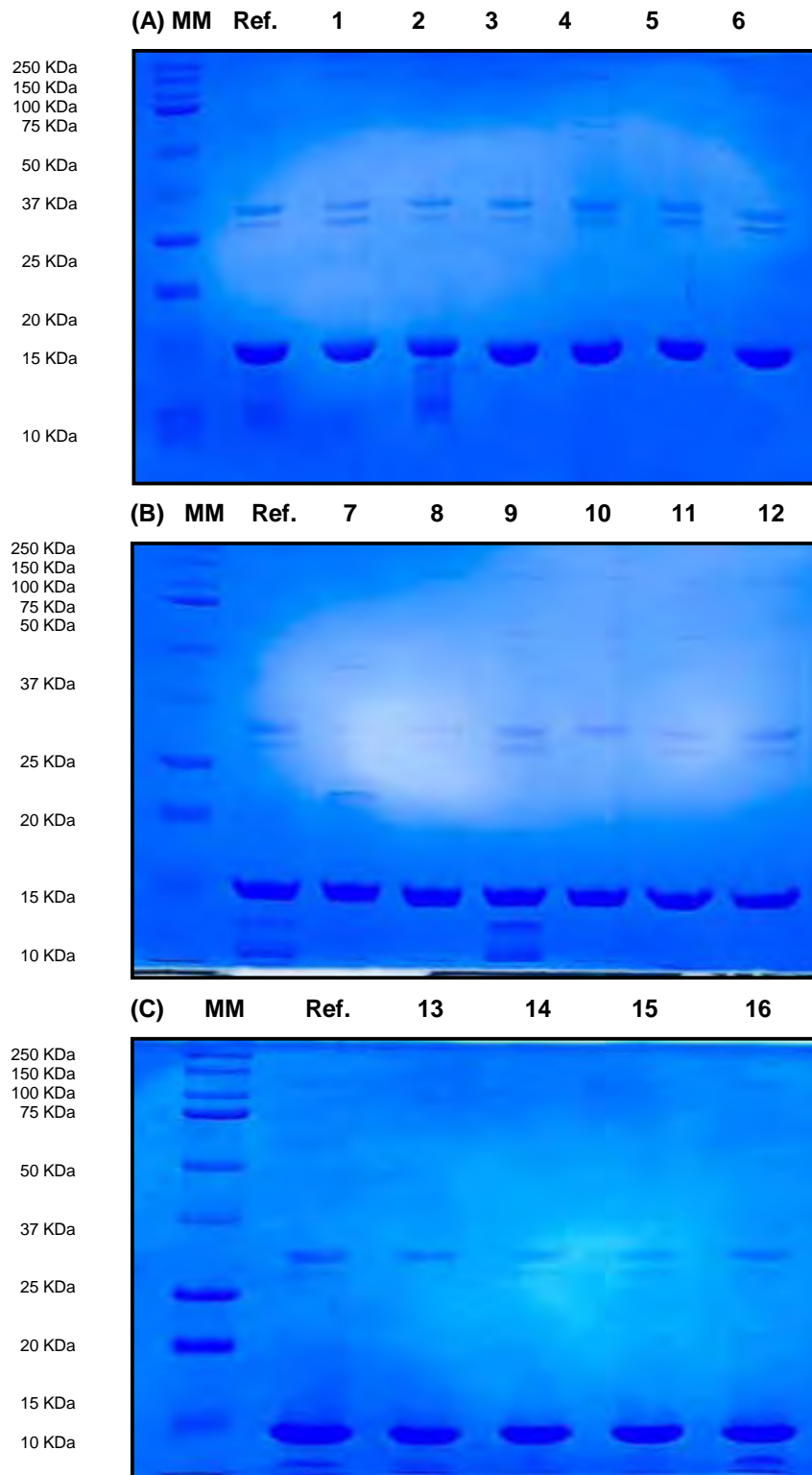


Figura 11 – Análise eletroforética em SDS-PAGE 15%, sob condições desnaturantes e reduzidas, das 16 amostras individuais provenientes do Grupo 6. (MM) Marcador molecular, (Ref.) Veneno Referência Nacional, (A) Serpentes de nº 1 a 6, (B) Serpentes de nº 7 a 12, (C) Serpentes de nº 13 a 16.

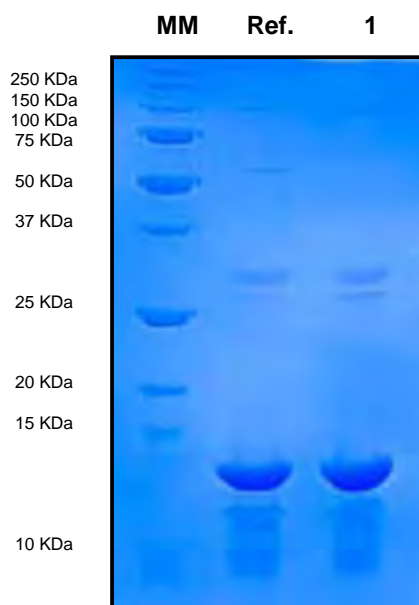


Figura 12 – Análise eletroforética em SDS-PAGE 15%, sob condições desnaturantes e reduzidas, da amostra provenientes do Grupo 7. (MM) Marcador molecular, (Ref.) Veneno Referência Nacional, (1) amostra respectiva ao “pool” de veneno referente ao Grupo 7.

4.1.3 Perfil cromatográfico HPLC – RP

O perfil cromatográfico encontrado tanto para machos, fêmeas e filhotes corroborou os resultados observados na análise eletroforese, no que diz respeito à variação crotamina-positiva e negativa, totalizando também 35% de amostras positivas para esta proteína.

Os três picos, identificados por sequenciamento, correspondem a 6,5 (crotamina), 8,0 (crotapotina) e 9,0 (fosfolipase A₂) minutos de retenção. O pico observado por volta de 20,0 minutos trata-se de artefato da técnica, não representando, portanto, substância presente na composição do veneno (Figura 13 A).

Um exemplo de perfil cromatográfico de veneno crotamina-negativa pode ser verificado na figura 13 B.

Todos os venenos amostrados apresentaram grande variação na intensidade dos picos, bem como, na sua constituição. Uma variabilidade menor foi observada em apenas nove amostras de veneno, distribuídas dentro de cinco dos grupos estudados, que apresentaram um caráter menos complexo em sua composição, sendo também todas crotamina-negativas (Tabela 4).

Todos cromatogramas correspondentes à análise individual de cada veneno poderá ser visto no Anexo 4.

Tabela 4: Distribuição das amostras de veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* distribuídas dentro de 5 grupos estudados, que apresentaram perfil cromatográfico mais básico.

Grupos	Serpente Nº
02	01
03	01 e 12
04	08, 11 e 15
05	16
06	04 e 07

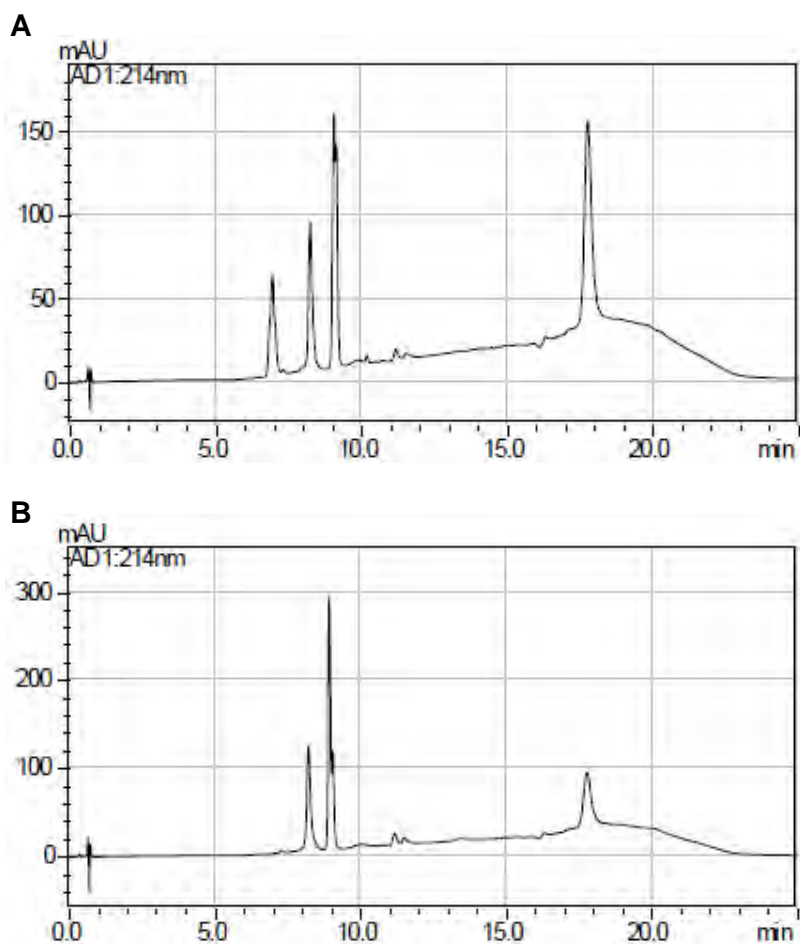


Figura 13 A – Perfil cromatográfico de uma amostra crotanima-positiva. Os picos correspondem a 6,5 (crotamina), 8,0 (crotapotina) 9,0 (fosfolipase A₂) minutos de retenção. B - Perfil cromatográfico de uma amostra crotanima-negativa. Os picos correspondem a 8,0 (crotapotina) 9,0 (fosfolipase A₂) minutos de retenção.

Também foi observada grande variação de rendimento das proteínas do veneno quando se comparou os cromatogramas tanto intra-grupos como entre-grupos, mostrando grande diferença entre as amostras estudadas. Além disso, foi possível observar a presença de isoformas de crotapotina e fosfolipase A₂, unidades que juntas formam a crotoxina. A presença de isoformas de fosfolipase A₂ foi mais abundante, podendo ser observada na maioria dos cromatogramas dos grupos estudados, conforme anexo 4. Apesar desta grande variação nas concentrações das amostras, os perfis cromatográficos não apresentaram variação das proteínas do veneno acerca do tempo de cativeiro, nem sobre a variação ontogenética.

4.2. Caracterização enzimática dos venenos

4.2.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano e índice de coagulação

Todas as amostras de veneno foram capazes de induzir a formação da rede de fibrina e consequente formação do coágulo (Figura 14).

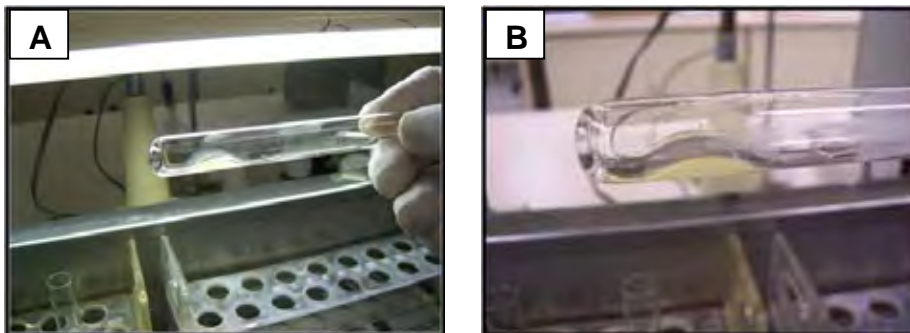


Figura 14 - Atividade coagulante das amostras de veneno de *Crotalus durissus terrificus*. (A) Coágulo de fibrina formado após incubação do plasma humano com veneno; (B) Detalhe da formação da rede de fibrina.

Tanto para a atividade coagulante como para o índice de coagulação, os resultados se mostraram parecidos, não havendo diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de 1 a 6 (adultos), o que não demonstrou perda da atividade coagulante do veneno durante o tempo decorrido de cativeiro. Mas entre os grupos 1 a 6 quando comparados com o veneno referência e com o dos filhotes houve grande variação, mostrando uma elevada atividade coagulante, com $p < 0,001$ (tabelas 5).

Tabela 5: Comparação entre os tempos de coagulação do veneno referência e das amostras de veneno referente aos grupos de 1 a 7 e seus respectivos tempos de formação de coágulo em segundos.

Grupos	Tempo seg.
Referência	11,5 (10-13)*
G1	16,5 (16-18)
G2	16,5 (16-18)
G3	16,5 (16-18)
G4	17,1 (16,5-19)
G5	17,0 (16,5-18)
G6	16,5 (16-18,5)
G7	13,0 (12-14)*

Onde: * Diferença observada para o Veneno referência e o de filhotes quando comparado aos demais grupos, $p < 0,001$

Estes resultados foram os mesmos observados quando calculado o índice de coagulação dos grupos, conforme pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6: Comparação do índice de coagulação do veneno referência e do “pool” de veneno referente aos grupos de 1 a 7 de serpentes (*crotalus durissus terrificus* da Região de Botucatu).

Grupos	Índice de coagulação %
Referência	86,95%*
G1	60,6%
G2	60,6%
G3	60,6%
G4	57,8%
G5	57,1%
G6	60,6%
G7	86,95%*

Onde: * Diferença observada para o Veneno referência e o de filhotes quando comparado aos demais grupos, $p < 0,001$

4.2.2. Atividade caseinolítica

Para essa atividade não houve diferença estatística nos resultados apresentados pelos grupos, mas foi observada uma variação de uma unidade por minuto quando comparado os grupos de espécimes de cativo, quarentena e recém-chegados. Os grupos 2 e 4, que representam os animais com três anos de cativo, demonstraram os menores índices. Os grupos 1 e 3, que representam os animais em regime de quarentena, apresentaram índices intermediários quando comparado com os demais grupos, bem como o grupo constituído por filhotes. Os grupos 5 e 6, constituídos por animais recém-chegados da natureza, apresentaram os maiores índices quando comparados aos demais grupos.

Tabela 7: Comparação da atividade caseinolítica do veneno referência e do “pool” de veneno referente aos grupos de 1 a 7 de serpentes (*Crotalus durissus terrificus* da Região de Botucatu).

Grupos	Unidade/minuto
Referência	7
G1	6,5
G2	5,5
G3	6,75
G4	5,25
G5	7,25
G6	7,25
G7	6,5

4.3. Caracterização farmacológica dos venenos

4.3.1. Toxicidade

A taxa de mortalidade dos cinco grupos de camundongos inoculados com a solução de veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi registrada após o período de 48 horas, para cada um dos grupos experimentados.

A determinação da atividade tóxica da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada pelo teste de Probit (60), onde a dose letal capaz de levar a óbito 50% dos animais utilizados no experimento resultou em uma

progressão da perda da atividade letal desde a chegada do animal até a sua permanência prolongada em cativeiro.

Os grupos 2 e 4 , constituído de espécimes com três anos de cativeiro, apresentaram DL₅₀ iguais a 75 e 77 µg/kg, respectivamente, sendo menos letal quando comparada com os grupos 1 e 3 com 61 e 62 µg/Kg constituído por espécimes de quarentena que, por sua vez foi menos letal que os grupos 5 e 6 com 54 e 55 µg/kg (recém-chegados) onde não foi observado diferença estatística entre eles. A DL₅₀ apresentada para o grupo 7 obteve 71 µg/kg (referente aos filhotes), sendo equiparada aos resultados obtidos pelos grupos 2 e 3, conforme tabela 8.

Tabela 8: Caracterização das atividades tóxicas (DL₅₀) das amostras de veneno referentes aos grupos 1 ao 7 de serpentes (*crotalus durissus terrificus* da Região de Botucatu).

Grupos Grupos	DL₅₀ (µg/kg)
G1	61 (53-68)
G2	77 (70-85)*
G3	62 (53-68)
G4	75 (69-84)*
G5	55 (47-62)
G6	54 (46-66)
G7	71 (68-77)*

Onde: * Diferença observada entre o Veneno do grupo de filhotes (7) e dos grupos formados por adultos com três anos de cativeiro (2 e 4) comparado com demais grupos, p<0,05

4.3.2. Atividade da Crotamina

A atividade da crotamina teve início imediatamente após a inoculação intraperitoneal, e foi caracterizada pela indução de hipertonicidade das patas posteriores (figura 15 A), resultando posteriormente em sua paralisia completa (figura 15 B). O grupo inoculado com veneno crotamina-negativo e o grupo controle, inoculado com solução salina 0,95%, não apresentaram quaisquer atividades como as observadas para o grupo inoculado com veneno crotamina-positiva

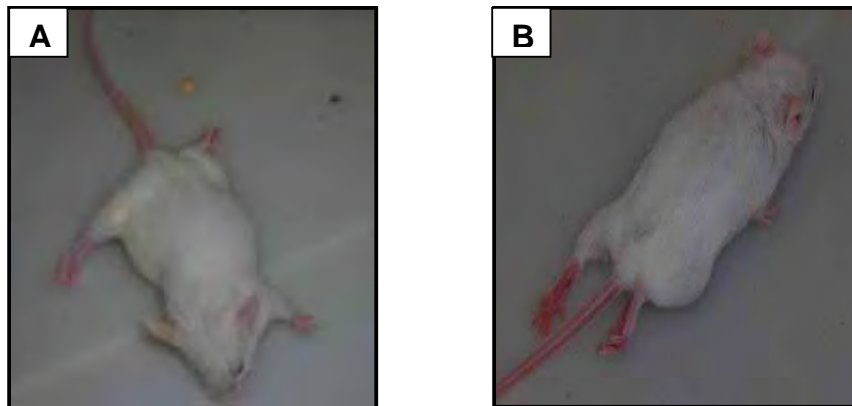


Figura 15 - Atividade da crotamina de *Crotalus durissus terrificus*. (A) hipertonicidade das patas posteriores, (B) paralisia completa das patas posteriores de camundongos.

5.DISSCUSSÃO

5. Discussão

No decorrer dos processos evolutivos as serpentes desenvolveram sistemas de captura de alimento, que chegaram ao seu auge com o desenvolvimento de um sistema de inoculação de substâncias biologicamente ativas, associado ao desenvolvimento de glândulas produtoras de veneno e de presas altamente especializadas (64,65).

Tem sido ressaltada, por diversos estudos, a existência de variações na composição dos venenos e em suas atividades farmacológicas, biológicas e enzimáticas. Estas variações são atribuídas a fatores como origem geográfica, idade, sexo, espécie, dieta e tempo decorrido entre uma extração de veneno e outra (45-50), e têm sido utilizadas como ferramentas importantes para estudos sistemáticos e filogenéticos nos diversos níveis taxonômicos (44,28,66).

Tendo em vista recentes estudos demonstrando variações na composição e nas atividades do veneno do gênero *Crotalus*, o estudo teve como proposta de trabalho a análise comparativa da variação dos perfis eletroforéticos em géis de poliacrilamida e cromatográficos, das atividades farmacológicas, bioquímicas e enzimáticas de amostras de veneno oriundas de 110 espécimes da população de *Crotalus durissus terrificus* da região de Botucatu-SP, levando-se em conta os diferentes estágios do cativeiro e utilizando como parâmetro o Veneno Referência Nacional para essa espécie.

É sabido que, os venenos de serpentes são misturas complexas, tendo presença de componentes tais como cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas, lipídios e aminoácidos de baixo peso molecular (9). Além disso, possuem diversas proteínas e peptídeos com inúmeras atividades biológicas, os quais podem compreender de 70 a 95% de seu peso seco (8,67).

A análise do perfil protéico das amostras de veneno de *Crotalus durissus terrificus* não apresentou diferença significativa entre os grupos de 1 a 6, correspondentes aos adultos, em diferentes estágios de cativeiro, os quais obtiveram uma média de 75% de proteína corroborando os valores descritos por outros autores, os quais obtiveram valor de 76,9 % de proteínas para venenos de *Crotalus durissus terrificus* do Brasil e 81,4% de proteínas para serpentes da mesma espécie provenientes da Argentina (68). No entanto,

quando comparado ao grupo de filhotes (G:7) apresentaram diferença, o qual obteve 60% de proteínas em seu veneno.

A técnica de eletroforese permite uma grande resolução dos padrões de proteínas dos venenos, elucidando a separação e identificação de seus componentes, como já descrito por diversos autores (15,69,70,71).

