

EDUARDO SAAD

**VARIAÇÃO SEXUAL, ONTOGENÉTICA E AMBIENTAL DO
VENENO DE *Bothrops jararaca* DA MICRO-REGIÃO DE
BOTUCATU – SP: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA,
BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA.**

Botucatu

2011

EDUARDO SAAD

**VARIAÇÃO SEXUAL, ONTOGENÉTICA E AMBIENTAL DO
VENENO DE *Bothrops jararaca* DA MICRO-REGIÃO DE
BOTUCATU – SP: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA,
BIOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Doenças Tropicais da
Faculdade de Medicina de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Botucatu

2011

Dedicatória

*O pensamento desliza, caminha pela minha infância, e lá
docilmente eu os vejo, conduzindo os seus filhos com tanto carinho,*

com tanta dedicação, com tanto amor. Certamente não saberei traduzir com palavras os meus sentimentos. Falar sobre vocês, descrevê-los, contar sobre suas ações, seus atos de bondade, de resignação, foge a minha parca literatura. Contudo, registro aqui o meu carinho, o meu amor. Ensínaram-me a ser verdadeiro, a ser gente, com princípios e valores de honestidade, alheios às contradições da vida. Talentosos desempenharam a bela e árdua missão de pais e amigos, não permitindo que as injustiças, reflexo desse desamor, vírus nocivo da sociedade moderna, se instalasse em nossos corações. Obrigado papai, obrigado mamãe, que Deus os abençoe. Amo vocês!!!

“Família é quem você escolhe para você, é quem você escolhe para viver. Não é preciso ter conta sanguínea, é necessário sempre um pouco mais de sintonia...” Aos meu irmãos, cunhados e sobrinhos: Deise, James, Juju, Fá, Rê, Gabis, Beto, Flávia, Helena e Léo, obrigado pelo carinho, amor, conversas, lições de vida. Sou eternamente grato em ter vocês de uma maneira tão especial na minha vida. Fica aqui a NOSSA vitória. Obrigado por acima de tudo serem seres humanos incríveis. Amo vocês!!!

A minha namorada Natália, que esteve ao meu lado em todos os momentos dessa jornada e que dividiu comigo risos, alegrias, choros, tristezas, descobertas, que provou ao longo do tempo ser a mulher mais incrível do mundo. Obrigado pelo seu apoio, dedicação, paciência e mostrado que a perseverança é de fundamental importância na busca de nossos ideais, por ter me amado nos momentos em que eu menos merecia mas que eu mais precisava. Você é “a CARA”!!!! Te amo sem medidas!!!

Aos irmãos da Rep. Ventania: Renato, Thales, Luciano e Vinícius. Foram muitos os momentos de alegrias, churrascos, conversas fiadas, cafés. Alguns se foram, outros permaneceram, mas o importante é que a amizade estava ali. Vocês provaram ser não apenas amigos, mas irmãos e compartilharam muitos momentos de suas vidas comigo. Cada um com sua particularidade me ensinou a ser mais humano. Obrigado!!! Já sinto saudades!!!

A amiga e irmã Michelle, que acreditou em mim até nas horas em que eu mesmo desacreditei. Muito obrigado pela força e incentivo em todas as horas. Você sabe da importância que tem em minha vida e tenho certeza de que está orgulhosa de mim. Valeu por tudo!!!

Ao amigo "Tidei" pela amizade e por acreditar no caráter das pessoas. Uma pessoa gente boníssima, honesta e verdadeira. Valeu por fazer parte da minha vida. "Tamo junto" sempre!!!

A Xupis, minha cachorra, pelos momentos de risos, carinhos, loucuras provando que o amor que a gente dispensa a um animal é devolvido por ele em forma de sincera gratidão.

Agradecimientos

"Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria." (Santo Agostinho).

Agradeço primeiramente a Deus, pela capacitação concedida, sem o qual seria inviável a realização deste estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, pela orientação, confiança, paciência, amizade, e principalmente pelas preciosas oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Andreimar Martins Soares por suas valiosas colaborações e parcerias com o Centro de Estudos de Animais Peçonhentos - CEVAP.

Ao Prof. Dr. Benedito Barraviera, pela orientação e eterna disposição em compartilhar suas experiências profissionais e de vida, as quais foram, e sempre serão de grande importância para as conquistas das minhas.

Ao Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta, pela sua disposição e dedicação ao estudo de toxinas animais e pelo auxílio em algumas etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Patrick Jack Spencer, por suas vindas ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos - CEVAP quando ainda engatinhávamos na montagem dos nossos laboratórios e pelo auxílio nas padronizações das técnicas utilizadas neste trabalho.

A Prof. Dra. Lucilene Delazarí dos Santos, por suas correções e críticas construtivas no Exame Geral de Qualificação que lapidaram a dissertação final de mestrado, meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante, por suas dicas, toques e correções no Exame Geral de qualificação, fica aqui meus agradecimentos.

*Ao Prof. Sávio Sant'Anna, do setor de Herpetologia do Instituto Butantan, pela doação de serpentes *Bothrops jararaca* para o prosseguimento deste trabalho.*

Ao "Bídias", funcionário do Departamento de Aquicultura da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP/ Botucatu pela concessão de anfíbios para alimentação das serpentes.

A todos os docentes do Departamento de Doenças Tropicais por contribuírem para minha formação na pós graduação.