O perfil eletroforético, das 93 amostras de veneno individuais em condições reduzidas e desnaturantes, apresentou-se de maneira semelhante, com dois perfis padrões bem definidos. O primeiro com a presença da crotamina (4,8 kDa) e o segundo sem a presença da mesma (24).

Na análise dos dois perfis, o primeiro, referente ao de crotamina-positiva, apresentou-se sendo minoria totalizando 35% das amostras experimentadas, mostrando uma menor porcentagem de animais com a presença da crotamina, resultado também evidenciado por Schenberg em 1959 (32), Francischetti *et al.* (72) em *Crotalus durissus terrificus* e por More *et al.* (73) mas em *Crotalus durissus collilineatus*. O veneno proveniente do grupo 7, referente aos filhotes, se mostrou como tendo a presença de crotamina, divergindo do resultado evidenciado por Furtado *et al.* (74) em *Crotalus durissus terrificus*, que se mostrou negativo.

Durante a análise dos géis, foi evidenciada também uma proteína, com peso molecular de aproximadamente 60 kDa, observada para o Veneno Referência Nacional e também em outras 13 amostras estudadas (tabela 3). Esta proteína, com peso molecular semelhante, já foi observada, com a utilização de análise eletroforética, no estudo com *Crotalus durissus ruruima* (75).

Dados da literatura descrevem o veneno de *Crotalus durissus* podendo ter coloração branca e amarela, apresentando diferenças nas atividades biológicas, farmacológicas e enzimáticas (32,75,76). Dentre as 93 amostras experimentadas, 10 delas apresentaram coloração amarela, totalizando 14% dos venenos, indo de acordo com o encontrado por Schenberg, em 1959 (32), que observou a coloração amarela em 4% de suas amostras, evidenciando menor porcentagem de animais com veneno desta coloração. Cabe ressaltar que todas as amostras que apresentaram coloração amarela se mostraram sendo crotamina-negativa, que foi confirmada também pela análise cromatográfica.

A coloração amarelada dos venenos tem sido comumente associada à presença da enzima L-amino oxidase, mas para os venenos de serpentes, ainda é pouco estudada (77,78).

Os resultados obtidos pela análise eletroforética foram confirmados pela análise cromatográfica, de fase reversa em HPLC, no que diz respeito à variação crotamina-positiva e negativa que se mantiveram constantes, bem como em relação a presença das outras proteínas.

Foi utilizada a cromatografia líquida de fase reversa, em HPLC, pois para esta análise faz-se necessária pouca quantidade de amostra e por outro lado, o tempo de duração desta metodologia em relação aos sistemas convencionais é muito mais reduzido.

Os cromatogramas também evidenciaram variações nas concentrações das proteínas tanto intra como inter grupos. Variações na presença ou não de proteínas e de suas concentrações já foram evidenciadas em estudos com amostras individuais. Francischetti *et al.* (72) mostraram grandes diferenças nos cromatogramas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* do Estado de Minas Gerais onde encontrou diferenças entre oito amostras bem como com o veneno referência utilizado. Estudos com serpentes *Crotalus durissus cumanensis* desenvolvidos em localidades da Venezuela e Colômbia também evidenciaram diferenças nos perfis cromatográficos acerca das variações na presença de proteínas bem como em suas concentrações, atribuindo essas diferenças a variações geográficas das serpentes utilizadas (79,80).

Outros estudos evidenciaram também diferenças cromatográficas no veneno de serpentes da família *Elapidae* e *Viperidae*, verificando mudanças das concentrações das proteínas conforme a permanência do animal em cativeiro (81), bem como a presença de isoformas das proteínas dos venenos (82).

Toyama *et al.* (27) observaram duas isoformas de crotamina no veneno de *Crotalus durissus terrificus*, isoladas após três etapas cromatográficas, que apresentaram diferentes ações no aumento das contrações musculares no nervo frênico do diafragma de camundongos. Também já foram observadas no veneno de várias serpentes *Crotalus durissus terrificus*, a presença de isoformas de crotoxina, podendo ser identificadas até 15 variações (83).

Em outras serpentes do gênero *Crotalus*, diferentes isoformas de crotapotina e fosfolipase A₂ também foram encontradas, variando suas concentrações bem como suas habilidades enzimáticas (84,85). Há ainda indicações que isoformas de crotoxina de *C. d. collilineatus* possui alta similaridade com a crotoxina de *C. d. terrificus* (85).

Estudos evidenciaram que a presença e variações de isoformas das proteínas dos venenos são resultados de modificações pós-traducionais ocorridas nos precursores e na expressão de diferentes RNAs mensageiros presentes um indivíduo, resultado na variação do número de cópias do gene entre cromossomos (86,87,88).

A observação da presença de isoformas e de suas variações em serpentes do gênero *Crotalus* é de grande relevância, pois têm sido discutido que o “pool” de veneno utilizado para a produção do soro anti-crotálico seja inapropriado, ocasionando baixa imunogenicidade e não neutralizando completamente as manifestações clínicas dos acidentes (89).

Cabe ressaltar que foram observadas, dentre os grupos experimentados amostras que apresentaram perfis cromatográficos mais básicos, ou seja, sem muita variação nas concentrações das proteínas. Essas amostras estão distribuídas dentro de 5 dos 7 grupos do estudo e todas com a variação crotamina-negativa (tabela 4).

Uma das atividades mais bem caracterizada para o veneno crotálico é alteração sobre a hemostasia, responsável pela ativação da cascata de coagulação e terminando por induzir, *in vivo*, a incoagulabilidade sanguínea por consumo do fibrinogênio (90,91,92) Em testes, *in vitro*, sua consequência é a coagulação sanguínea (19). A toxina responsável pela atividade coagulante do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é a gioxina, primeiramente isolada por Barrio em 1961 (17). Esta esteve presente em todos os venenos estudados, sem grande variação quanto a sua concentração.

Tanto para a caracterização da atividade coagulante bem como para o índice de coagulação, os resultados se apresentaram semelhantes, não havendo variação entre os grupos de 1 a 6. Estes resultados mostraram que não houve variação, tão pouco em relação ao manejo de cativeiro quanto a variação sexual, dos venenos em relação à atividade coagulante. Obtendo o

mesmo resultado encontrado por Céspedes *et al.* (79) com *Crotalus durissus cumanensis*.

Para o grupo referente aos filhotes a atividade coagulante e o índice de coagulação se mostraram mais potentes quando comparados aos outros grupos experimentados, o que também foi observado por Zelanis *et al.*(93) com *Bothrops jararaca*. Corroborando tal resultado, Furtado *et al.*(74) descreveram a atividade coagulante de filhotes de *Crotalus durissus terrificus* bem mais potente quando comparado com fêmeas adultas. Saravia *et al.*(39) também compararam o veneno de serpentes *Crotalus durissus* do Brasil, da Guatemala e da Costa Rica, onde observaram a maior potência da atividade coagulante no veneno dos filhotes.

Além deste efeito, os venenos de serpentes da família Viperidae são caracterizados pela sua alta atividade proteolítica, devido à presença, além das proteases, fosfolipídeos e hialuronidases dentre outras enzimas (94). Os efeitos dos venenos de serpentes sobre substratos como a caseína, a gelatina e albumina dentre outros, são amplamente estudados (95).

Neste estudo, os ensaios de atividade proteolítica sobre a caseína mostraram que esta é mais intensa nos venenos dos exemplares oriundos dos grupos 5 e 6, que representam animais recém chegados ao cativeiro, e vai perdendo intensidade conforme avança nos estágios de cativeiro, ou seja, com isso ficou demonstrada a perda da atividade caseinolítica do veneno durante o tempo decorrido desde a chegada do animal, passagem pela quarentena e a permanência prolongada no cativeiro (tabela 7). Os resultados obtidos para o grupo de filhotes demonstraram atividade caseinolítica mais intensa apenas quando comparada com os resultados obtidos para os grupos 2 e 4, que representam os animais de cativeiro.

Alguns autores descreveram para o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, valores de atividade proteolítica sobre a caseína variando de 3,6 a 11,5 um/min (72) para serpentes provenientes de diversas localidades do Estado de Minas Gerais. Dos-Santos *et al.*(76) observaram para o veneno referência proveniente do Instituto Butantan o valor de 7,2 um/min, um pouco reduzido quando comparado com o resultado obtido por Francischetti *et al.*(72) que foi de 8,2 um/min mas se aproximando ao observado pelo presente estudo que foi de 7,0 um/min.

Por outro lado, Furtado *et al.* (74) não descreveram para filhotes e adultos de *Crotalus durissus terrificus* da região de Bauru-SP (90 Km de distância de Botucatu-SP), atividade proteolítica do veneno sobre a caseína. Estes resultados diferem do observado nesse estudo que encontrou atividade sobre a caseína entre todos os grupos, ressaltando que houve ainda uma redução da atividade no decorrer dos vários estágios de cativeiro.

Outra atividade que caracterizam as variações dos venenos, sendo largamente utilizada para avaliar efeitos clínicos (35), bem como para testar a capacidade de neutralização dos antivenenos comerciais (96), é a DL₅₀ embora seja bastante discutida ultimamente (97,98).

Furtado *et al.*(50) documentaram variações nos venenos decorrentes do tempo de permanência do animal no cativeiro e do tempo entre uma extração de veneno e outra. Também já foram mostradas diferenças entre a DL₅₀ de filhotes e adultos (74). O presente estudo veio a corroborar os postulados da literatura, elucidando uma diferença na toxicidade dos venenos entre os diferentes estágios de cativeiro, mesmo para animais provenientes de uma mesma região.

Dos 7 grupos utilizados para os experimentos, os grupos com menor atividade letal apresentada foram os referentes aos animais com aproximadamente 3 anos de cativeiro, com DL₅₀ entre 75 e 77 µg/kg sendo equivalente ao valor encontrado para *Crotalus durissus terrificus* por Santoro *et al.*(99) e por Rangel-Santos *et al.*(100), mas apresentando metade do obtido por Clissa *et al.*(101) que foi de 148 µg/kg.

Para a atividade tóxica do veneno referente ao grupo de filhotes, a DL₅₀ encontrada foi de 71 µg/kg tendo maior toxicidade do que a encontrada por Furtado *et al.* (74) e menos tóxica que a demonstrada por Céspedes *et al.*(79).

Toda a variação da toxicidade dos venenos demonstrada no estudo vem a acrescentar resultados aos já discutidos e presentes na literatura, onde havia variações de toxicidade dos venenos em um mesmo país (80) ou Estado (72) e do tempo decorrido de cativeiro (50), mas não, até o presente momento, para uma região tão limitada e que demonstrasse tantas diferenças, de um grande número de serpentes.

Entre as atividades tóxicas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* mais descritas, está a atividade neuromuscular causada pela crotamina (102).

O mais típico efeito, em animais de experimentação, da ação da crotamina é a paralisia flácida dos músculos esqueléticos das patas traseiras de camundongos (15,26,103).

A atividade da crotamina foi avaliada pelo método descrito e padronizado presente na Farmacopéia Brasileira (61) com inoculação intraperitoneal, onde os animais foram observados por 30 minutos e foram considerados positivos os animais que apresentaram espasmos musculares e paralisia das patas traseiras, no decorrer desse período.

Dentre os 3 grupos experimentados, apenas para os animais que representavam o grupo inoculado com veneno crotamina-positiva, foram observados os efeitos da presença da crotamina, sendo que os demais não apresentaram alterações de comportamento.

Os animais inoculados com o veneno sabiamente crotamina-positiva apresentaram, imediatamente após sua inoculação, o início da ação da crotamina, o mesmo observado por Ownby *et al.*(104) que utilizaram método de inoculação por via intravenosa e por Vieira *et al.*(105) utilizando via intraperitoneal, mas um pouco mais rápido do observado por Dos-Santos *et al.*(76) que foi após 3 minutos de observação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. Considerações Finais

- A variação atribuída à presença da crotamina observada em gel de poliacrilamida não evidenciou relação com a distribuição dos animais dentro dos grupos;
- O aparecimento da banda protéica na eletroforese com peso molecular aproximado de 60 kDa, evidenciada também para o Veneno Referência, não demonstrou relação com distribuição geográfica, sexo ou tempo decorrido de cativeiro;
- A observação de coloração amarela do veneno se manteve presente em 14% das amostras, não tendo relação com distribuição geográfica, sexo ou tempo decorrido de cativeiro, mas todos os venenos que demonstraram essa característica apresentaram ausência de crotamina;
- A análise dos perfis cromatográficos encontrados corroborou os resultados observados na eletroforese, no que diz respeito à variação crotamina-positiva e negativa, e evidenciaram importantes variações nas concentrações em suas proteínas não tendo relação com distribuição geográfica, sexo ou tempo decorrido de cativeiro;
- Os cromatogramas evidenciaram a presença de isoformas de crotoxina presente nos venenos, principalmente em relação a unidade básica da proteína (Fosfolipase A₂), encontrada em abundância nas amostras estudadas;
- Na caracterização da atividade coagulante dos venenos não houve demonstração de variação entre os grupos formados por adultos, mas sim para o grupo de filhotes e para o Veneno Referência, tendo estes apresentado maiores atividades coagulantes;

- A análise das atividades tóxicas e proteolítica sobre a caseína dos venenos apresentou um padrão similar, sendo maior para animais recém-chegados e mais branda para animais de cativeiro;
- Foi demonstrada a perda na potência das atividades tóxicas e proteolítica dos venenos conforme os animais ultrapassam os diferentes estágios de cativeiro, não havendo variação ligada ao sexo do animal, mas sim sobre a questão ontogênica;
- Não foi possível estabelecer uma relação entre as atividades realizadas com a variação ambiental decorrente da procedência de cada espécime.

Por fim, futuros estudos para a melhor compreensão das características dos venenos crotamina-positiva, crotamina-negativa e o de coloração amarela se fazem necessários. Esta análise pode ser realizada utilizando técnicas de análise proteômica tais como eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. A verificação da capacidade do soro antiofídico comercial de neutralizar esses venenos também deverá ser considerada.

7. Resumo

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*) é constituído pelas toxinas: Crotoxina, Crotamina, Giroxina e Convulxina. A crotamina possui ação miotóxica, sendo que esta toxina pode ser expressa ou não por animais de uma mesma região. Variações bioquímicas, enzimáticas e farmacológicas dos venenos, podem estar associadas a fatores geográficos, clima, sexo, idade, dieta, bem como tempo decorrido de cativeiro e entre extrações. Esta pesquisa teve como objetivo caracterizar o veneno de *C.d.t.*, da micro-região de Botucatu (São Paulo) pela determinação de suas propriedades bioquímicas, farmacológicas e enzimáticas. Para isto, foi realizada a comparação de venenos de serpentes recém capturadas da natureza com o de cativeiro, para verificar a influência da variação sexual, ambiental (tempo de cativeiro) e ontogenética na sua composição. Foram utilizadas técnicas de dosagem protéica, eletroforese (SDS-PAGE), perfil cromatográfico (HPLC-RP), atividade coagulante e índice de coagulação, atividade proteolítica sobre a caseína, tóxica(DL₅₀) e atividade da crotamina. As atividades das 93 amostras de veneno foram comparadas com as do Veneno Referência Nacional. A dosagem protéica não evidenciou variação entre os grupos formados por adultos (75%), mas mostrou diferença quando comparada a do grupo de filhotes (60%). A análise eletroforética (SDS-PAGE 15%) evidenciou que a variação da presença da crotamina não teve relação com a distribuição dos grupos, sendo que 65% das amostras foram crotamina-negativa. O perfil cromatográfico corroborou os resultados da eletroforese, a respeito da variação da crotamina, mostrando grandes variações nas concentrações das proteínas, além de evidenciar grande quantidade de isoformas de crotoxina. Na caracterização coagulante dos venenos, não houve variação entre os grupos formados por adultos, mas sim para o grupo de filhotes e para o Veneno Referência, tendo estes dois grupos as maiores atividades coagulantes. As atividades tóxicas (DL₅₀) e proteolítica sobre a caseína apresentaram um padrão similar, demonstrando perda na potência das duas atividades conforme os animais ultrapassam os diferentes estágios de cativeiro, e para o grupo referente aos filhotes, evidenciaram-se intermediários para as duas atividades. As análises das atividades dos venenos de *C.d.t.*, apresentou similaridade entre os grupos formados por indivíduos adultos, mas demonstrando perda da intensidade das atividades dos venenos de acordo com o tempo decorrido de cativeiro. Além disso, foi demonstrado que mesmo entre animais de uma região reduzida, são capazes de apresentar importantes variações nas concentrações das proteínas do veneno, bem como, em suas atividades.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*; Crotamina; Variação ambiental, Variação ontogênica; Veneno.

8. Abstract

Crotalus durissus terrificus (C.d.t.) venom is composed by the following toxins: crotoxin, crotamine, gyroxin and convulxin. Crotamine possess a myotoxic action that can be expressed or not by snakes from the same region. Biochemical, enzymatic and pharmacological variations of venoms may be associated with geographic factors, climate, gender, age, and diet as well as length of captivity and venom extractions. The present study was carried out in order to characterize the C.d.t. venom of Botucatu micro-region, São Paulo State, by defining its biochemical, pharmacological and enzymatic properties. A comparative characterization of venoms from newly captured snakes and already-captured animals was performed to verify the sexual, environmental (length of captivity) and ontogenetic variations that influence the venom composition. Protein concentration, electrophoresis (SDS-PAGE), chromatographic profile (RP-HPLC), coagulant activity and coagulation index, proteolytic activity upon casein, toxic (LD_{50}) and crotamine activity were employed. The venom activities of 93 samples were compared with the National Reference Venom. Protein concentrations did not evidence a variation among the groups of adults (75%), but revealed some difference when compared with newborn groups (60%). The electrophoresis analysis (SDS-PAGE 15%) presented a crotamine variation that had no relation with the distribution of groups, which showed that 65% of the samples were crotamine negative. The chromatographic profile confirmed the results of electrophoresis regarding crotamine variation, and also showed great variation in the protein concentration, besides revealing a high quantity of crotoxin isoforms. Concerning coagulant characterization, there was no variation among adult groups; however, the National Reference Venom and newborn groups presented higher coagulant activities. Toxic (LD_{50}) and proteolytic activities displayed a similar pattern, showing a decrease during the captivity process; whereas in newborn groups the results revealed an intermediary activity for both tests. The analysis of C.d.t. venom activities showed similar results among the groups of adults, but revealed an activity loss during the captivity process. The current findings also demonstrate that even among animals from the same region, their venoms may present significant variations in activity and protein concentration.

Key words: *Crotalus durissus terrificus*; crotamine; environmental, ontogenetic variations; venom.

9.REFERÊNCIAS *

* Segundo normas de Vancouver: “*Uniform Requeriments for Manuscripts to Biomedical Journal*” (*International Comitte of Medical Journal Editors*, 2008. <http://www.icmje.org>) e por deliberação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

9. Referencias

01. Souza FCM. Efeito renal do veneno de *Bothrops erythromelas* e bloqueio induzido pelo fator antibiótico do *Didelphis marsupialis* [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. 2004.
02. Pizzato L. O fascinante mundo das serpentes. *Ciência Hoje* 2003; 71-3.
03. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Brasil; 2010. [atualizada em 01/05/2010, acesso em 10 maio 2010] Disponível em : <http://www.sbherpetologia.org.br> .
04. Cadle JE. Geographic distribution: Problems in phylogeny and zoogeography. In: Seigel , Collins JT and Novak SS, Editors, *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, Macmillan Co., New York, 1987;pp. 77–105.
05. Hoge AR, Romano-Hoge SA. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem Inst Butantan*. 1978/1979;42/43(17): 373-496.
06. Campbell JA & Lamar WW. *The venomous reptiles of Latin America*. Comstock Publishing Associates, New York, 1989;330-46.
07. McDowell SB. Systematics. In: Siegel RA, Collins JT and Novak SS, Editors, 1987. In: *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, Macmillan, Toronto, 1987;pp. 3–50.
08. Vonk FJ, Admiraal JF, Jackson K, Reshef R, de Bakker, Vanderschoot K, et al. Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature*. 2008; 454(7204):630-3.
09. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998;36(12):1749-1800.
10. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther*. 1994;62(3):325-72.
11. Prado-Franceschi J, Vital-Brazil O. Convulxin, a new toxin from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*. 1981;19(6):661-6.
12. Barrabin H, Martiarena JL, Vidal JC and Barrio A., 1978. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: Rosenberg, P., Editor, 1978. *Toxins: Animals, Plant and Microbial*, Pergamon, New York, pp. 113–33.