A secretária do CEVAP, Marli Leão que entre seus inúmeros afazeres, sempre esteve disposta a ajudar com um sorriso no rosto.

A todos os funcionários do CEVAP pelo suporte na conclusão desta etapa.

A secretária do Departamento de Doenças Tropicais Solange Sako Cagliari, pela ajuda e carinho durante esses anos de convívio.

A Prof. Dr. Lidia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística do IB, pelo imenso auxílio nas atividades estatísticas.

A Dra. Daniela Fossato, pesquisadora e minha “co-orientadora”, pela amizade, confiança, e por tudo o que aprendi com você.

Aos pós graduandos do CEVAP, pela amizade ou pelo simples convívio ao longo desses anos.

Aos aprimorandos do CEVAP: Tiago, Roberta, Priscila e Natália pelo tempo e dedicação dispensado no auxílio dos meus experimentos.

A todos os estagiários que passaram ou ainda estão no CEVAP: Bruna, Camila, Renato, Augusto, Larissa, Pedro, Flávia, Milene, Jennifer, Vivian, Gustavo e Isabel, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A técnica do laboratório do CEVAP, Luciana Curtolo de Barros pelo apoio técnico e ajuda no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Centro de Estudos de Venenos de Animais Peçonhentos - CEVAP/UNESP.

Ao Biotério Central da UNESP, em nome do Técnico Rafael, pela disposição e doação de camundongos para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias: Profa. Dra. Sueli Calvi, Carlinhos, Daniela, Larissa, Karen, James, pela amizade e carinho.

Aos amigos de São Paulo: Flávia, Felipe, Caroline e Bel que sempre dividiram os momentos de alegrias na Rep. Ventania.

A todos que fizeram parte do desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos, sem o qual o desenvolvimento deste projeto seria inviável e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

'É preciso dançar sobre os abismos. É preciso superar o aqui e agora. Ser uma ponte e não um fim. É preciso conviver com incertezas. Desconfiar, desconfiar. Tudo é passível de questionamento. Os valores, os conceitos e preceitos, o equilíbrio e a loucura, os sentimentos mais dignos, a ciência, a história, a religião. Nada, absolutamente nada pode ser considerado definitivo. Concluir é atrofiar, estagnar, morrer...'

(Ivan Petrovitch)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivos gerais	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Material	9
3.1.1. Caracterização da área de estudo	9
3.1.2. Venenos	10
3.1.3. Serpentes	11
3.1.4. Aprovação pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Experimentação Animal	13
3.1.5. Camundongos	13
3.1.6. Plasma humano	13
3.2. Métodos	13
3.2.1. Delineamento experimental	13
3.3. Caracterização bioquímica dos venenos	18
3.3.1. Dosagem protéica	18
3.3.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	19
3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de fase reversa C ₈ (RP-HPLC)	21
3.4. Caracterização enzimática dos venenos	21
3.4.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano	21
3.4.2. Índice de coagulação	22
3.5. Caracterização farmacológica dos venenos	22
3.5.1. Atividade hemorrágica	22
3.5.2. Dose letal média (DL ₅₀)	24

3.5.3. Atividade edematogênica	24
3.6. Análise estatística dos resultados	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Caracterização da área de estudo	26
4.2. Caracterização bioquímica dos venenos	27
4.2.1. Dosagem protéica	27
4.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS_PAGE)	28
4.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de fase reversa C ₈ (RP-HPLC)	35
4.3. Caracterização enzimática dos venenos	38
4.3.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano	38
4.3.2. Índice de coagulação	39
4.4. Caracterização farmacológica dos venenos	39
4.4.1. Determinação da atividade hemorrágica	39
4.4.2. Determinação da atividade edematogênica	40
4.4.3. Dose letal média (DL ₅₀)	43
5. DISCUSSÃO	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
7. RESUMO	61
8. ABSTRACT	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
10. ANEXOS	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> macho do Grupo I, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip", Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo	15
Tabela 2. Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> macho do Grupo II, Registro no CEVAP(RG), número de "microchip", Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo	15
Tabela 3. Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> fêmea do Grupo III, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip", Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo	16
Tabela 4. Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> do Grupo IV, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip, Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo	16
Tabela 5. Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> do Grupo V, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip, Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo	17
Tabela 6. Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> do Grupo VI, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip, Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo	17
Tabela 7. Valor médio obtido para a Dosagem Protéica das amostras de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> dos grupos de estudo, segundo método de Bradford.....	27
Tabela 8. Valores médios obtidos da Atividade Coagulante, Índice de Coagulação, Atividade Hemorrágica, Atividade Edematogênica e Dose Letal Média (DL ₅₀) do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> dos grupos de estudo.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do município de Botucatu e localização dos municípios limítrofes	9
Figura 2 A-B. (A) Microtubos eppendorf® com veneno de serpente <i>Bothrops jararaca</i> total; (B) Divisão dos grupos em estantes para posterior congelamento em freezer - 20º	11
Figura 3. Serpentes individualizadas, mantidas em caixas de polipropileno com água “ <i>ad libitum</i> ”.	12
Figura 4 A-D. (A) Seringas para aplicação de transponders; (B) Transponders de bio-vidro cirúrgico medindo 11,2 mm de comprimento por 1,2 mm de diâmetro; (C) Aplicação do “microchip” dorso-lateral; (D) Leitor de “microchip” com o bastão	12
Figura 5. Curva padrão de albumina bovina (SIGMA-USA) utilizada para a realização da equação da reta	18
Figura 6 A-B. (A) Aplicação de veneno no plasma e posterior incubação em banho-maria a 37ºC; (B) Imediato aparecimento da rede de fibrina (coágulo)	22
Figura 7 A-F. (A) Local de inoculação do veneno; (B) Após o período de duas horas os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO ₂ ; (C) Pele rebatida para avaliação da atividade hemorrágica; (D) Mensuração do halo hemorrágico formado em mm ² ; (E) Controle; (F) Halo hemorrágico formado	23
Figura 8 A-D. (A) Camundongos divididos em 5 grupos; (B) Caixa com 10 camundongos por grupo; (C) Veneno de <i>Bothrops jararaca</i> em diferentes concentrações; (D) Inoculação via intraperitoneal	24
Figura 9 A-D. (A) Medidas do coxim plantar das patas dos camundongos antes da inoculação (T0); (B) Inoculação de veneno nas patas controle experimental; (C) Após 3 horas da inoculação pata experimental com edema; (D) Mensuração das patas em porcentagem de edema induzido.....	25
Figura 10. Dosagem protéica das amostras de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> ; GI – 07 machos adultos recém chegados da natureza; GII – 15 machos adultos mantidos em regime de cativeiro por mais de dois anos; GIII – 12 fêmeas adultas recém chegadas da natureza; GIV – 15 fêmeas adultas mantidas em regime de cativeiro por mais de dois anos; GV – 15 filhotes de ambos os sexos recém chegados da natureza; GVI – 15 filhotes de ambos os sexos mantidos em regime de cativeiro	28
Figura 11. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo I. (PM) Peso molecular, (VR) Veneno Referência, números respectivos de venenos obtidos de serpentes machos adultos, recém chegadas da natureza (Grupo I)	29
Figura 12. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo II. (PM) Peso molecular, (VR) Veneno Referência, números respectivos de venenos obtidos de serpentes machos adultos, mantidos em regime de cativeiro (Grupo II)	30