13. Slotta KH & Fraenkel-Conrat HL. Schlangengifte, III: Mitteilung Reiningung und Krystallization des Klapperchangengiftes. Ber Dich Chem Ges. 1938; 71(5): 1076-81.
14. Laure CJ. *Crotalus durissus terrificus* Venom: Crotoxin and Inter-Cro. Men Inst Butantan. 1990;52 (Supl.):17-19.
15. Gonçalves JM, Vieira LG. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. An Acad Bras Cienc. 1950;22(3): 141-50.
16. Vargaftig BB, Joseph D, Wal F, Marlas G, Chignard M, Chevancem LG. Convulxin induced activation of intact and of thrombin degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitization with collagen. Eur J Pharmacol. 1983;92(1-2):57-68.
17. Barrio A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. Acta Physiol Latinoamer. 1961; 11: 224-32.
18. Alexander A, Grothusen J, Zepeda H, Schwartzman RJ. Gyroxin a toxin from the venom of *Cotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. Toxicon 1988;26(10):953-60.
19. Raw I, Rocha MC, Esteves MI, Kamiguti AS. Isolation and characterization of a thrombin-like from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Braz J Med Biol. Res. 1986;19(3):333-8.
20. Bucharetschi F, Herrera SRF, Hyslop S, Bacarat ECE, Vieira RJ. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop. 2002;44(3):133-8.
21. Faure G, Bon C. Crotoxin, a phospholipase A2 frtom the South America snake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and a comparison of molecular structure of their biological activities. Biochemistry. 1988;27(2):730-8.
22. Vital Brazil O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II Neuromuscular blocking action. Men Inst Butantan. 1966;33(3):981-926.
23. Rubsamen K, Breithaupt H, Habermann E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol. 1971;270(3):274-88.

24. Gonçalves JM. Purification and properties of crotamine. In: Bücherl W, Buckley EE, Deulofeu V. *Venomous Animals and their Venom.*, Academic Press, New York. 1956;1:261–74.
25. Laure CJ. Die primärstruktur des Crotamins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1975: 213–5.
26. Hampe OG, Vozari-Hampe MM, Gonçalves J M. Crotamine conformation: effect of pH and temperature. *Toxicon.*1978;16(5):453-60.
27. Toyama MH, Marangoni S, Novello JC, Leite GB, Prado-Franceschi J, Cruz-Hofling MA, et al. Biophysical, histopathological and pharmacological characterization of crotamine isoforms F 22 e F 32. *Toxicon* 2003;41(4):493-500.
28. Vital Brazil O. Peçonhas. In: Corbett C E. *Farmacodinâmica.* 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982;1044-74.
29. Barrio A, Brazil OV. Neuromuscular action of the *Crotalus durissus terrificus* (Laurent) poisons. *Acta Physiol Latinoamer.* 1951;1(4):291-308.
30. Gonçalves JM & Arantes EG. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. III – Determinação quantitativa de crotamina no veneno da cascavel brasileira. *An Acad Bras Ciênc.* 1956;28:369-71.
31. Schenberg S. Análise da crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. *Mem Inst Butantan.* 1959;29:213-26.
32. Schenberg S. Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science.* 1959;129:1361-3.
33. Silveira US, Diniz MRV, Santos SM. Distribuição geográfica das serpentes *Crotalus durissus* variedade crotamina-positivo nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. *Mem. Inst. Butantan* 1990;52:68.
34. Bicalho AFX, Silveira US, Magalhães HB, Diniz MRV. Distribuição geográfica da serpente *Crotalus durissus*, variedade crotamina-positivo e *Crotalus durissus*, variedade crotamina-negativo no estado de Minas Gerais. *Resumo I Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, São Paulo-SP, 1990.*
35. Chippaux JP, Willians V, White J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon.*1991;29(11):1279-303.

36. Warrel DA. Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes. *Symp Zool Soc Lond.*1997;70:189-203.
37. Barrio A & Miranda ME. Las diferentes poblaciones de *Bothrops alternata* Dumérly y Bidron (Ophidia, Crotalidae) de la Argentina, considerados desde el punto de vista morfológico y antigénico. *Mem Inst Butantan Simp Inter.*1966; 33(3):887-92.
38. Gutiérrez JM, Dos Santos MC, Furtado MF, Rojas G. 1991. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. *Toxicon* 1991;29(10):1273-7.
39. Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, Lopez JC, Chaves E, Rojas G, Gutiérrez JM. Geographic and ontogenic variability in the venoms of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop.* 2002;50(1):337-46.
40. Lomonte B, Gene GA, Gutierrez JM, Cerdas L. Comparative study of venom of new-born and adult rattlesnakes. *Toxicon.* 1983;21(4):379–84.
41. Minton SA, Weinstein SA. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon.* 1986;24(1):71-80.
42. Straight RC, Glenn JL, Wolt TB, Wolfe MC. Regional differences in content of small basic peptide toxins in the venom of *Crotalus adamanteus* and *Crotalus horridus*. *Comp Biochem Physiol.* 1991;100(1)51–8.
43. Glenn JL, Straight RC, Wolfe MC, Hardy DL. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. *Toxicon.* 1983;21(1):119-30.
44. Glenn JL and Straight RC. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. *Toxicon.* 1978;16(8)1-84.
45. Irwin RL, Olivier KL, Mohamed AH, Haast W. Toxicity of elapid venoms and observation in relation to geographical location. *Toxicon.*1970;8(1):51-4.
46. Gubensek F, Sket D, Turk V, Lebez D. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon.*1974;12(2):167-71.

47. Marsh A, Glatston A. Some observations on the venom of the Rhinoceros horned viper *Bitis nasicoenis* (Shaw). *Toxicon*,1974;12(6):621-8.
48. Jimenez-Porras JM. Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper *Bothrops nummifera*. *Toxicon*,1964;2(3):187-96.
49. Solorzano A, Romero M, Gutiérrez JM, Sasa M. Venom composition and diet of the cantil *Agkistrodon bilineatus howardgloydi* (Viperidae). *Southwest Nat.* 1999;44(4):478-83.
50. Furtado MFD, Colleto GMDD, Dias da Silva W. Controle da qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. Padronização dos métodos de ensaios das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos e de algumas espécies dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas á temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem Inst Butantan.* 1991;53(2):149-59.
51. Constituição brasileira. Constituição da república federativa do Brasil (1988).
52. Prefeitura de Botucatu. Secretaria de Turismo e Lazer. Botucatu, Brasil; 2010. [atualizada em 01/05/2010, acesso em 10 maio 2010] Disponível em : www.botucatu.sp.gov.br/
53. Simões MG, Simões LB. A evolução da região de Botucatu no tempo geológico. In Uieda W, Paleari LM. *Flora e Fauna: Um dossiê ambiental.* 1Ed. São Paulo: Unesp;2004.21-36.
54. Uieda VS, Barretto MG. Composição da ictiofauna de quatro trechos de diferentes ordens do Rio Capivara, Bacia do Tietê, Botucatu, São Paulo. *Rev Bras Zootecias, Juiz de Fora.*1999;1(1):55-67.
55. Cunha AR, Martins D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel. *Rev Irrig.*2009;14(1)1-11.
56. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Anal Bioch.* 1976;72(7): 248-54.
57. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
58. Edman P, Begg G. A protein sequentor. *Eur J Biochem.* 1967;1(1):80-91.

59. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-402.
60. Costa TA, Rogero JR. Dano da radiação gama em crotamina (toxina de cascavel brasileira). *Publ. IPEN*, 1988; 151.
61. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol.* 1947; 30:291-310.
62. Finney D J. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1971;333.
63. Farmacopéia Brasileira (1988) Parte 1, 4Ed. Editora Atheneu.
64. Thomas RG, Pough FH. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. *Toxicon.* 1979;17(3):221-8.
65. Russell FE. Snake venom poisoning. *Vet Hum Toxicol.* 1991;33(6):584-6.
66. Tan NH, Ponnudurai G. A comparative study of the biological properties of some sea snake venoms. *Comp Biochem Physiol B.* 1991;99(2):351-4.
67. Devi A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms In: Bucherl W, Buckley E, Deulofen V. (Eds). *Venomous animals and their venoms.* New York: Academic Press, 1971.
68. Cárdenas J, Pantigoso C, Málaga O, Yarlequé A. Contenido proteico y algunas actividades enzimáticas en tres venenos de serpientes mantenidas en cautiverio. *Boletín de la Sociedad Química del Perú.* 1995;61(3):151-63.
69. Rodrigues VM, Soares AM, Mancin AC, Fontes MRM, Honsin-Brandenbrugo MI, Giglio JR. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998;121(3):215-22.
70. Gahne B, Juneja RK, Groumus J. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin post-transferrin albumin and post-albumin in the blood of cattle. *Anim Blood Groups Biochem Genet.* 1977;8(3):127-37.
71. Gonçalves JM, Vieira LG. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. *An Acad Bras Ciênc.*, 1950;22(1).141-50.
72. Francischetti IM, Gombarovits ME, Valenzuela JG, Carlini CR, Guimarães JA. Intraspecific variation in the venoms of the South American

rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2000;127(1):23-36.

73. More SAY, Macedo JKA, Paula LL, Tavares TO, Guimarães TVC, Freitas RF, Perini EA, Barbosa CR, Magalhães MR. Geographical distribution of crotamine in rattlesnake *Crotalus durissus colilineatus* in the Goiás State. J Ven Anim Tixins incl Trop Dis.2007;13(1).411. IX Symposium of the Brazilian on Toxicology.

74. Furtado MFD, Santos MC, Kamiguti AS. Age-related biological activity of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2003;9(2):186-201.

75. Dos-Santos MC, Assis EB, Moreira TD, Pinheiro J, Fortes-Dias CL. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. Toxicon. 2005;46(8):958-61.

76. Dos-Santos MC, Ferreira LCL, Da Silva WD, Furtado MFD. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos "amarillo" y "blanco" de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. 1993;31(11):1459-69.

77. Toyama MH, Toyama DO, Passero LF, Laurenti MD, Corbett CE, Tomokane TY, et al;. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom.. Toxicon. 2006;47(1):47-57.

78. Takatsuka H, Sakurai Y, Yoshioka A, Kokubo T, Usami Y, Suzuki M, Matsui T, Titani K, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. Biochim. Biophys. Acta. 2001;1544 (1–2),267–77.

79. Céspedes N, Castro F, Jiménez E, Montealegre L, Castellanos A, Cañas CA, et al;. Biochemical comparison of venoms from young Colombian *Crotalus durissus cumanensis* and their parents. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. 2010;16(2):268-84.

80. Aguilar I, Guerrero B, Maria Salazar A, Girón ME, Pérez JC, Sánchez EE, et al. Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. Toxicon. 2007;50(2):214-24.

81. Modahl CM, Doley R, Kini RM. Venom analysis of long-term captive Pakistan cobra (*Naja naja*) populations. *Toxicon*. 2010;55(2-3):612-8.
82. Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Structural and pharmacological characterization of the crotoamine isoforms III-4 (MYX4_CROCu) and III-7 (MYX7_CROCu) isolated from the *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon*. 2010;55(8):1443-52.
83. Faure G, Bon C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. 1987;25(2):229-34.
84. Oliveira DG, Toyama MH, Martins AM, Havt A, Nobre AC, Marangoni S, *et al.* Structural and biological characterization of a crotoapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*. 2003;42(1):53-62.
85. Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J Protein Chem*. 2002;21(3):131-6.
86. Faure G, Choumet V, Bouchier C, Camoin L, Guillaume JL, Monegier B, *et al.* The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur J Biochem*. 1994;223(1):161-4.
87. Rádis-Baptista G, Kubo T, Oguiura N, Svartman M, Almeida TM, Batistic RF, *et al.* Structure and chromosomal localization of the gene for crotoamine, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. 2003;42(7):747-52.
88. Oguiura N, Collares MA, Furtado MF, Ferrarezzi H, Suzuki H. Intraspecific variation of the crotoamine and crotoasin genes in *Crotalus durissus* rattlesnakes. *Gene*. 2009;446(1):35-40.
89. Boldrini-França J, Corrêa-Netto C, Silva MM, Rodrigues RS, De La Torre P, Pérez A, *et al.* Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J Proteomics*. 2010;73(9):1758-76.
90. Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Burchel W, Buckley EE. Ed. *Venomous animals and their venoms*. New York: Academic Press. 1971;345-84.
91. Stocker K, Fischer H, Meier J. Thrombin-like venom proteinases. *Toxicon*. 1982;20(1):265-73.

92. Marsh N, Willians V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*. 2005;45(8):1171-81.
93. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL, Serrano SM. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J Proteome Res*. 2010;9(5):2278-91.
94. Tu AT. Snake venom: properties and actions. In: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. New York, A Wiley. Interscience Publication. 1977;151-457.
95. Bolaños R. Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centro América, Ed. Univ. de Costa Rica: San José, 1984;45-81.
96. Bober MA, Glenn JL, Straitghrt RC, Ownbyr CL. Detection of myotoxin a-like proteins in various snake venoms. *Toxicon*. 1988;26(7):665-73.
97. Valadares MC. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do Teste DL50”. *Rev Eletron Farm*. 2006;3:93-8.
98. Botham PA. Acute systemic toxicity. *ILAR Journal*. 2002;43:27-30.
99. Santoro ML, Sousa-e-Silva MCC, Goncalves LRC, Almeida-Santos SM, Cardoso DF, Laporta-Ferreira IL, *et al*;. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1999;122(1):61-73..
100. Rangel-Santos A, Dos-Santos EC, Lopes-Ferreira EC, Lima C, Cardoso DF, Mota I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*, *Toxicon*. 2004;43(7):801-10.
101. Clissa PB, Nascimento N, Rogero JR. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. *Toxicon*. 1999;37(8):1131-41.
102. Cheymol J, Gonçalves JM, Bourillet, Roch-Arveiller M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* Var. *crotaminicus*-I. *Toxicon*. 1971;9(3):279-86.
103. Moussatché H, Gonçalves JM, Vieira GD, Hasson AV. Pharmacological actions of two proteins from Brazilian rattlesnake venom. In: Buckley EE, Porjes N. Eds. *Venoms*. Washington: A.A.A.S. 1956:275-9.

104. Ownby CL, Aird SD, Kaiser II. Physiological and immunological properties of small myotoxins from the venom of the midget-faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*). *Toxicon*. 1988; 26(3):319-23.
105. Vieira CA, Vieira LO, Bueno JJR, Debiasi MRM, Mancim AC, Giglio JR. Ação de vários agentes sobre o efeito paralisante dos membros posteriores induzido pela crotamina em camundongos. *Biosc Jornal*. 2006;22(1):125-32.



CLASSIFICAÇÃO CLIMÁTICA
BOTUCATU-SP

Prof. Dr. Dinival Martins

A Classificação Climática mais aceita internacionalmente é a de Wilhelm Köppen, baseada principalmente nas normais de temperaturas médias do ar atmosférico e nas precipitações pluviométricas médias da região. A precisão da classificação climática, é diretamente proporcional ao número de anos de observações meteorológicas do local estudado.

Para a região de Botucatu-SP, temos 39 anos de observações meteorológicas (1971 - 2008) na Estação Agrometeorológica do Departamento de Ciências Ambientais - Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP Campus de Botucatu/Lageado, situada na Fazenda Experimental Lageado; Lat.: 22° 51' S, Long.: 48° 26' W Alt.: 786m. Da Normal Média de Temperaturas e Precipitações, destacam-se os seguintes dados:

Meses	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
P(mm)	268,9	202,5	173,9	70,9	82,9	54,7	42,2	38,8	86,9	114,3	140,6	209,4
t (°C)	22,8	23,2	22,7	21,1	18,3	17,3	17,1	18,7	19,3	21,0	21,7	22,3

PARÂMETROS NORMAIS	VALORES
Temperatura média anual	20,5 °C
Temperatura média do mês mais quente	23,2 °C
Temperatura média do mês mais frio	17,1 °C
Total médio de precipitação pluvial anual	1494,2 mm
Total médio de precipitação pluvial do mês mais chuvoso	268,9 mm
Total médio de precipitação pluvial do mês mais seco	42,2 mm
Total médio anual de evapotranspiração	684,0 mm

O Clima da região de Botucatu-SP, segundo os critérios adotados por Köppen, baseado nas observações meteorológicas é **Cfa**, onde **C**, é a zona climática, **f**, é variedade climática específica em termos de umidade e **a**, é o sub-tipo térmico para a região:

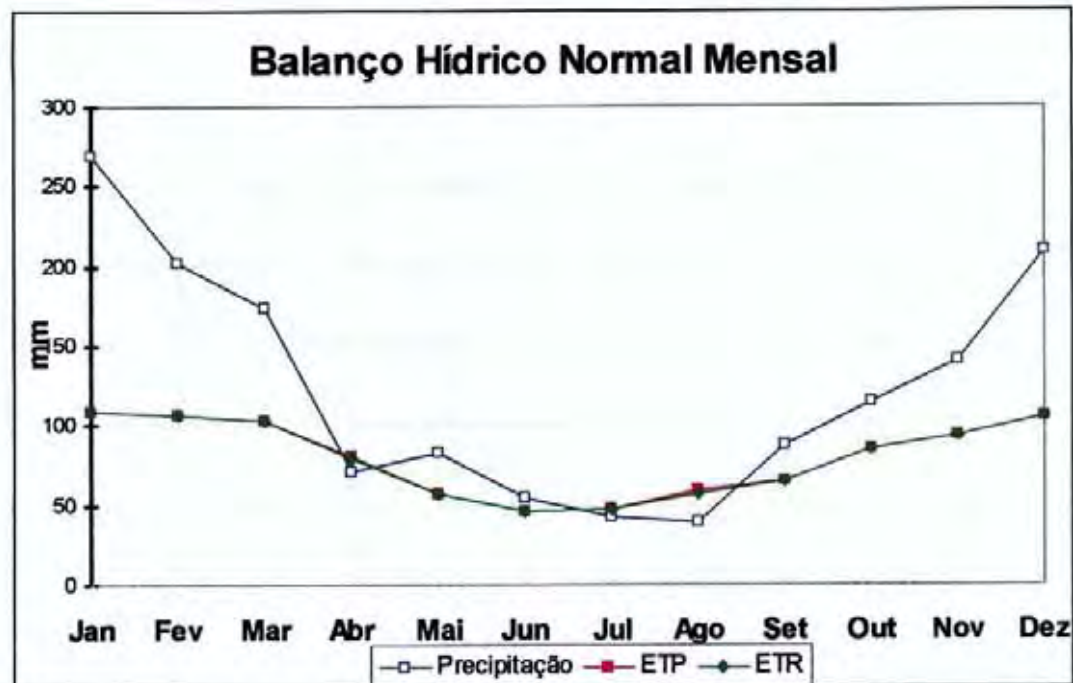
Cfa: Clima Temperado (Mesotérmico), Região constantemente úmida, tendo quatro ou mais meses com temperaturas médias superiores a 10 °C, cuja temperatura do mês mais quente é igual ou superior a 22 °C.