Figura 13. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo III. (PM) Peso molecular, (VR) Veneno Referência, números respectivos de venenos obtidos de serpentes fêmeas adultas, recém chegadas da natureza (Grupo III)	31
Figura 14. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo IV. (PM) Peso molecular, (VR) Veneno Referência, números respectivos de venenos obtidos de serpentes fêmeas adultas, mantidas em regime de cativeiro (Grupo IV)	33
Figura 15. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo V. (PM) Peso molecular, (VR) Veneno Referência, “pool” de venenos obtidos de serpentes de ambos os sexos com até 40 centímetros de comprimento, recém chegadas da natureza (Grupo V)	34
Figura 16. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo VI. (PM) Peso molecular, (VR) Veneno Referência, “pool” de venenos obtidos de serpentes de ambos os sexos com até 40 centímetros de comprimento, mantidas em regime de cativeiro (Grupo VI)	35
Figura 17 (A). RP-HPLC em coluna de fase reversa C ₈ (50,0 x 4,6 mm), em sistema Shimadzu Proeminence 20 A do “pool” de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> do Grupo II (machos adultos mantidos em regime de cativeiro há mais de dois anos); Fluxo de 1,2 mL/min, durante 25 minutos e absorvância a 214 nm.....	36
Figura 17 (B). RP-HPLC em coluna de fase reversa C ₈ (50,0 x 4,6 mm), em sistema Shimadzu Proeminence 20 A do “pool” de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> do Grupo IV (fêmeas adultas mantidos em regime de cativeiro há mais de dois anos); Fluxo de 1,2 mL/min, durante 25 minutos e absorvância a 214 nm.....	37
Figura 17 (C). RP-HPLC em coluna de fase reversa C ₈ (50,0 x 4,6 mm), em sistema Shimadzu Proeminence 20 A do “pool” de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> do Grupo VI (filhotes de ambos os sexos mantidos em regime de cativeiro; Fluxo de 1,2 mL/min, durante 25 minutos e absorvância a 214 nm.....	37

Figura 17 (D). RP-HPLC em coluna de fase reversa C₈ (50,0 x 4,6 mm), em sistema Shimadzu Proeminence 20 A do “pool” de veneno de *Bothrops jararaca* do Grupo Veneno Referência Nacional; Fluxo de 1,2 mL/min, durante 25 minutos e absorvância a 214 nm..... 38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 (A). Valores obtidos na Atividade Edematogênica para Grupo I. O edema é expresso em milímetros (mm) em função dos momentos de mensuração. Os momentos são T(0): início da inoculação; T(1): 30 minutos após a inoculação; T(2): 60 minutos após a inoculação; T(3): 90 minutos após a inoculação; T(4): 120 minutos após a inoculação.41

Gráfico 1 (B). Valores obtidos na Atividade Edematogênica para Grupo II. O edema é expresso em milímetros (mm) em função dos momentos de mensuração. Os momentos são T(0): início da inoculação; T(1): 30 minutos após a inoculação; T(2): 60 minutos após a inoculação; T(3): 90 minutos após a inoculação; T(4): 120 minutos após a inoculação;.....41