Botucatu, 2º de janeiro de 2009

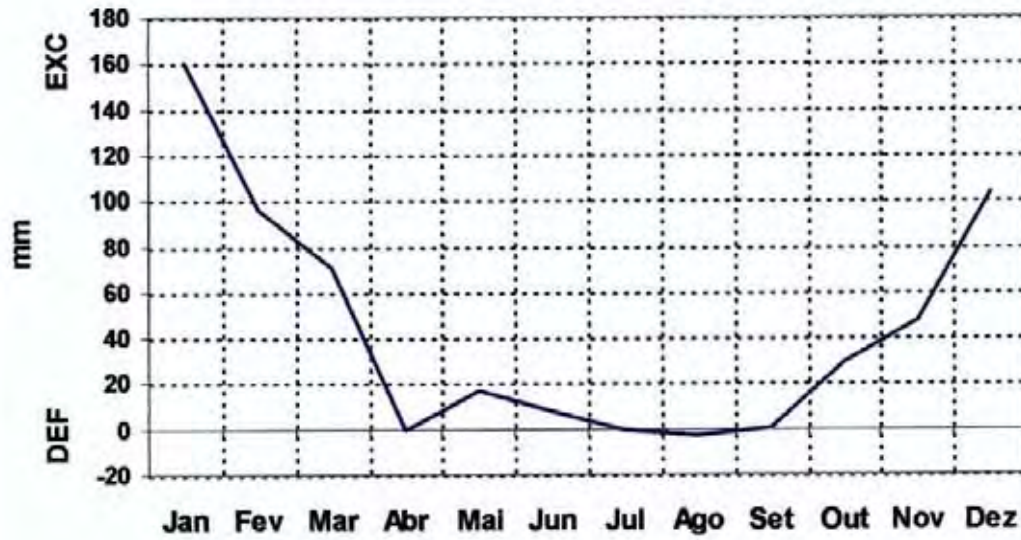
BALANÇO HÍDRICO – NORMAL (1971 - 2008)

Balanço Hídrico Normal por Thornthwaite & Mather (1955)

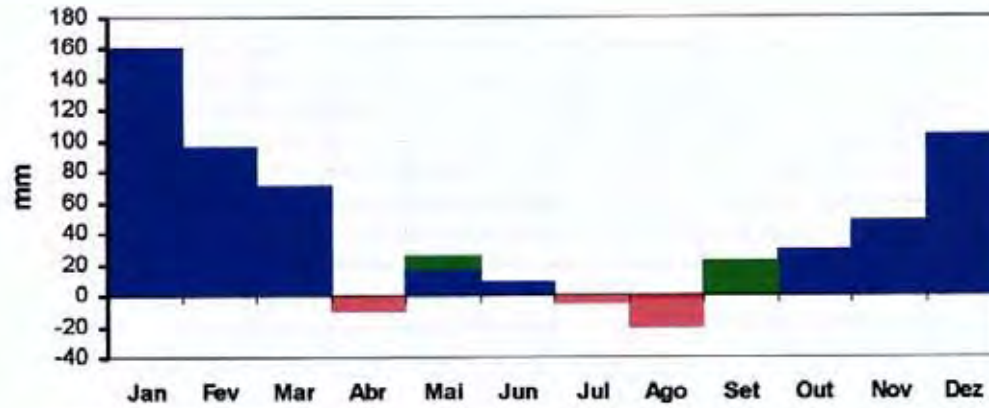
Cidade ⇒ Botucatu-SP Lat.: 22,85° S Long.: -26,80° W Alt.: 786 m CAD = 100mm



Extrato do Balanço Hídrico Mensal



Deficiência, Excedente, Retirada e Reposição Hídrica ao longo do período



■ Deficiência ■ Excedente ■ Retirada ■ Reposição

Tabela 1 - Número dentro do grupo (NºG) , número do microchip, registro no CEVAP (RG), município de procedência, comprimentos total (CT) / cauda (CC) e peso das serpentes *Crotalus durissus terrificus* pertencentes ao Grupo I.

Nº G	Microchip	RG	Procedência	CT(cm)	CC(cm)	Peso(g)
01	963000000308516	1481	Botucatu	112,5	12	840
02	963000000328111	1487	Bofete	101	9,5	630
03	963000000343925	1392	Botucatu	90	9	700
04	963000000317971	1531	Botucatu	95	9,5	730
05	963000000347646	1529	Laranjal Paulista	83	8	350
06	963000000328805	1532	Botucatu	112	10	830
07	963000000324799	1478	Bofete	98	9,5	630
08	963000000361940	1484	Conchas	96,5	9	440
09	963000000304685	1533	Botucatu	112	12	1150
10	963000000304503	1297	Laranjal Paulista	107	13	600
11	963000000309750	1494	Pardinho	113	10	700
12	963000000312818	1534	Botucatu	87	9	400
13	963000000306034	1391	Botucatu	93	10	550
14	963000000369978	1485	Botucatu	96,5	8,5	560
15	963000000313128	1537	Botucatu	86	8	410
16	963000000348245	1536	Pardinho	92	10	800

Tabela 2 - Número dentro do grupo (NºG) , número do microchip, registro no CEVAP (RG), município de procedência, comprimentos total (CT) / cauda (CC) e peso das serpentes *Crotalus durissus terrificus* pertencentes ao Grupo II.

Nº G	Microchip	RG	Procedência	CT(cm)	CC(cm)	Peso(g)
01	963000000345721	1134	Anhembi	89	7,5	400
02	963000000346543	1141	Laranjal Paulista	101,5	10	500
03	963000000362602	1146	Bofete	92,5	8	460
04	963000000322264	1199	Laranjal Paulista	90	9	400
05	963000000307343	1207	Pardinho	90	10	490
06	963000000327145	1206	Botucatu	100	10	550
07	963000000318731	1225	Conchas	101	9	580
08	963000000303555	1237	Botucatu	83	9	495
09	963000000368009	1244	Laranjal Paulista	84	8	280
10	963000000365153	1256	Bofete	73	6,5	245
11	963000000305208	1107	Laranjal Paulista	94	10	520
12	963000000315173	1117	Anhembi	92	9	420

Tabela 3 - Número dentro do grupo (NºG) , número do microchip, registro no CEVAP (RG), município de procedência, comprimentos total (CT) / cauda (CC) e peso das serpentes *Crotalus durissus terrificus* pertencentes ao Grupo III.

Nº G	Microchip	RG	Procedência	CT(cm)	CC(cm)	Peso(g)
01	963000000324800	1393	Pardinho	83	6	490
02	963000000341926	1526	Anhembi	97	6	750
03	963000000313527	1530	Botucatu	76	4,5	300
04	963000000340159	1475	Conchas	60	4	100
05	963000000330228	1477	Bofete	78	4,5	280
06	963000000317879	1480	Botucatu	105	5,5	560
07	963000000309261	1496	São Manoel	71	5,5	190
08	963000000321803	1499	Laranjal Paulista	82	5	330
09	963000000306382	1298	Bofete	92	5	450
10	963000000331503	1301	Botucatu	90	5	390
11	963000000331266	1306	São Manoel	67	4,5	150
12	963000000305559	1412	Pardinho	93	6	490
13	963000000324443	1490	Anhembi	73	6,5	180
14	963000000310922	1464	Pardinho	95	6,5	700
15	963000000314043	1309	Itatinga	91	6	460
16	963000000370521	1503	Conchas	80,5	4	100

Tabela 4 - Número dentro do grupo (NºG) , número do microchip, registro no CEVAP (RG), município de procedência, comprimentos total (CT) / cauda (CC) e peso das serpentes *Crotalus durissus terrificus* pertencentes ao Grupo IV.

Nº G	Microchip	RG	Procedência	CT(cm)	CC(cm)	Peso(g)
01	963000000313455	1145	Bofete	90	5	390
02	963000000370116	1196	Pardinho	96,5	6	410
03	963000000312412	1214	Botucatu	91	5,5	440
04	963000000318790	1216	Bofete	91	6,5	445
05	963000000334117	1292	Laranjal Paulista	64	4	140
06	963000000343271	1290	Pardinho	86	5,5	340
07	963000000303240	1289	Anhembi	82,5	6	345
08	963000000325009	1278	Anhembi	94,5	6,5	565
09	963000000369528	1270	Botucatu	93,5	5,5	500
10	963000000337121	1239	Botucatu	90	7	550
11	963000000313514	1254	Bofete	91	5,5	420
12	963000000307194	1118	Pardinho	103	8	510
13	963000000366489	1255	Bofete	92	6	450
14	963000000320001	1109	Anhembi	88	6	840
15	963000000331768	1286	Botucatu	85,5	5,5	350
16	963000000330593	1177	Bofete	78	6	300

Tabela 5 - Número dentro do grupo (NºG) , número do microchip, registro no CEVAP (RG), município de procedência, comprimentos total (CT) / cauda (CC) e peso das serpentes *Crotalus durissus terrificus* pertencentes ao Grupo V.

Nº G	Microchip	RG	Procedência	CT(cm)	CC(cm)	Peso(g)
01	963000000363311	1510	Itatinga	92	9	600
02	963000000367678	1527	Botucatu	108	9	980
03	Óbito	1535	Laranjal Paulista	75	7	300
04	963000000328631	1602	Pardinho	86	8,5	400
05	963000000329759	1635	Itatinga	115	9	1050
06	963000000368285	1636	Itatinga	107	9	790
07	963000000363384	1637	Itatinga	120	9	1130
08	963000000321904	1638	Itatinga	110	8	830
09	Óbito	1607	Anhembi	94	7	410
10	963000000363091	1640	Pardinho	56	8	200
11	963000000303220	1641	Pardinho	87,5	10	480
12	963000000340238	1651	Botucatu	69	6	125
13	Óbito	1647	Anhembi	63,5	5	125
14	963000000322233	1652	Botucatu	65	5	150
15	963000000324072	1661	Botucatu	85	9	550
16	963000000337038	1666	Avaré	91,5	9,5	550

Tabela 6 - Número dentro do grupo (NºG) , número do microchip, registro no CEVAP (RG), município de procedência, comprimentos total (CT) / cauda (CC) e peso das serpentes *Crotalus durissus terrificus* pertencentes ao Grupo VI.


Nº G	Microchip	RG	Procedência	CT(cm)	CC(cm)	Peso(g)
01	963000000306317	1642	Porangaba	116	8	1110
02	963000000319047	1643	Bofete	86	6	710
03	963000000346669	1644	Botucatu	79	5	300
04	963000000365581	1645	Botucatu	71	4,5	250
05	963000000331374	1646	Botucatu	88	5	630
06	963000000305234	1654	Botucatu	60	6	150
07	963000000329958	1663	Pardinho	92	6,5	850
08	963000000336844	1657	Botucatu	81	5,5	350
09	963000000314074	1664	Pardinho	78	5	500
10	963000000371462	1665	Pardinho	88	5,5	700
11	963000000349050	1668	Anhembi	92	6	700
12	963000000364592	1690	Botucatu	72	5	210
13	Óbito	1691	Botucatu	67	5	160
14	963000000330697	1692	Botucatu	56	4,5	80
15	963000000341717	1693	Pardinho	60	4	120
16	Óbito	1694	Pardinho	59	4	100

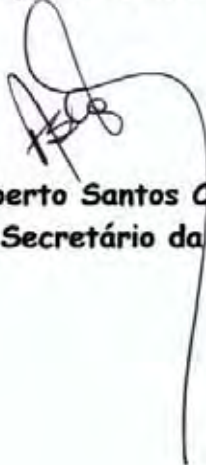


CERTIFICADO

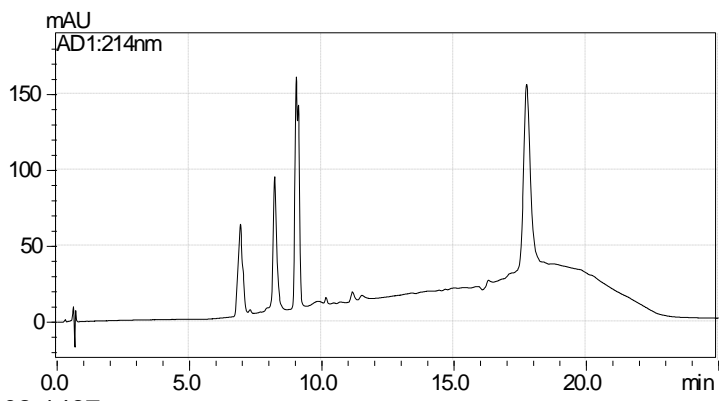
CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 724 obre o Projeto de Pesquisa "Variação sexual, ontogenética e ambiental do veneno de *Crotalus durissus terrificus* da região de Botucatu-SP: caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica", a ser conduzido por Airton Lourenço Júnior, orientado pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que as cobras e os camundongos provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 26 de março de 2.009

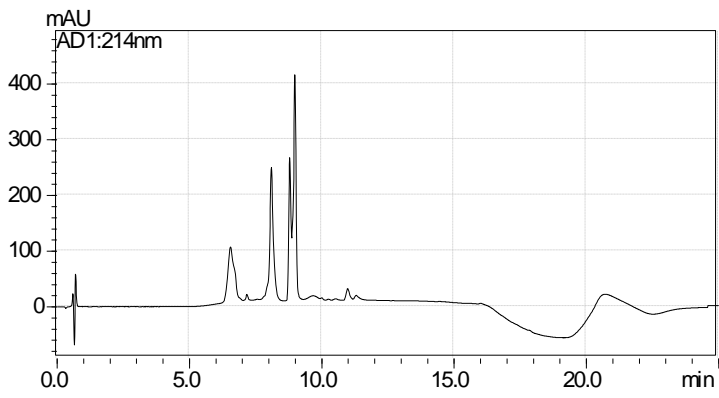

Prof. Dr^a Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

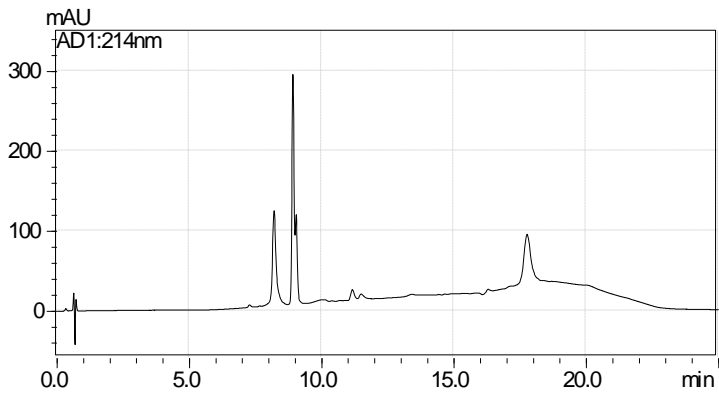
G1-01-1481



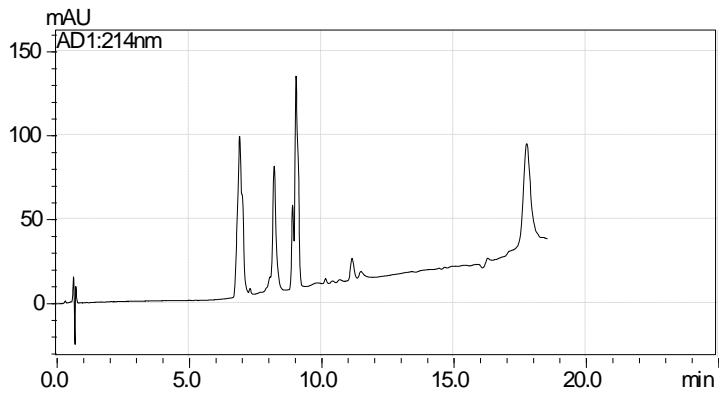
G1-02-1487



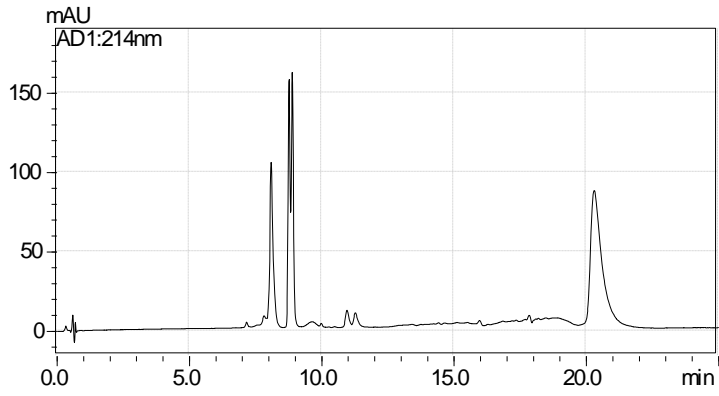
G1-03-1392



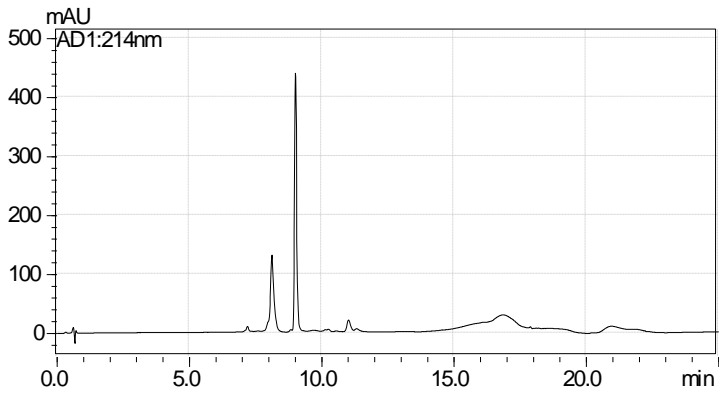
G1-04-1531



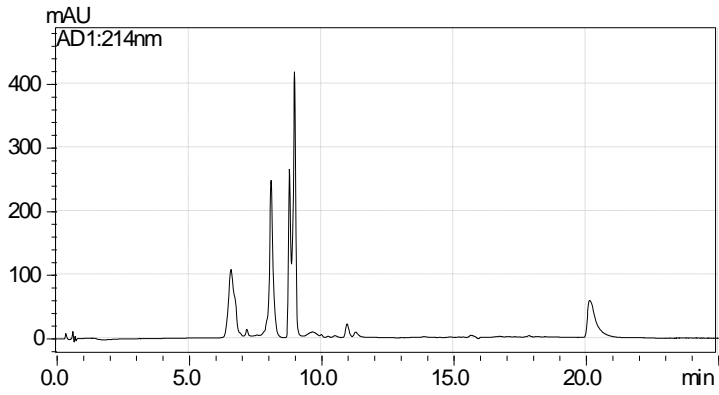
G1-05-1529



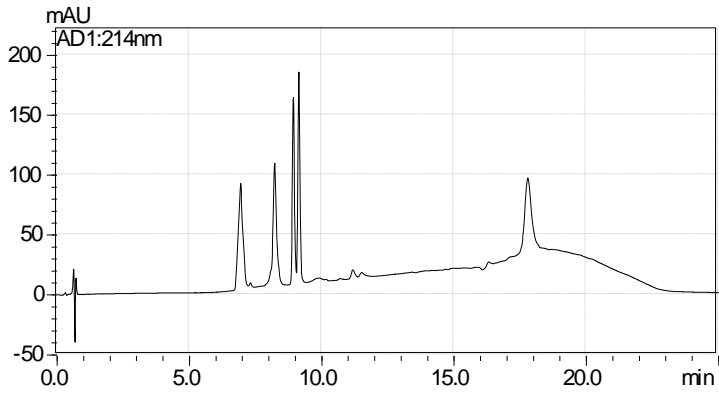
G1-06-1532



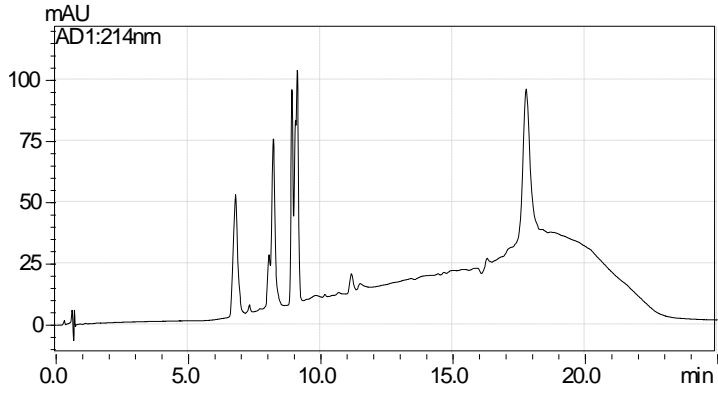
G1-07-1478



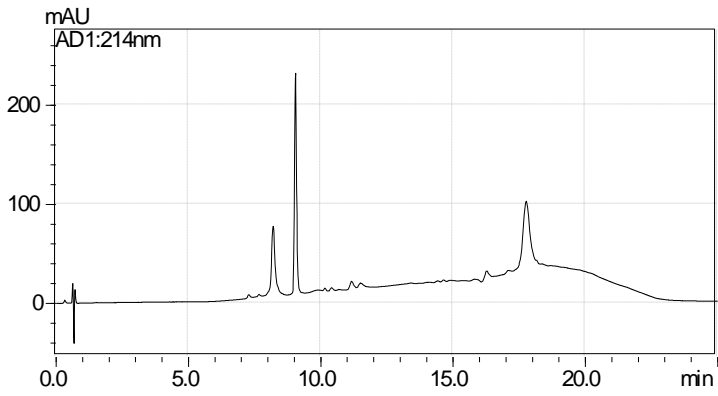
G1-08-1484



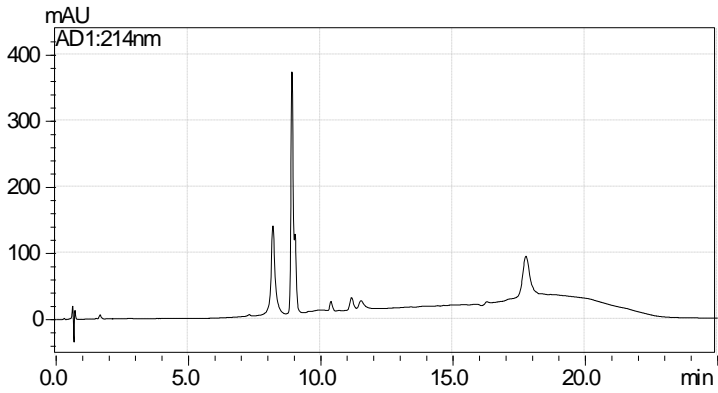
G1-09-1533



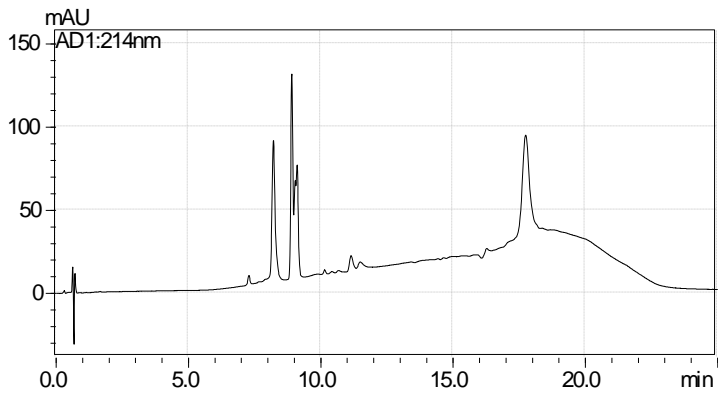
G1-10-1297



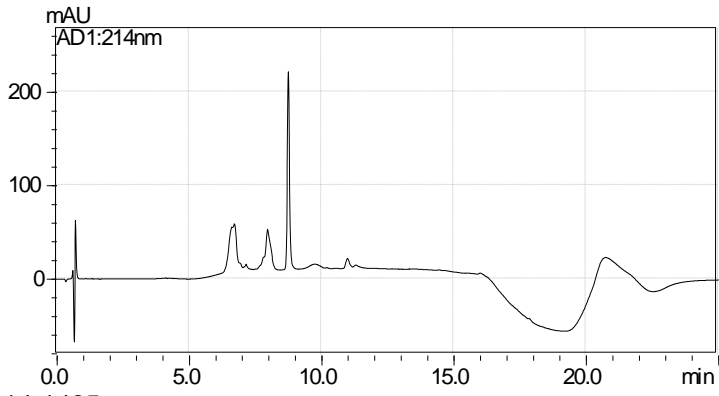
G1-11-1494



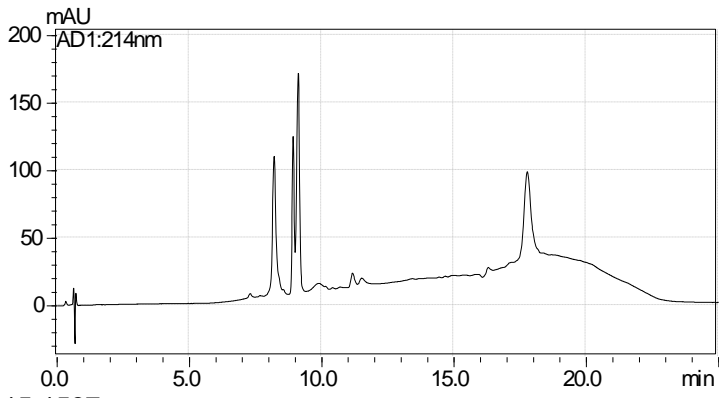
G1-12-1534



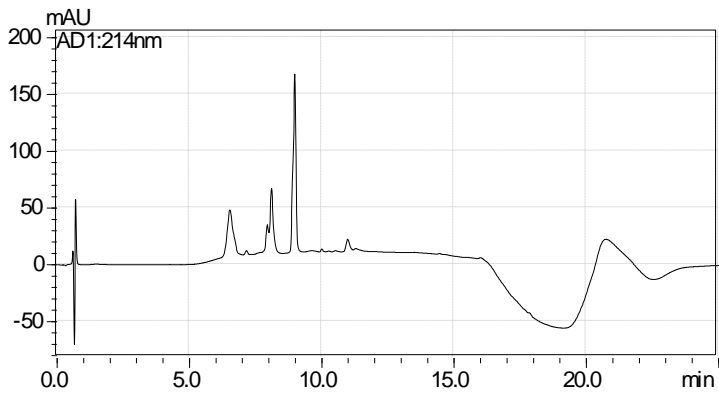
G1-13-1391



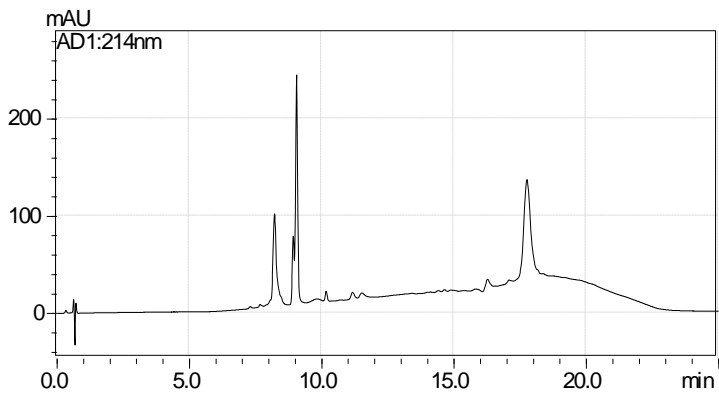
G1-14-1485



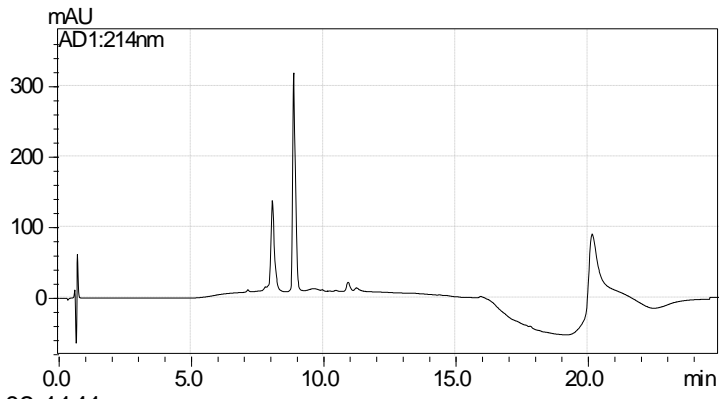
G1-15-1537



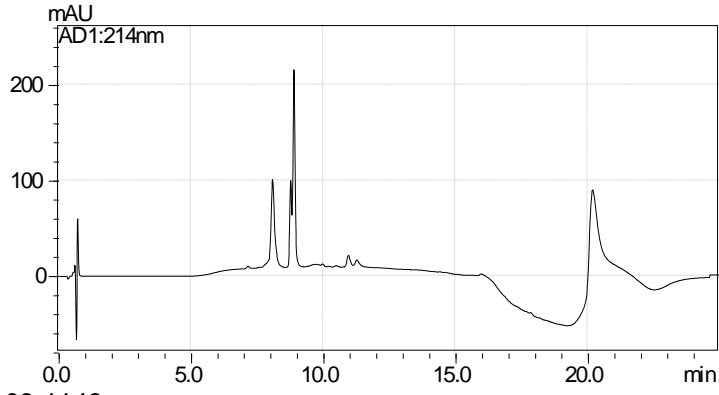
G1-16-1536



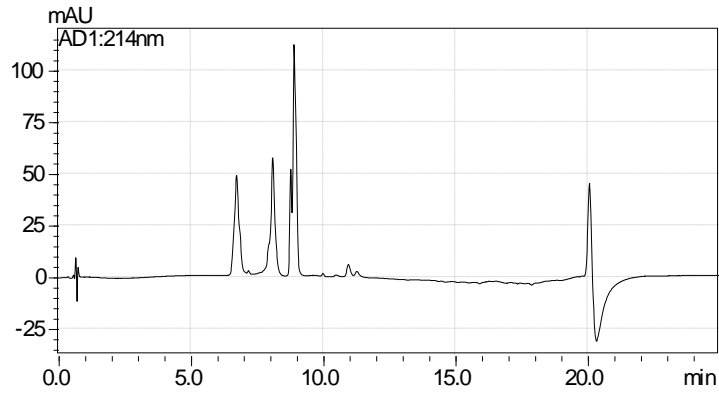
G2-01-1134



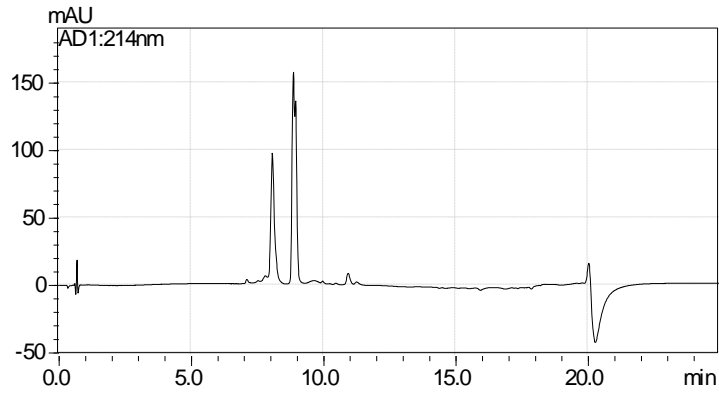
G2-02-1141



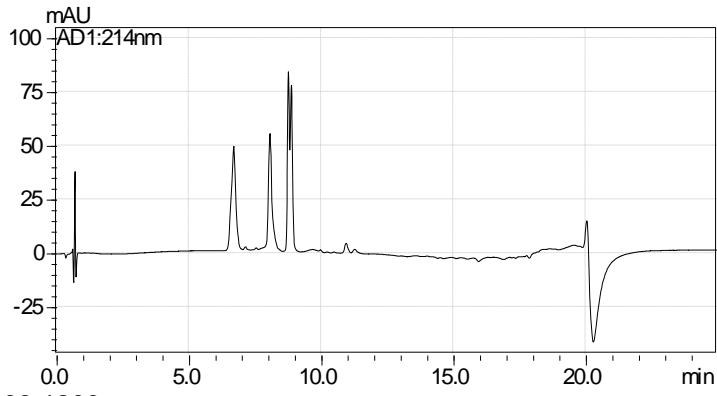
G2-03-1146



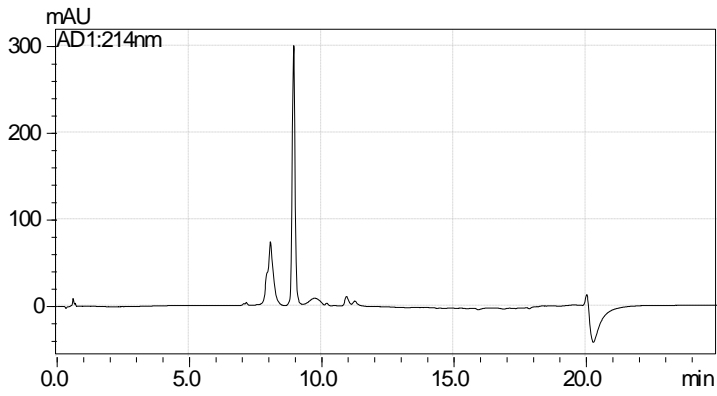
G2-04-1199



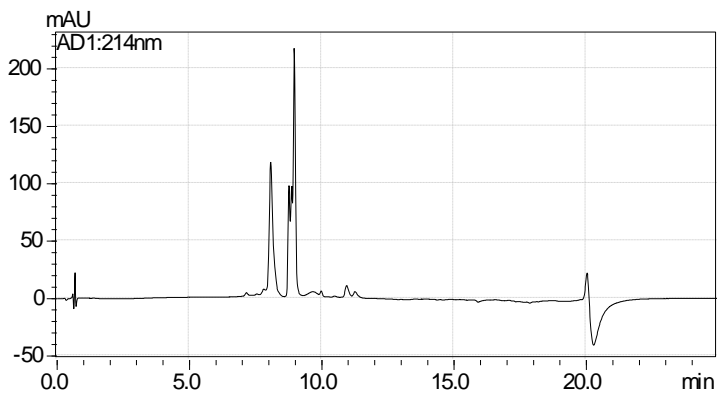
G2-05-1207