Gráfico 1 (C). Valores obtidos na Atividade Edematogênica para Grupo III. O edema é expresso em milímetros (mm) em função dos momentos de mensuração. Os momentos são T(0): início da inoculação; T(1): 30 minutos após a inoculação; T(2): 60 minutos após a inoculação; T(3): 90 minutos após a inoculação; T(4): 120 minutos após a inoculação.....41

Gráfico 1(D). Valores obtidos na Atividade Edematogênica para Grupo IV. O edema é expresso em milímetros (mm) em função dos momentos de mensuração. Os momentos são T(0): início da inoculação; T(1): 30 minutos após a inoculação; T(2): 60 minutos após a inoculação; T(3): 90 minutos após a inoculação; T(4): 120 minutos após a inoculação.....41

Gráfico 1 (E). Valores obtidos na Atividade Edematogênica para Grupo V. O edema é expresso em milímetros (mm) em função dos momentos de mensuração. Os momentos são T(0): início da inoculação; T(1): 30 minutos após a inoculação; T(2): 60 minutos após a inoculação; T(3): 90 minutos após a inoculação; T(4): 120 minutos após a inoculação.....42

Gráfico 1 (F). Valores obtidos na Atividade Edematogênica para Grupo VI. O edema é expresso em milímetros (mm) em função dos momentos de mensuração. Os momentos são T(0): início da inoculação; T(1): 30 minutos após a inoculação; T(2): 60 minutos após a inoculação; T(3): 90 minutos após a inoculação; T(4): 120 minutos após a inoculação.....42

Gráfico 1 (G). Valores obtidos na Atividade Edematogênica para Grupo VR. O edema é expresso em milímetros (mm) em função dos momentos de mensuração. Os momentos são T(0): início da inoculação; T(1): 30 minutos após a inoculação; T(2): 60 minutos após a inoculação; T(3): 90 minutos após a inoculação; T(4): 120 minutos após a inoculação.....42

1. Introdução

As serpentes sempre despertaram medo, fascínio e curiosidade entre os homens, fato esse comprovado pela influência que esses animais exercem na vida humana em vários aspectos, seja religioso, mitológico, lendário ou simbólico¹.

Pertencentes à Classe Reptilia, ordem Squamata as serpentes são animais vertebrados, de corpo cilíndrico coberto por escamas. Não apresentam membros, pálpebras móveis, nem ouvido externo².

No mundo existem aproximadamente 3.100 espécies de serpentes, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. As serpentes produtoras de veneno estão distribuídas em três famílias (Atractaspididae, Elapidae e Viperidae) sendo representadas por aproximadamente seiscentas espécies^{3,4,5,6}. No Brasil, existem 371 espécies, sendo 54 consideradas peçonhentas e 304 não-peçonhentas.

O gênero *Bothrops* (incluindo *Bothriopsis*⁷) pertence à família Viperidae e constitui um clado bastante diversificado com origem e radiação recente na região Neotropical, com espécies de serpentes distribuídas principalmente na América do Sul^{8,9}.

As serpentes do gênero *Bothrops*, possuem, na maioria das espécies, hábito alimentar generalista e se associamos à ausência de nichos ocupados por outros viperídeos durante a colonização da América do Sul, pode ter ocorrido uma influência na plasticidade de utilização do substrato e na evolução das diferentes características morfológicas das espécies que compõem esse gênero, contribuindo para uma elevada diversificação taxonômica e ecológica do grupo no continente^{8,10,11}.

A serpente *Bothrops jararaca* foi recentemente classificada como *Bothropoides jararaca*, segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia¹². No entanto, novos estudos taxonômicos estão sendo realizados para plena aceitação desta nova nomenclatura pela comunidade científica¹³.

A *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) é uma espécie delgada e de tamanho moderado, podendo atingir até 1,6m de comprimento total⁹. Possui padrão de coloração bastante variável e os indivíduos apresentam manchas escuras, em forma triangular, distribuídas em ambos os lados do corpo¹⁴, conferindo a espécie um padrão críptico de coloração^{15,16}.

As fêmeas apresentam um dimorfismo sexual notoriamente visível em relação aos machos, as quais apresentam maior robustez e tamanho, além de possuírem maior tamanho de cabeça¹⁶⁻¹⁹.

A distribuição das serpentes *Bothrops jararaca* ocorre verticalmente, desde o nível do mar até elevações próximas a 1.200m, ocupando uma elevada gama de habitats^{9,16}. Dentre os principais habitats estão os ambientes florestados, como a Mata Atlântica, florestas tropicais decíduas e remanescentes florestais, até áreas abertas com elevada perturbação antrópica e alta densidade humana²⁰.

Uma análise de dados do Ministério da Saúde revela que, nos últimos seis anos, o número de acidentes com animais peçonhentos cresceu 32,7%, em todo o Brasil. Em 2003, foram 68.219 notificações, contra 90.558, em 2009. No ano passado, os escorpiões lideraram o ranking, com 45.721 acidentes, seguido pelas serpentes, com 22.763. Dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas, verifica-se o predomínio do acidente botrópico, que corresponde a 73,5% dos casos de ofidismo notificados no país, seguidos do crotálico (7,5%), laquético (3,0%) e elapídico (0,7%), havendo pequenas variações de acordo com a região e distribuição geográfica das serpentes²¹.