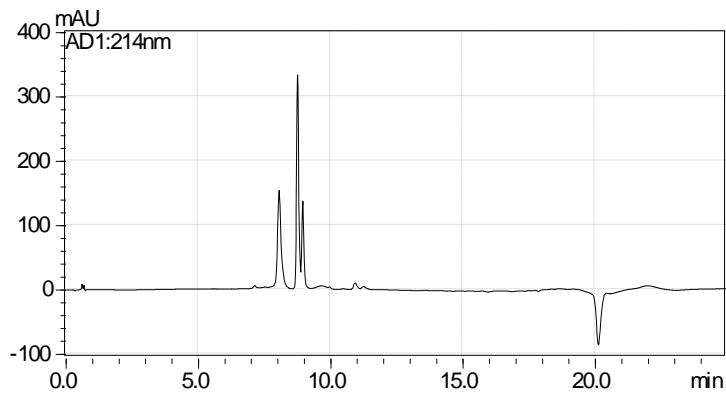
G2-06-1206



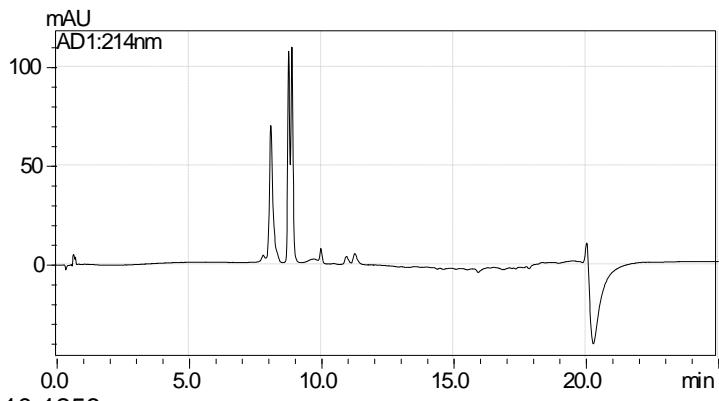
G2-07-1225



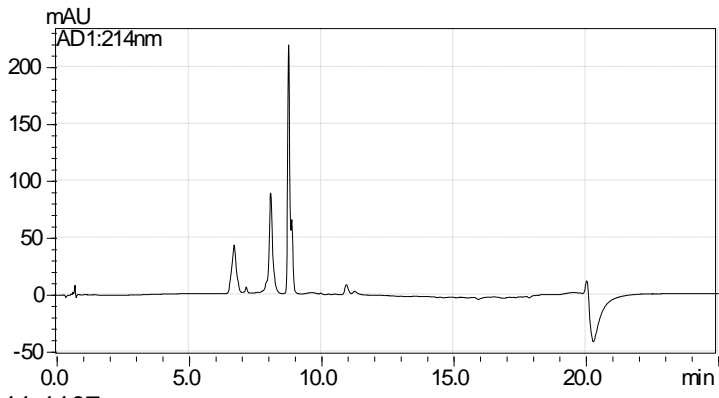
G2-08-1237



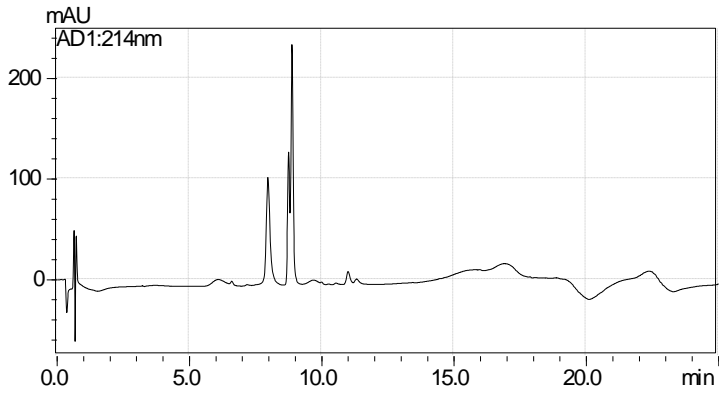
G2-09-1244



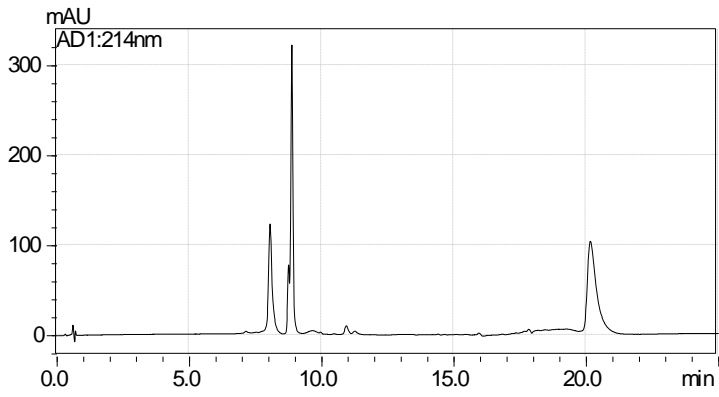
G2-10-1256



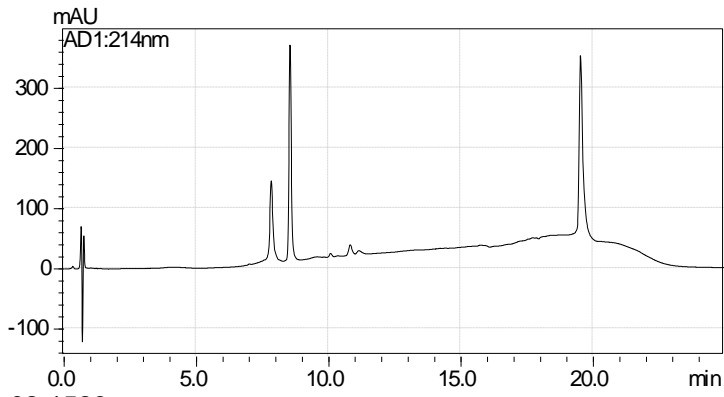
G2-11-1107



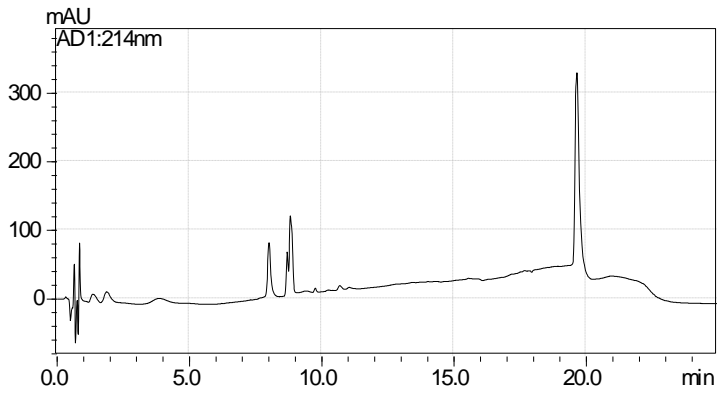
2-12-1117



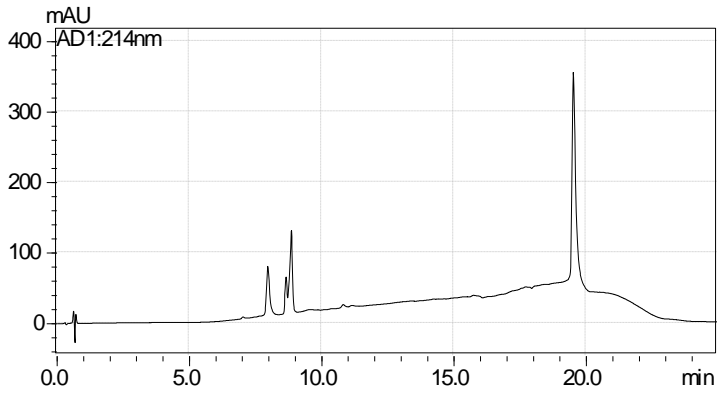
G3-01-1393



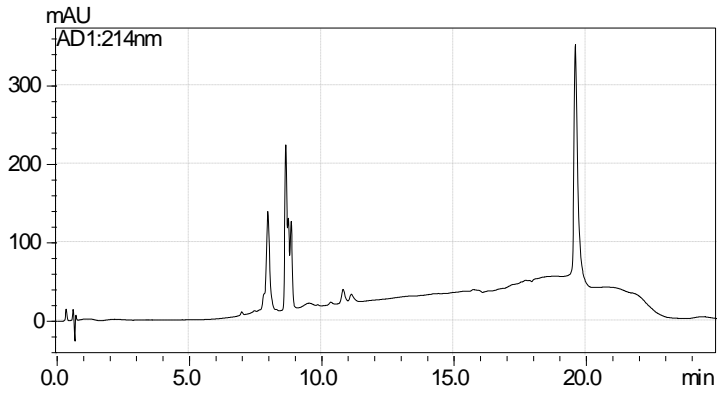
G3-02-1526



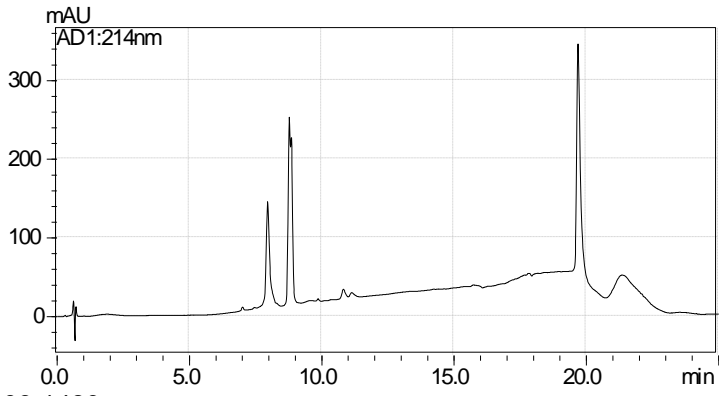
G3-03-1530



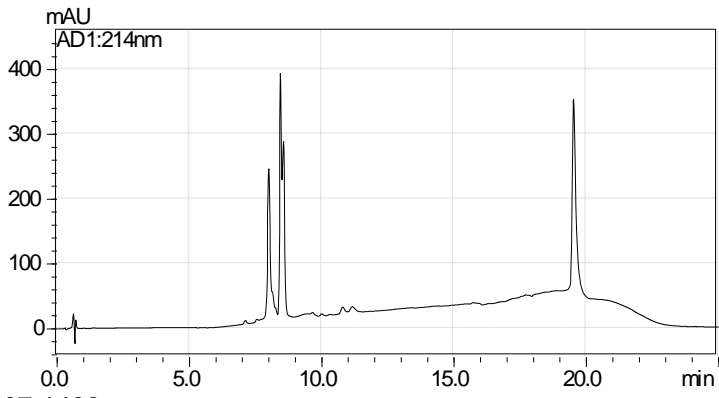
G3-04-1475



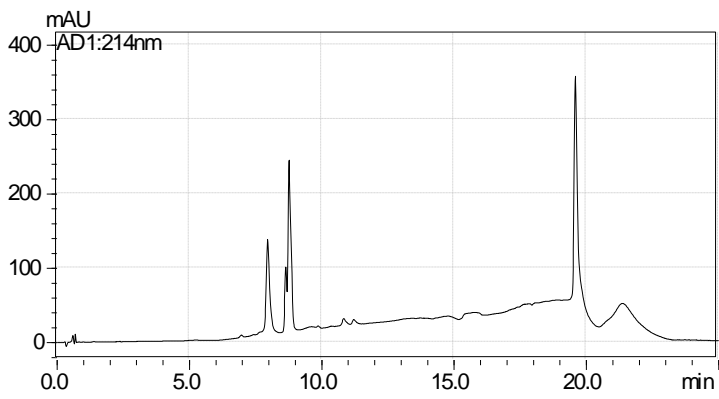
G3-05-1477



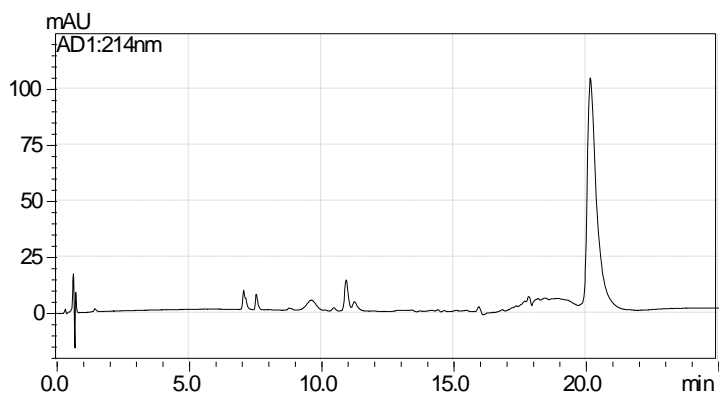
G3-06-1480



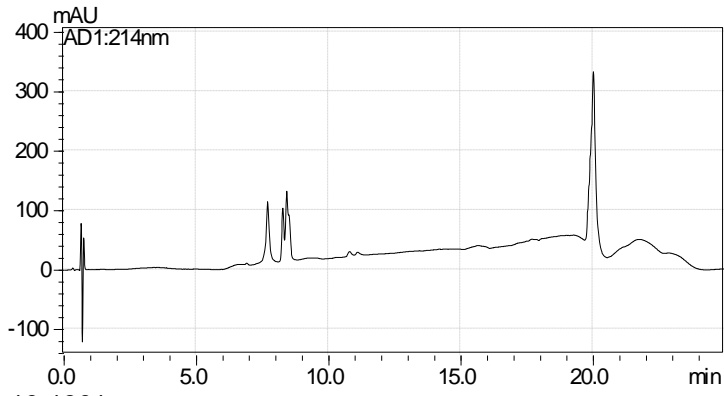
G3-07-1496



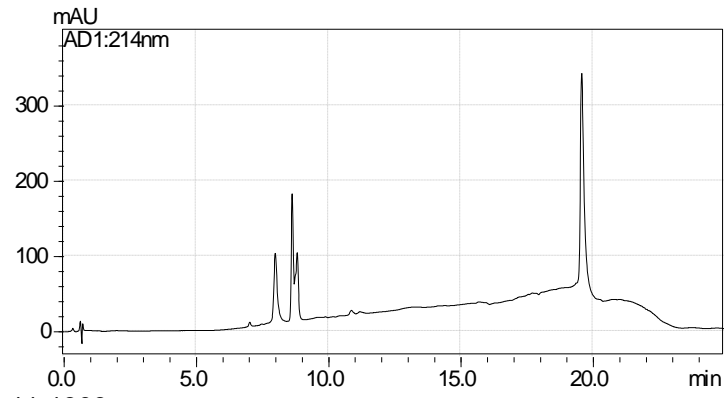
G3-08-1499



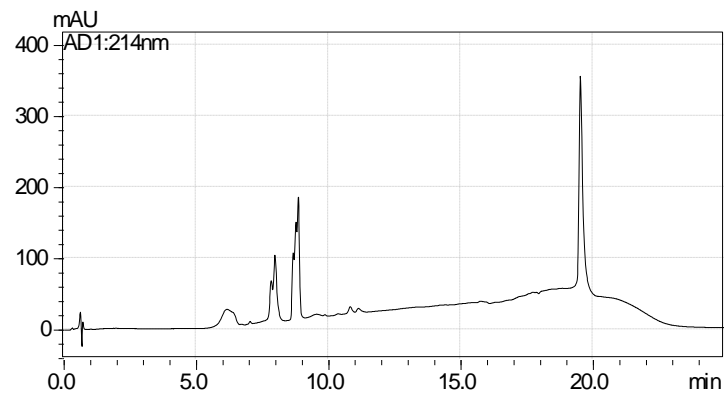
G3-09-1298



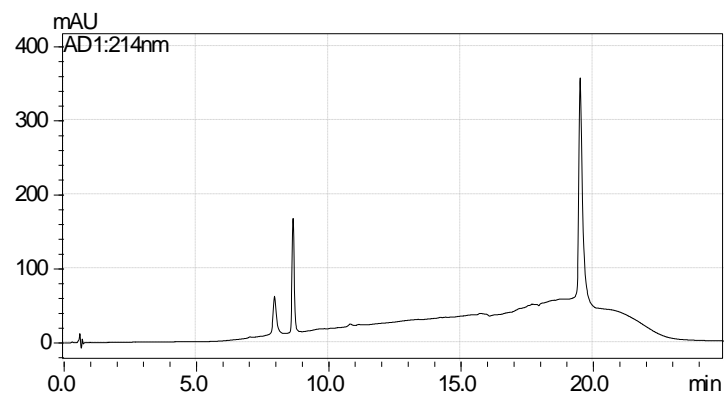
G3-10-1301



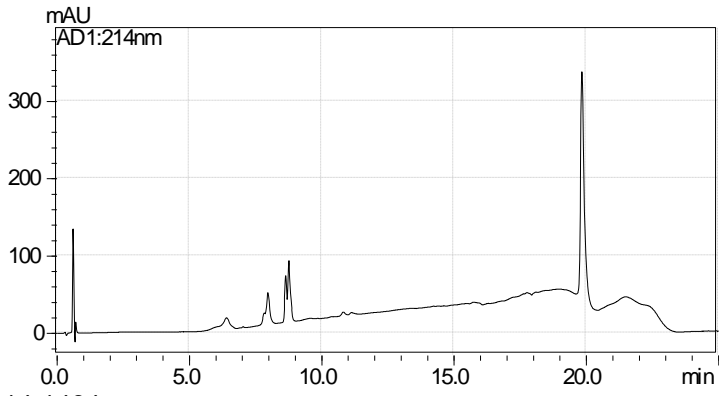
G3-11-1306



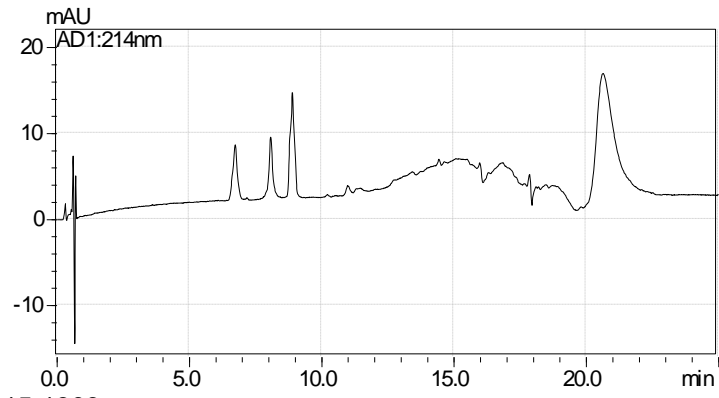
G3-12-1412



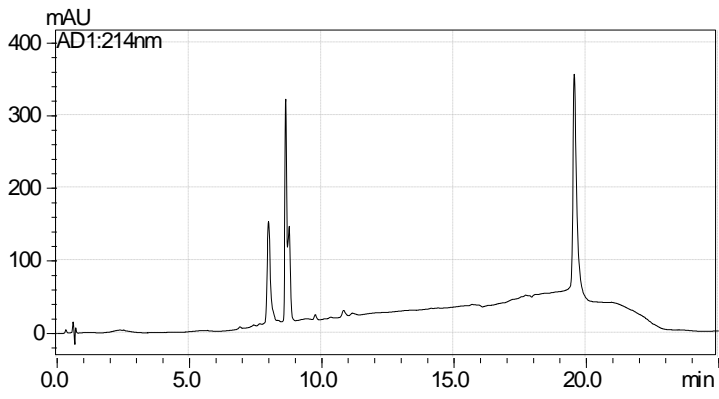
G3-13-1490



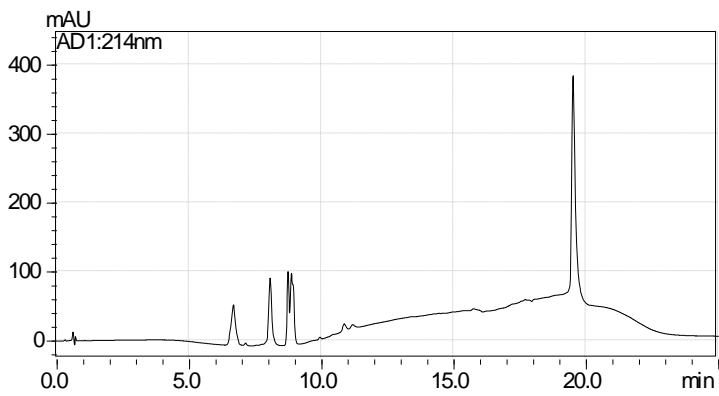
G3-14-1464



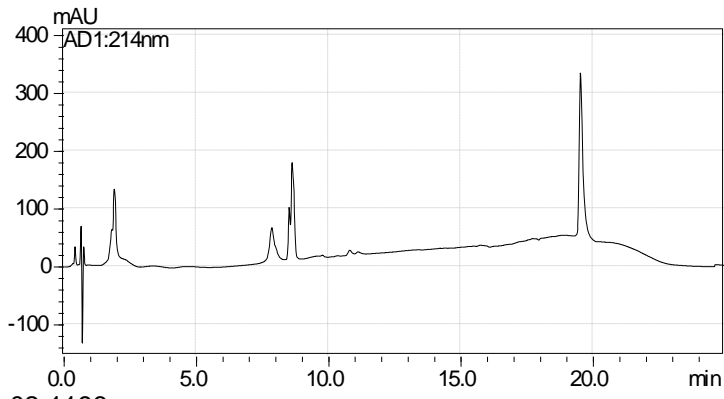
G3-15-1309



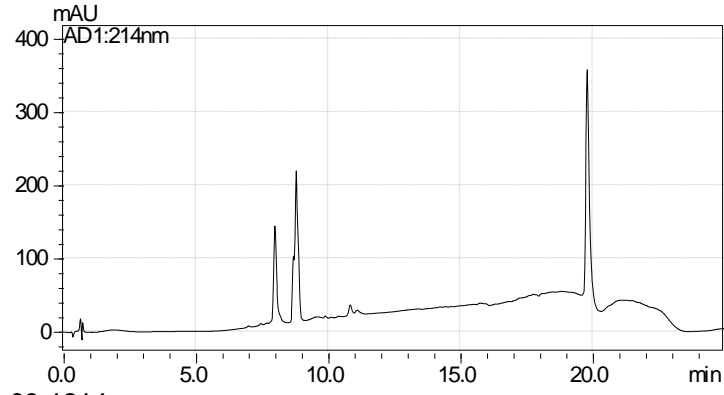
G3-16-1503



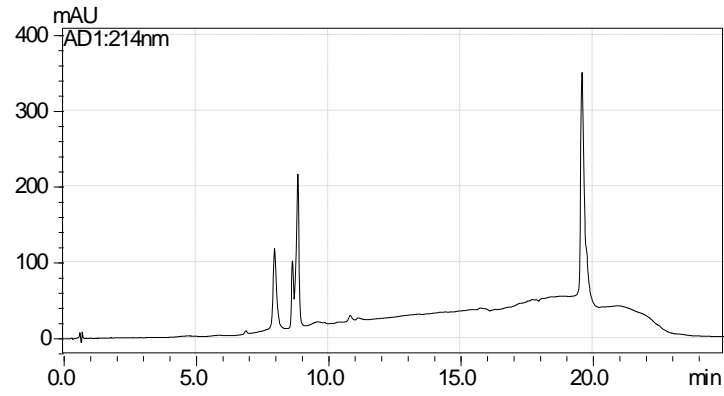