Poucos casos são diagnosticados como acidentes por serpentes não peçonhentas (3%), provavelmente devido a não utilização de soro específico. Por outro lado, 11,8% dos acidentes ofídicos notificados em 2006 foram diagnosticados como acidente por serpente não identificada. Esta identificação nem sempre é possível, portanto, o diagnóstico é baseado em critérios clínicos e epidemiológicos²²⁻²⁸.

Os principais fatores responsáveis pelo elevado número de acidentes botrópicos registrados no Brasil englobam a plasticidade das serpentes no uso de ambientes, somados à coloração críptica e a elevada abundância relativa nas taxocenoses^{16,29}. Além disso, as *Bothrops jararaca* são mais ativas no período crepuscular e noturno^{17,29}, podendo apresentar alguma atividade diurna, que pode estar associada a sua termorregulação comportamental^{15,29}.

Por outro lado, venenos de serpentes são reconhecidos como importantes fontes de substâncias biologicamente ativas com ampla atividade farmacológica³⁰, sendo secretados e estocados na glândula de veneno, a qual é um aparato venenífero constituído por um epitélio extremamente especializado³¹.

Acredita-se que o aparato venenífero representa uma modificação das glândulas salivares e é um fator crucial na radiação adaptativa e conseqüente sucesso ecológico das serpentes. É estimado que o aparato venenífero tenha surgido há cerca de 200 milhões de anos, na evolução dos Squamata, tornando-se o principal fator norteador da diversidade ecológica em lagartos e serpentes^{32,33,34}.

A família Viperidae abriga espécies que possuem alto grau de especialização no aparato venenífero. Estes aparatos são caracterizados pela presença de complexos sistemas de produção e armazenamento de veneno, bem como por modificações morfológicas importantes, que incluem: musculatura cefálica bem desenvolvida, sobretudo, próximo às glândulas de veneno, além de presas móveis e caniculadas, cobertos por bainha e dispostos na parte anterior do maxilar móvel, permitindo a ereção das presas para frente no momento do bote^{35,36,37}.

Os venenos de serpentes estão dentre os mais complexos produtos conhecidos, contendo 20 ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do seu peso seco é constituído por proteínas, mas também com uma grande variedade de enzimas (fosfolipases A₂, metaloproteinases, serinoproteinases, L-aminoácido oxidases, entre outros), e uma parte não protéica (composta por carboidratos, lipídeos, metais, aminoácidos livres, nucleotídeos, entre outros)³⁸. Dentre os componentes mais expressivos

presentes nos venenos das serpentes da família Viperidae, estão as metaloprotinases (divididas em quatro classes), serinoproteinases, desintegrinas, fosfolipases A₂ (PLA₂) e lectinas tipo C³⁹.

Embora os venenos de serpentes contenham inúmeras proteínas bioativas, as fosfolipases A₂ constituem a maioria dos componentes tóxicos. As fosfolipases A₂ estão distribuídas amplamente na natureza e apresentam um importante interesse médico-científico já que está associada a várias doenças inflamatórias humanas e em envenenamentos por venenos de serpentes e de abelhas^{40,41,42}.

A variabilidade dos venenos destas serpentes, intra e inter espécies, já tem sido amplamente estudada. Foi demonstrado em função da distribuição geográfica da serpente, variações intraespecíficas na composição de alguns venenos.⁴³ Estas variações, farmacológicas e bioquímicas, foram observadas em diferentes níveis, a saber: ontogenético³²⁻³⁵, sexual³⁶⁻³⁹, geográfico^{43,44}, inter e intra-específico^{36-39,43-45}, podendo também ser influenciadas pelo tempo decorrido entre uma extração de veneno e a anterior⁴⁶.

A composição química dos venenos de serpentes é muito complexa, e as lesões que são produzidas por suas toxinas dependem da natureza desses elementos além da interação biológica de cada um deles⁴⁷.

As alterações ontogenéticas nos venenos de serpentes estão presentes na maioria das pesquisas que versam sobre a variabilidade, e seu entendimento é de suma importância por contribuir para a compreensão da diversidade e complexidade dos venenos, constituindo ferramentas importantes para estudos sobre a biologia das espécies pesquisadas.

Pela análise do perfil eletroforético do veneno de exemplares jovens e adultos de *Notechis scutatus*, Tan *et al.*⁴⁸ demonstraram diferenças na migração das proteínas. Entretanto, observaram similaridade nas atividades bioquímicas, atribuindo-as à dieta generalista da espécie, tanto em exemplares adultos, quanto jovens. Mudanças em algumas atividades do veneno de *Lachesis muta stenphrys* foram relatadas, sendo atribuídas ao tipo de dieta da

serpente. Além disso, o veneno de animais adultos se mostrou mais proteolítico e mais letal que o veneno de animais juvenis⁴⁹.

As variações sazonais e suas implicações na composição do veneno de serpentes são pouco estudadas. Em pesquisa com veneno de *Vipera ammoytes*, coletado em diferentes períodos das estações do ano, foi observado diferenças nos perfis de mobilidade eletroforética para as diferentes proteínas⁵⁰.

A variação geográfica é um fator que leva a diferenças intraespecíficas entre populações espacialmente segregadas⁵¹. Esse fenômeno é notório em espécies que apresentam populações amplamente distribuídas e sujeitas a diferentes grupos de pressões seletivas em suas áreas de distribuição^{51,52}.

Foi analisada a variabilidade geográfica do veneno de *Crotalus atrox* de diversas localidades do Sudoeste norte-americano, sendo notificada a presença da toxina Mojave (uma fosfolipase A₂ neurotóxica) em *Crotalus atrox* e *Crotalus scutulatus scutulatus*, as quais vivem em simpatria⁵³. Neste trabalho, os autores apontam que a espécie *C. s. scutulatus* apresenta a toxina Mojave como um dos componentes majoritários do veneno e formularam duas hipóteses possíveis de explicação: (1) a toxina Mojave poderia ter sido comum ao ancestral destas duas espécies de cascavéis norte-americanas e, em virtude da pressão seletiva, a toxina se manteve em *C. s. scutulatus* e desapareceu em *C. atrox*; (2) pode ter ocorrido *inter-breeding* (troca genética) entre as duas espécies em áreas onde ocorre simpatria⁵³.

As mesmas hipóteses foram colocadas por Rael *et al.*⁵⁴ que demonstraram a variabilidade geográfica no veneno de espécimes de *Crotalus scutulatus scutulatus*. Foi observada a presença de três “tipos” de venenos possíveis para esta espécie: o veneno A, caracterizado pela presença da toxina Mojave (fosfolipase A₂ neurotóxica), desprovido de atividade hemorrágica; o veneno B, caracterizado pela ausência da toxina Mojave, mas apresentando atividade hemorrágica e o veneno A+B, que possui tanto a toxina Mojave, quanto atividade hemorrágica.

Neste contexto, Furtado *et al.*⁵⁵ determinaram as atividades coagulante, necrosante, edematogênica, hemorrágica e proteolítica dos venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*, e demonstraram a variabilidade existente entre estas espécies.

Em estudos sobre a variação ontogenética na proteômica do veneno de *Bothrops jararaca*, Zelanis *et al.*⁵⁶, demonstraram que os venenos de adultas e filhotes possuem atividades hemorrágicas similares, porém o veneno de adultos é mais letal em camundongos. Já a atividade coagulante de filhotes de *Bothrops jararaca* é dez vezes mais potente comparadas às serpentes adultas.

O conhecimento e a compreensão das diferenças que ocorrem na composição dos venenos são extremamente importantes, devido à relevância na terapêutica dos envenenamentos ofídicos.

Segundo Warrel⁵⁷ é importante conhecer a variabilidade dos venenos para correlacionar com a terapêutica dos envenenamentos, uma vez que há diferenças nos quadros clínicos de pacientes picados por serpentes de diferentes idades. Diferenças no tempo de coagulação sanguínea em pacientes acidentados por indivíduos de *Bothrops jararaca*, adultos e filhotes, foram relatadas^{58,59}.

Além disso, o conhecimento da variação dos venenos é de fundamental importância na confecção de antivenenos mais específicos e de maior eficácia nos tratamentos de envenenamentos ofídicos em humanos⁶⁰.

As pesquisas atuais envolvendo venenos de serpentes constituem na busca do melhor entendimento dos aspectos clínicos do envenenamento humano e dos mecanismos de ação dos venenos e de suas toxinas isoladas, na prospecção de toxinas com papel terapêutico.

Desta forma, estudos que direcionem para uma melhor compreensão da variabilidade na composição e nas atividades dos venenos de serpentes, se mostram de grande relevância científica e médica, auxiliando de maneira eficaz no tratamento de vitimados por serpentes peçonhentas, uma vez que a

descoberta das variações ontogenéticas, sexuais e ambientais implicam na elucidação de diferenças na composição química e biológica do veneno.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi de comparar o veneno de serpentes *Bothrops jararaca* machos, fêmeas e filhotes, da micro-região de Botucatu, São Paulo, recém chegadas da natureza com as de regime de cativeiro, por meio da sua caracterização bioquímica, enzimática e farmacológica, observadas às variações ambientais, sexuais e ontogenéticas.

2.2. Objetivo específico

- Comparar as atividades bioquímicas dos venenos de *Bothrops jararaca*, por meio de dosagem protéica, eletroforese SDS-PAGE e HPLC-RP;
- Comparar as atividades enzimáticas dos venenos de *Bothrops jararaca*, por meio do ensaio de Atividade coagulante e Índice de coagulação;
- Comparar as atividades farmacológicas dos venenos de *Bothrops jararaca*, por meio do ensaio da Atividade edematogênica, DL₅₀ e atividade hemorrágica;
- Comparar as atividades propostas dos venenos estudados com o Veneno Referência Nacional.

3. Material e métodos

3.1. Material

3.1.1. Caracterização da área de estudo

O estudo foi desenvolvido na micro-região de Botucatu, São Paulo, Brasil - que está localizada na região Centro-Oeste do Estado. Segundo definição da Constituição Brasileira de 1988⁶¹, a micro-região é constituída de um agrupamento de municípios limítrofes. Assim, a micro-região de Botucatu compreende os municípios de Itatinga, Pardinho, Bofete, Anhembi, Santa Maria da Serra, Dois Córregos, São Manuel, Pratânia e Avaré, além de Botucatu (Figura 1).