G4-01-1145



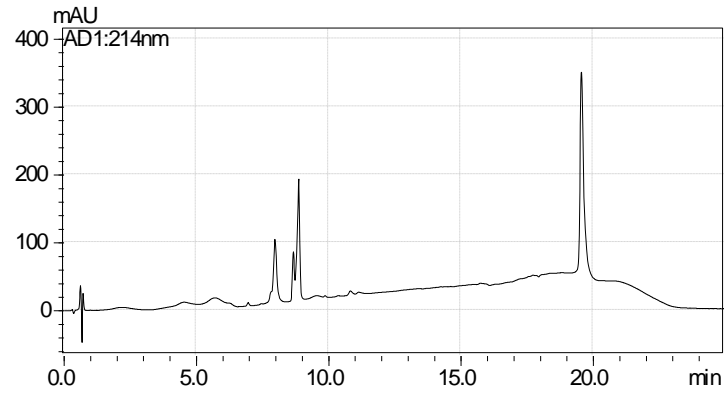
G4-02-1196



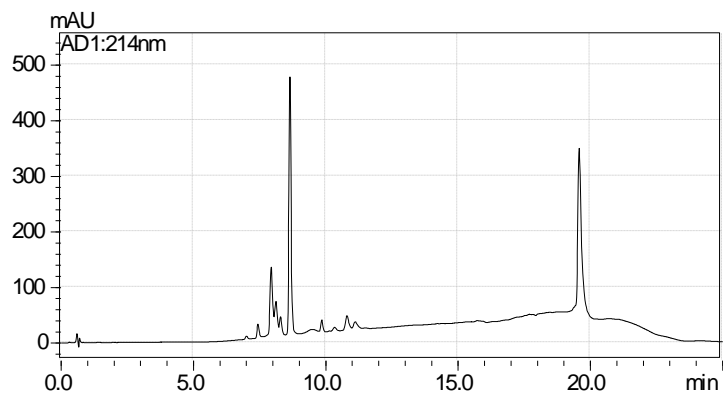
G4-03-1214



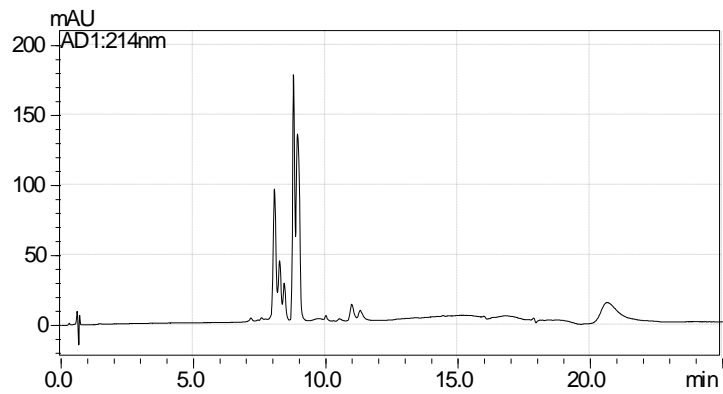
G4-04-1216



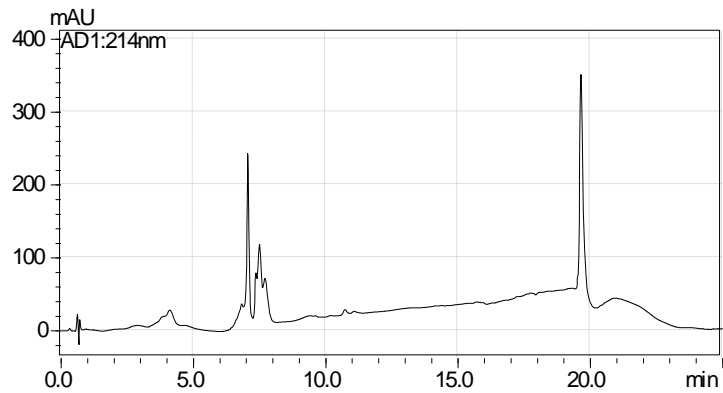
G4-05-1292



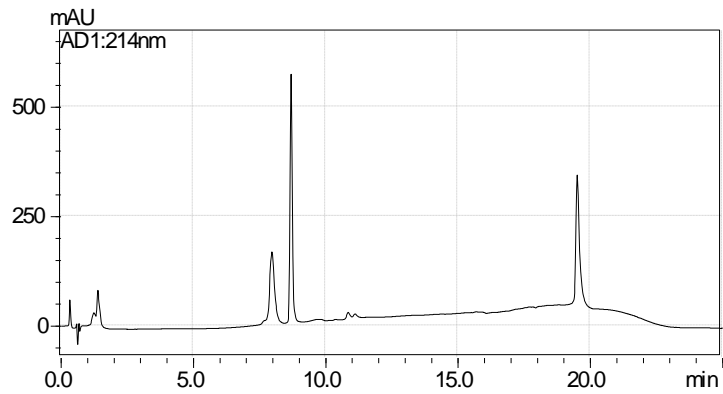
G4-06-1290



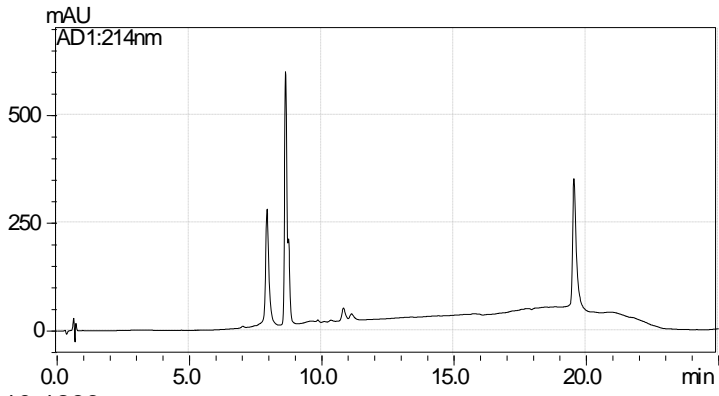
G4-07-1289



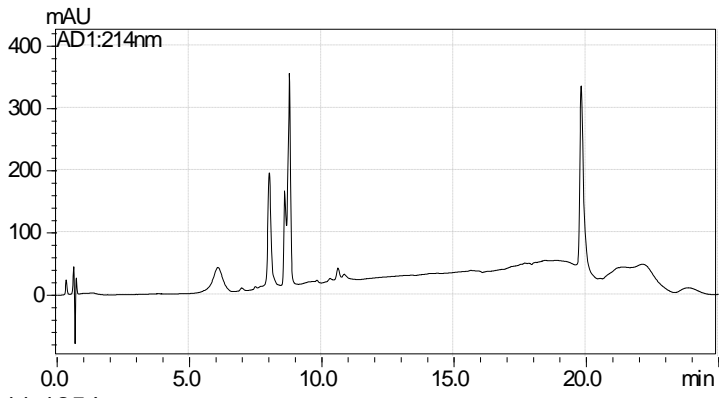
G4-08-1278



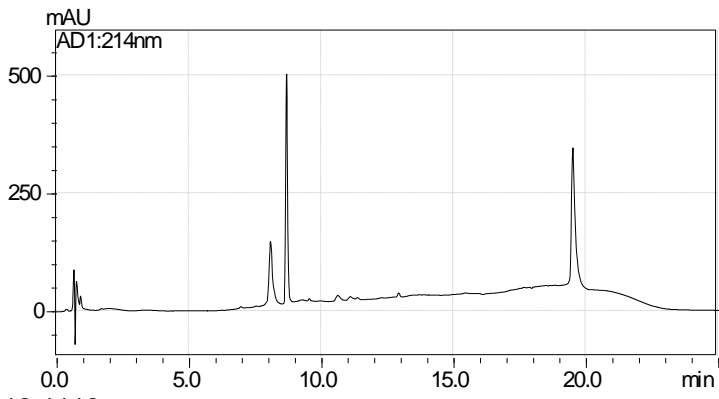
G4-09-1270



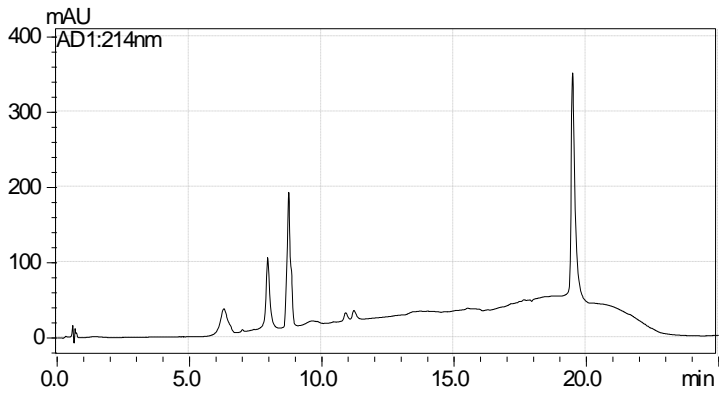
G4-10-1239



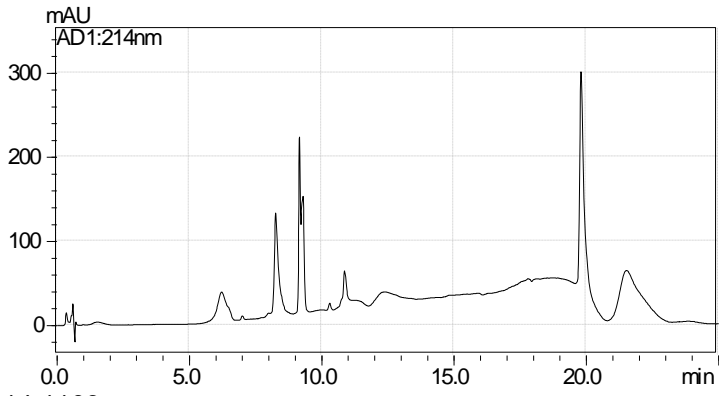
G4-11-1254



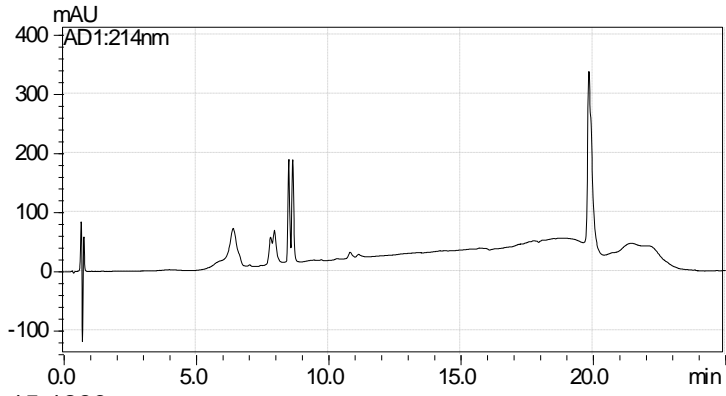
G4-12-1118



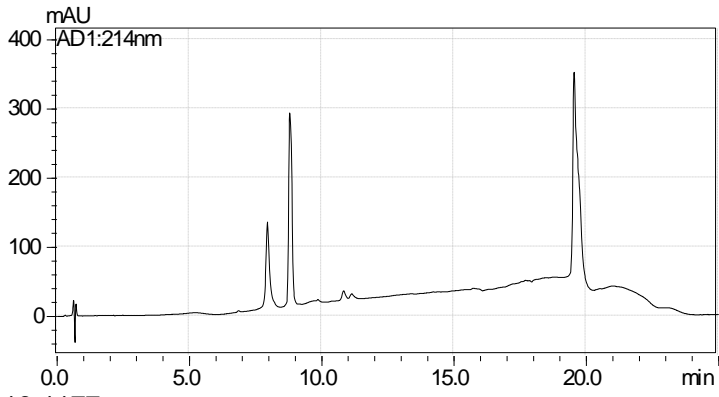
G4-13-1255



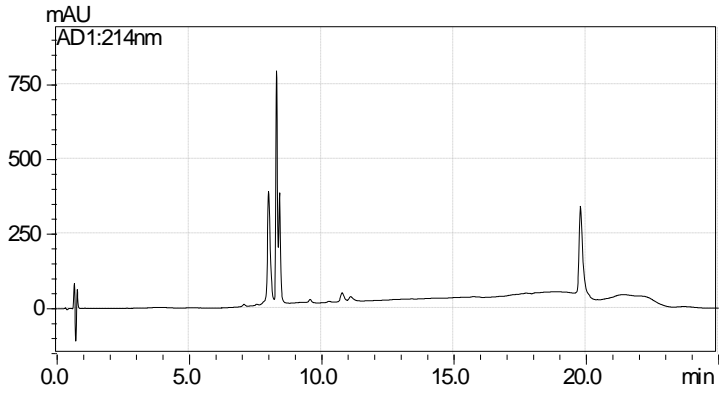
G4-14-1109



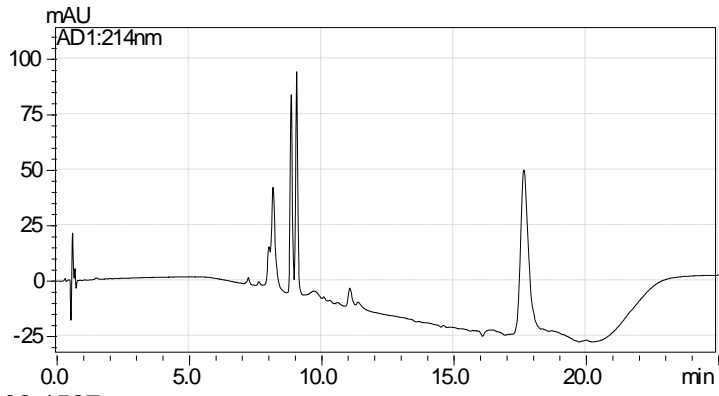
G4-15-1286



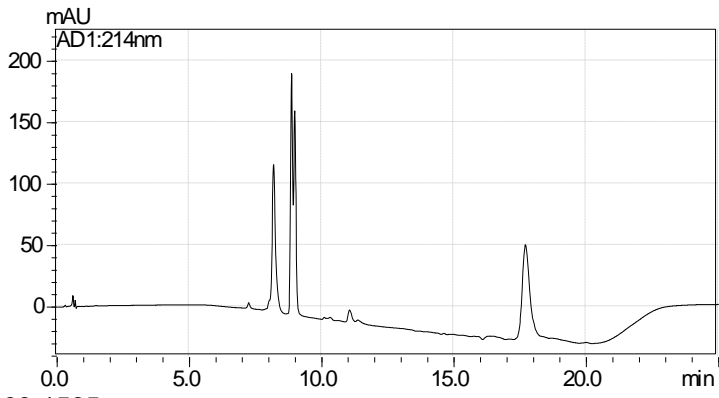
G4-16-1177



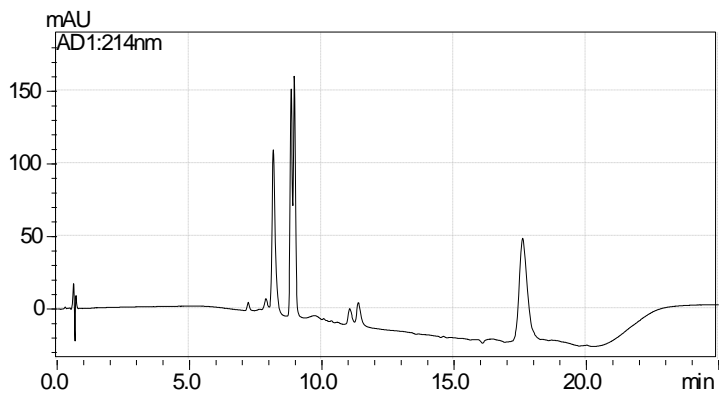
G5-01-1510



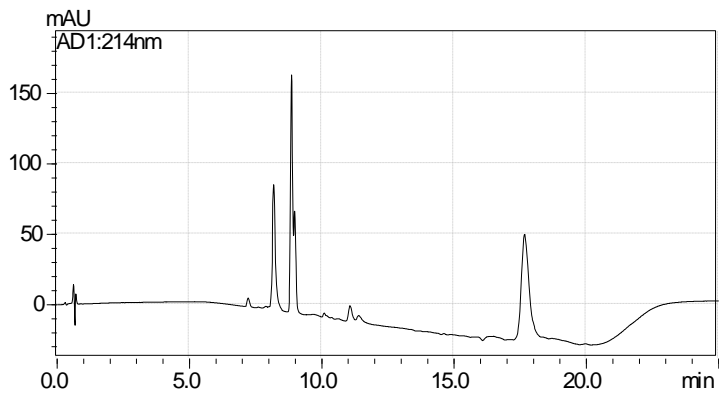
G5-02-1527



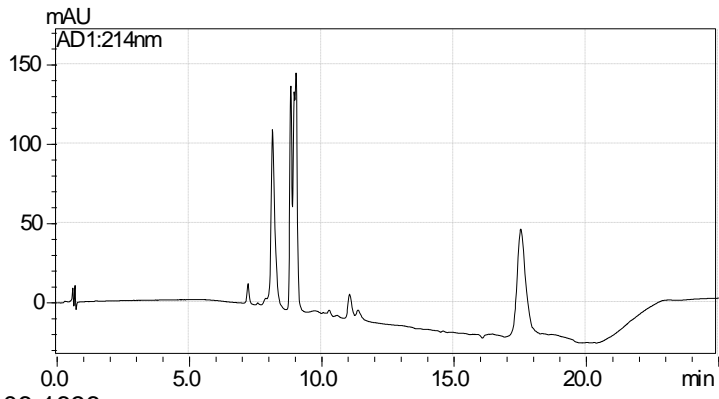
G5-03-1535



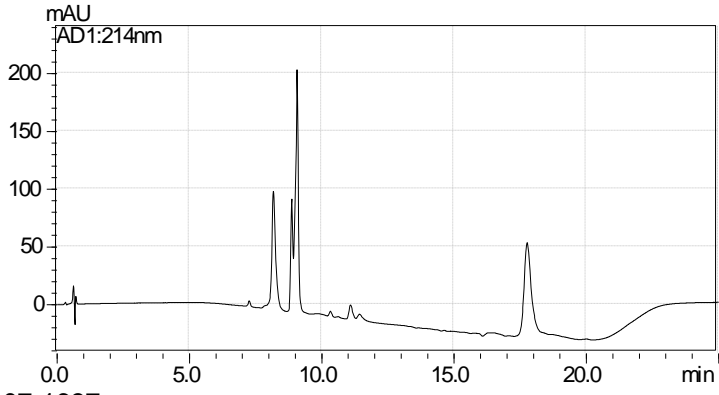
G5-04-1602



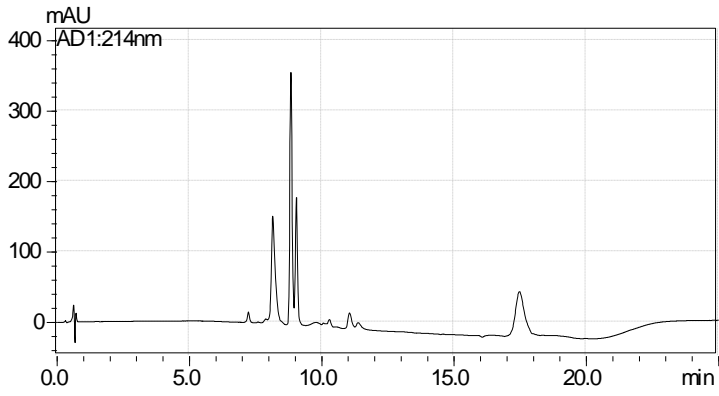
G5-05-1635



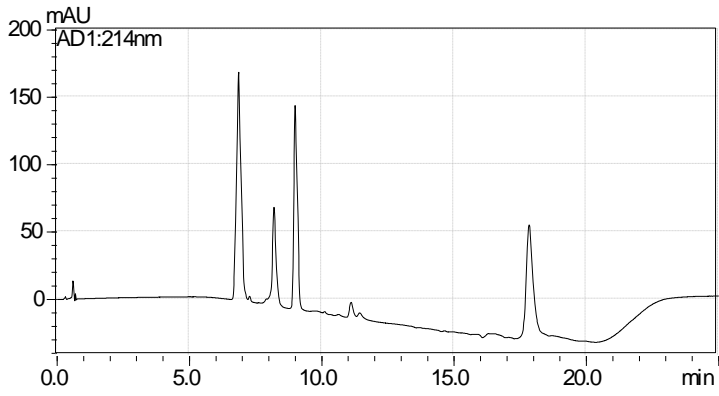
G5-06-1636



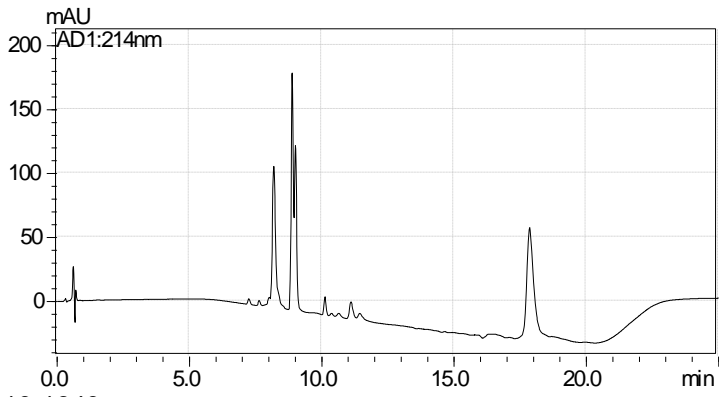
G5-07-1637



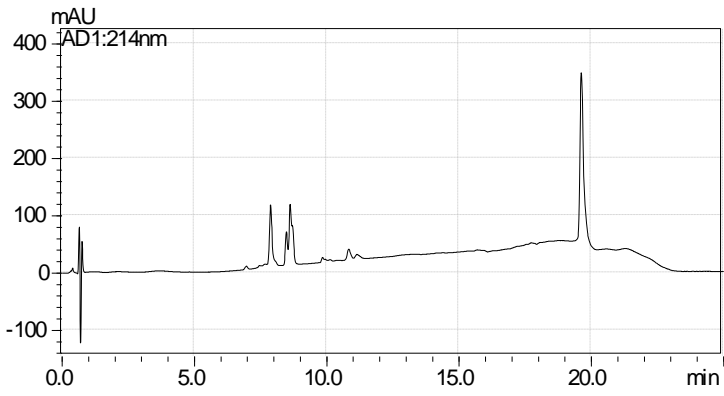