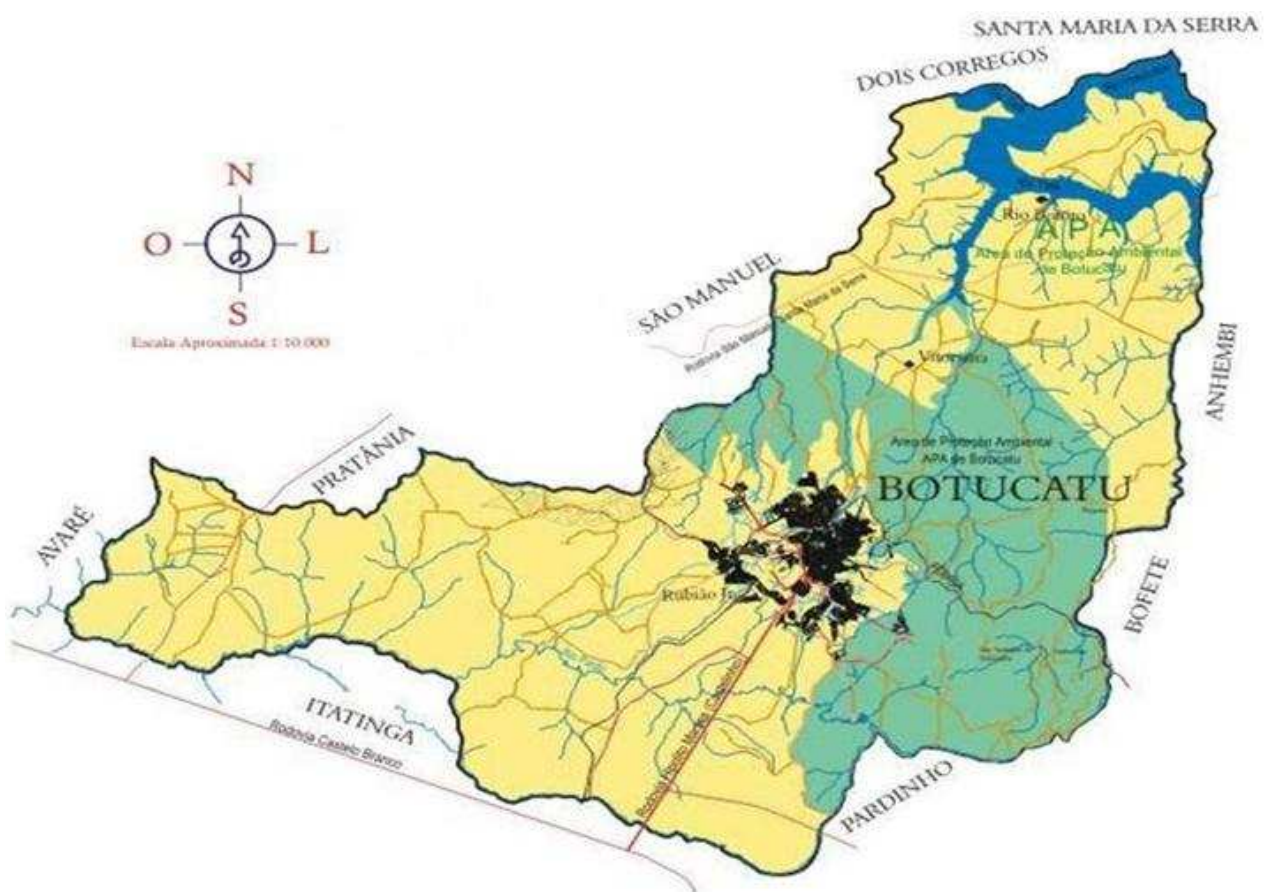


Figura 1. Mapa do município de Botucatu e localização dos municípios limítrofes⁶².

3.1.2. Venenos

Os venenos foram obtidos de serpentes da espécie *Bothrops jararaca*, oriundos da área de abrangência do estudo, além das espécies mantidas no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP – UNESP, localizado na Fazenda Experimental Lageado, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Para obtenção das amostras dos venenos, as serpentes foram anestesiadas com o auxílio de gás carbônico (CO₂), segundo Biasi *et al.*⁶³ com adaptações da Equipe Técnica do CEVAP.

Os venenos individuais de *Bothrops jararaca* foram coletados em microtubos estéreis do tipo eppendorf® e após cada extração foram liofilizados, aliquotados e acondicionados à temperatura de -20°C, até o momento da utilização (Figura 2 A-B). Foram efetuadas extrações individuais durante cinco meses, com intervalos de 45 dias entre cada, perfazendo um total de 18 extrações, sendo três para cada serpente. Para a extração de filhotes, contou-se com o auxílio de tubo capilar (Perfecta), sem heparina.

Como parâmetro de comparação para as atividades avaliadas, foi utilizado o Veneno Referência Nacional, preparado a partir de extrações individuais de 2.000 espécimes de serpentes, que foi gentilmente cedido pelo Dr. Daniel Carvalho Pimenta do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan.