G5-08-1638



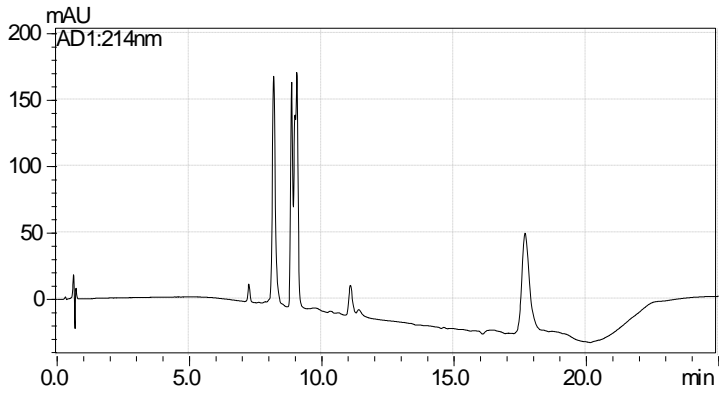
G5-09-1607



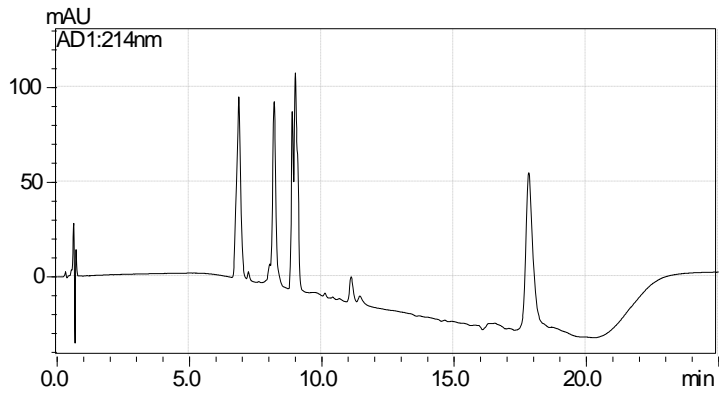
G5-10-1640



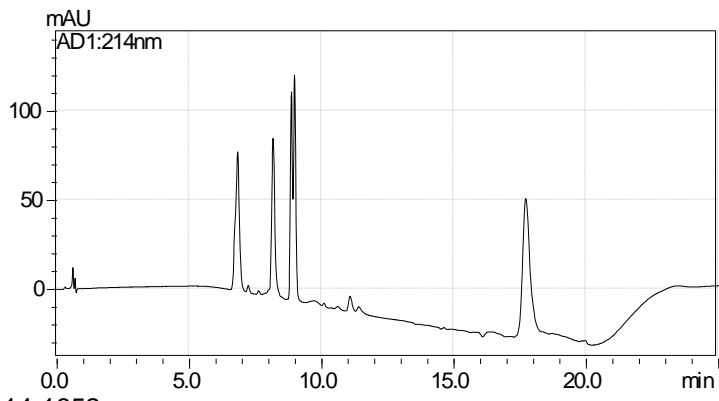
G5-11-1641



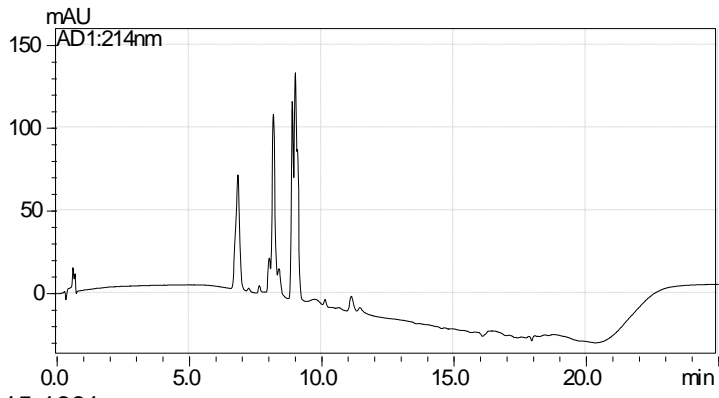
G5-12-1651



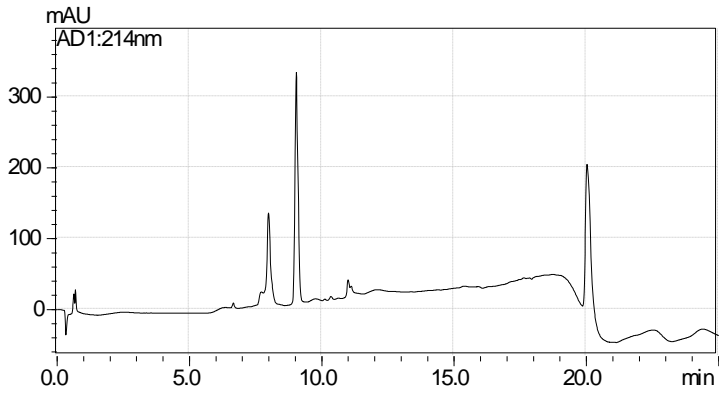
G5-13-1647



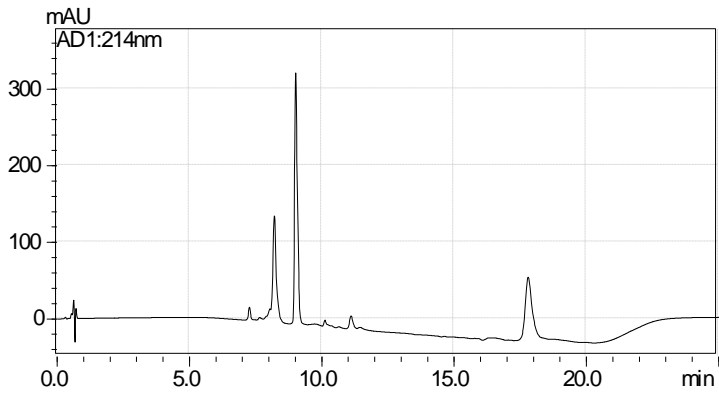
G5-14-1652



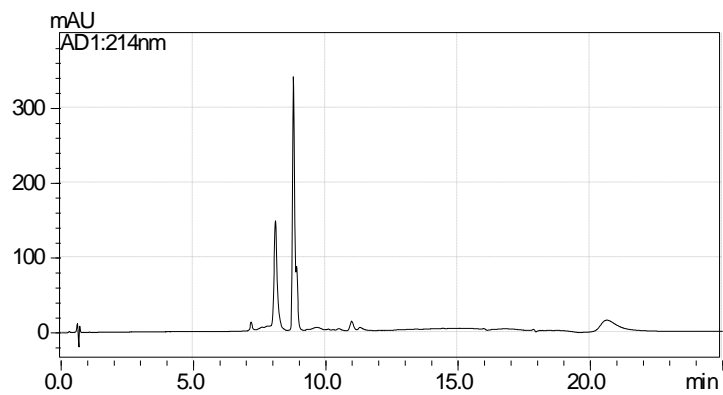
G5-15-1661



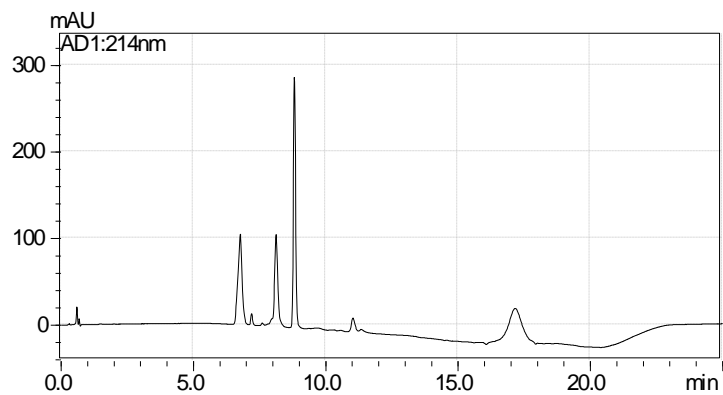
G5-16-1666



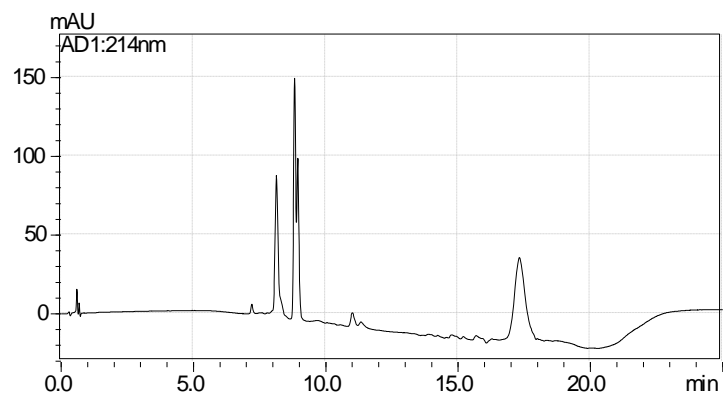
G6-01-1642



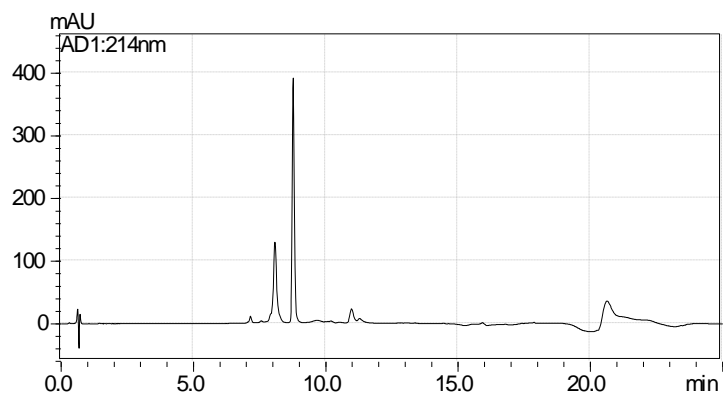
G6-02-1643



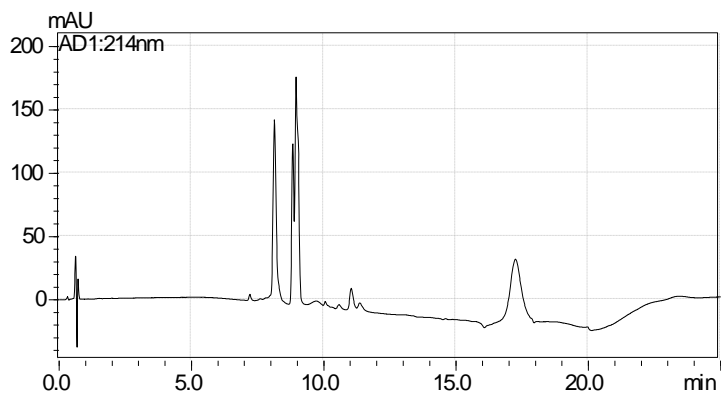
G6-03-1644



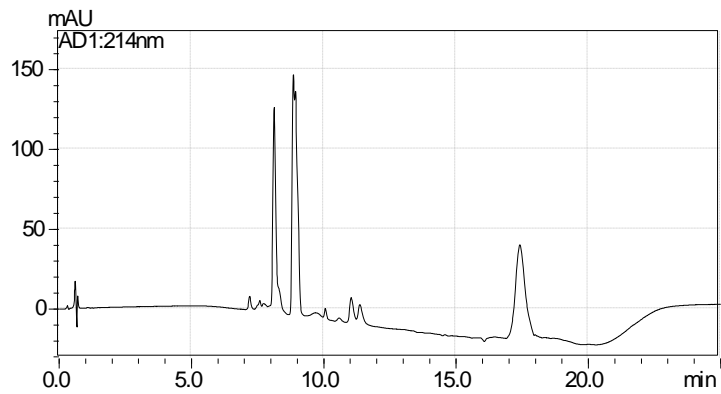
G6-04-1645



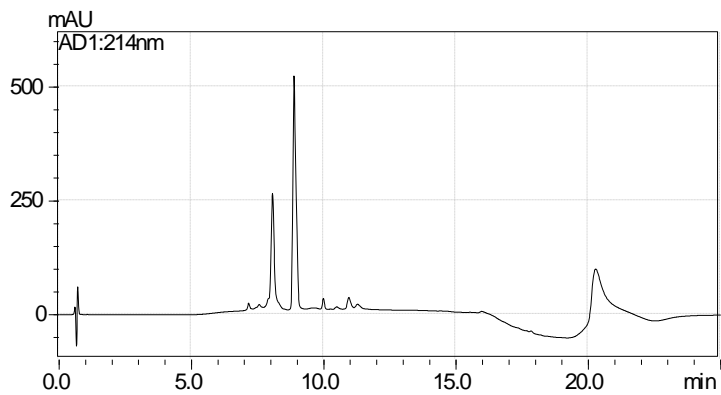
G6-05-1646



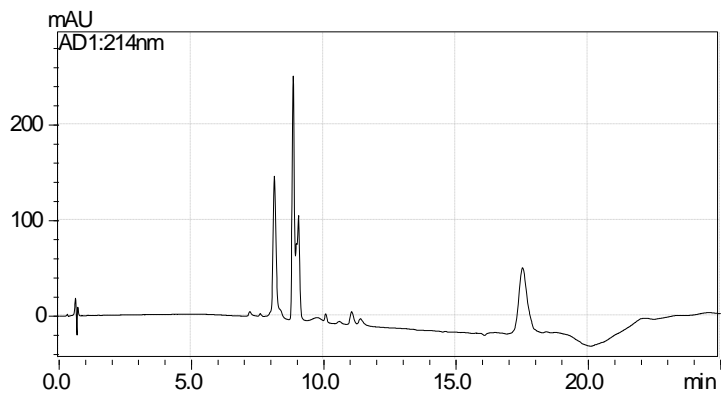
G6-06-1654



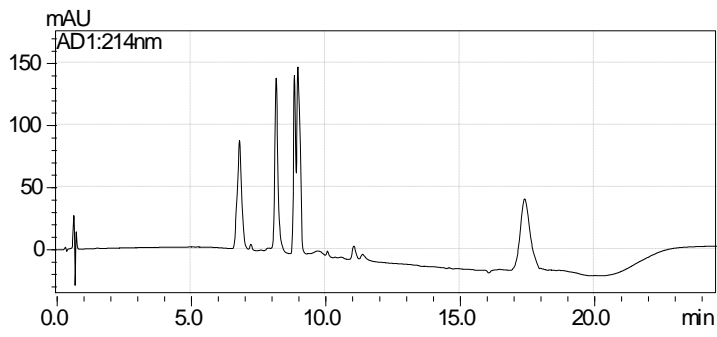
G6-07-1663



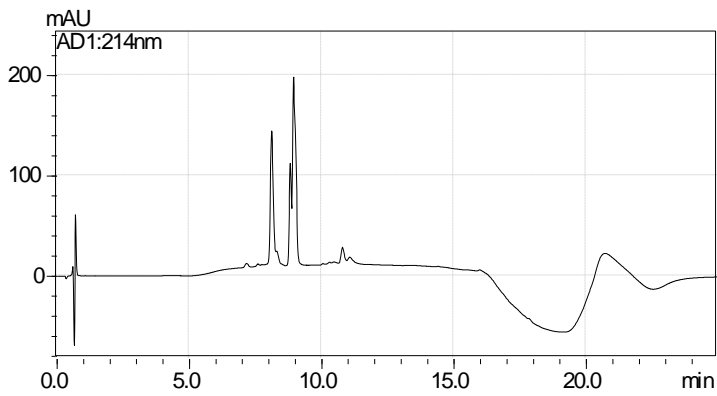
G6-08-1657



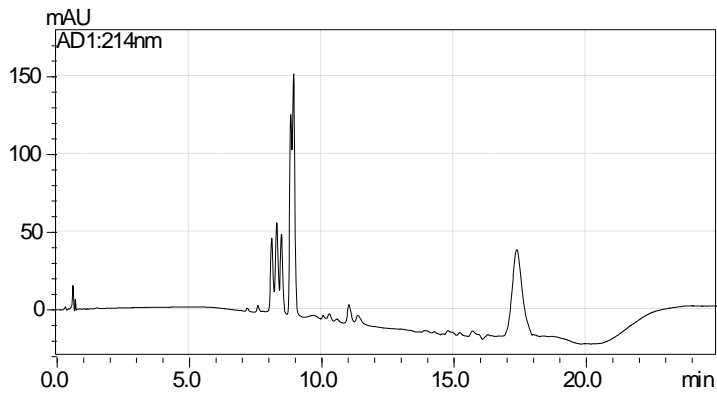
G6-09-1664



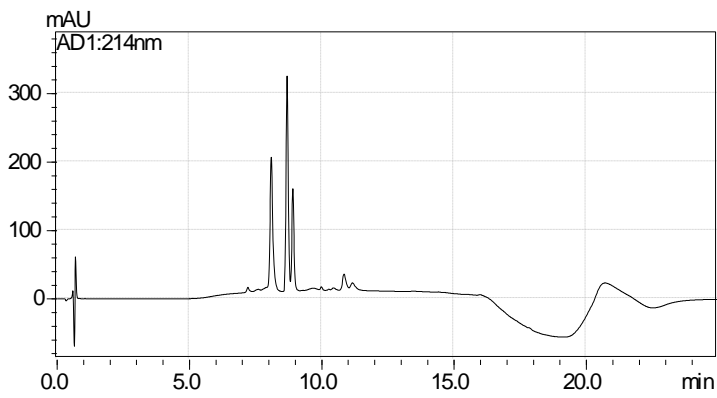
6-10-1665



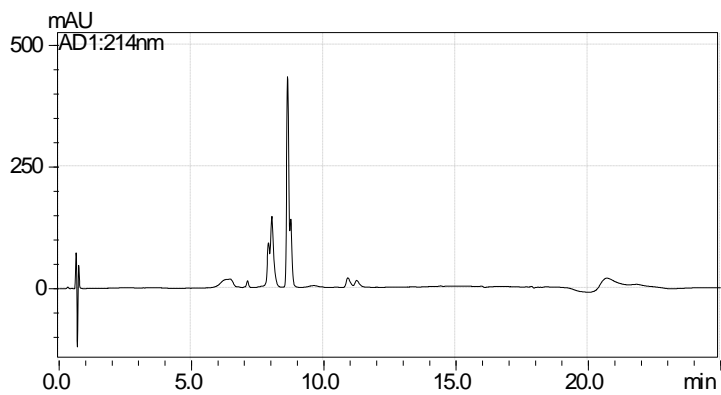
G6-11-1668



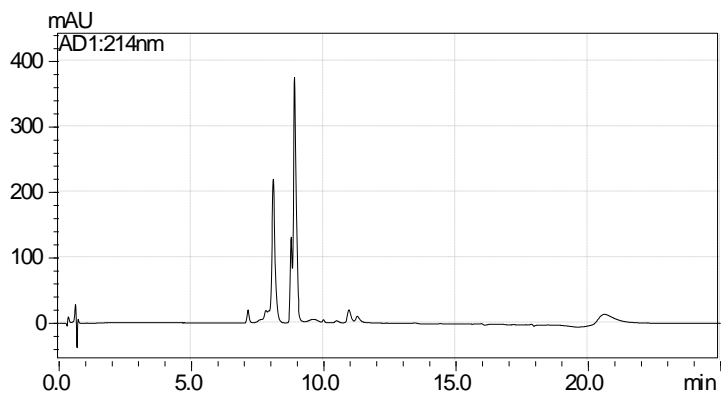
G6-12-1690



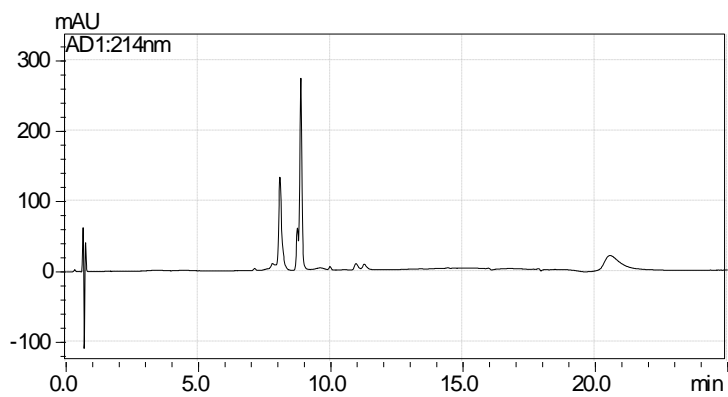
G6-13-1691



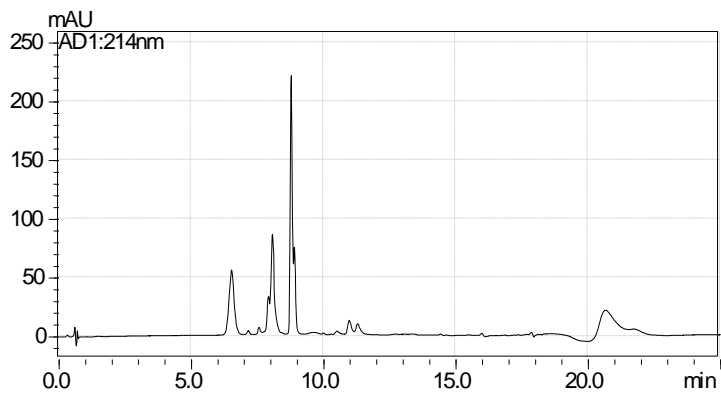
G6-14-1692



G6-15-1693



G6-16-1694



CDT- Filhotes