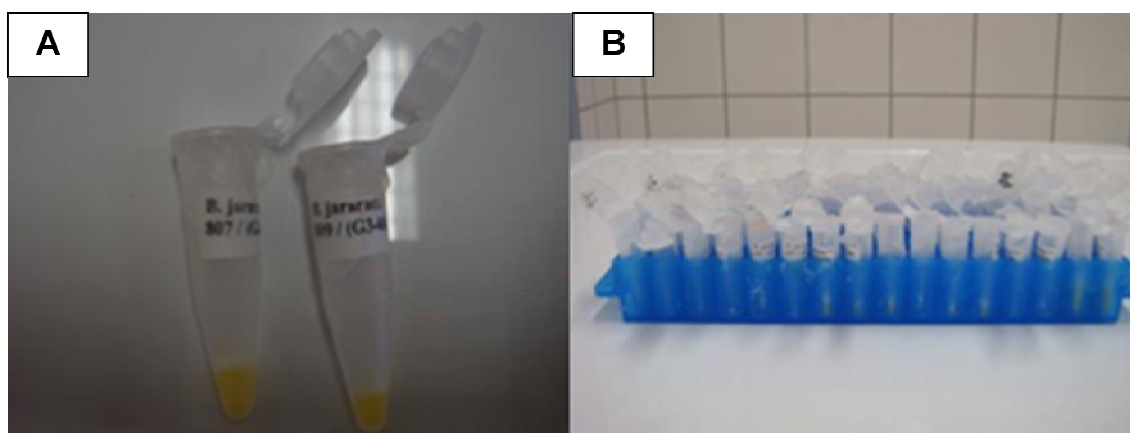


Figura 2 A-B. (A) Microtubos eppendorf® com veneno de serpente *Bothrops jararaca* total; (B) Divisão dos grupos em estantes para posterior congelamento em freezer a - 20°C.

3.1.3. Serpentes

As serpentes foram individualizadas e mantidas em caixas de polipropileno, com água “*ad libitum*” (Figura 3). A temperatura e a umidade foram controladas e o fotoperíodo foi de oito horas de claro e 16 horas de escuro. A alimentação foi realizada com camundongos, répteis e anfíbios, de acordo com o perfil de cada grupo de estudo em intervalos de 45 dias após cada extração.

As serpentes mantidas em regime de cativeiro foram microchipadas para sua identificação com “microchips” ou transponders, que são micro-circuitos eletrônicos constituídos de um código ou número inalterável, sendo revestido por um bio-vidro cirúrgico, medindo 11,2 mm de comprimento por 1,2 mm de diâmetro. Foi utilizado um aplicador que se assemelha a uma seringa de injeção para a implantação dos “microchips”. (Figuras 4. A-D).



Figura 3: Serpentes individualizadas, mantidas em caixas de polipropileno com água “*ad libitum*”.

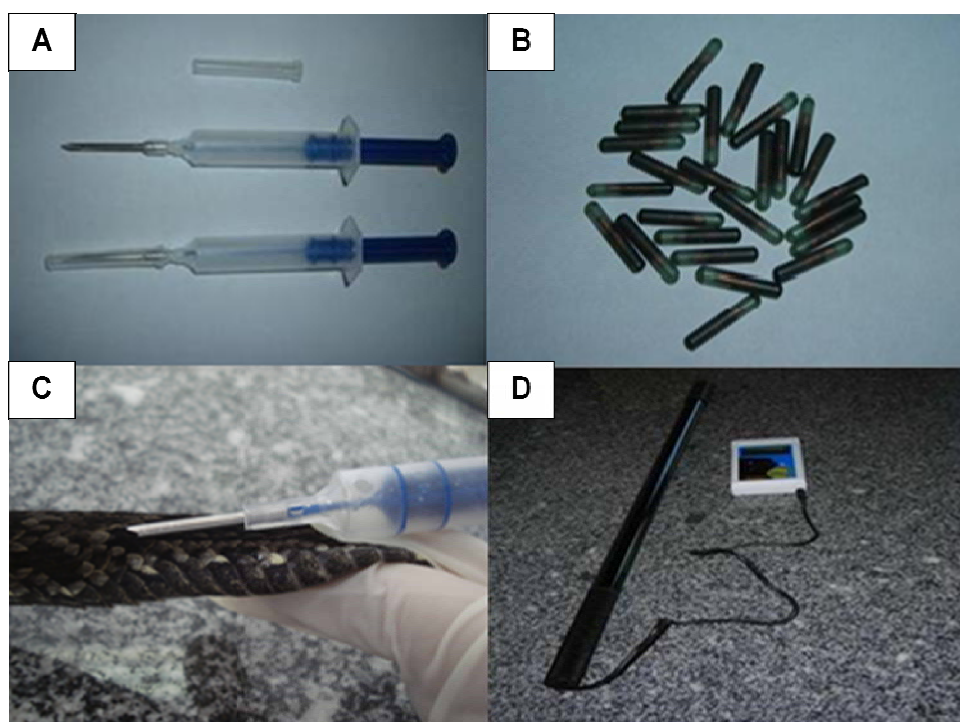


Figura 4. A-D (A) Seringas para aplicação de transponders; (B) Transponders de bio-vidro cirúrgico medindo 11,2 mm de comprimento por 1,2 mm de diâmetro; (C) Aplicação do “microchip” dorso-lateral; (D) Leitor de “microchip” com o bastão.

3.1.4. Aprovação pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Experimentação Animal

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em 26 de março de 2009, sob o número de protocolo 723 (Anexo 1) para a validação dos bioensaios.

3.1.5. Camundongos

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss de ambos os sexos, pesando entre 18 e 22 gramas, provenientes do Biotério Central da UNESP de Botucatu, Campus de Rubião Jr. Os animais foram mantidos no Biotério do CEVAP, em caixas plásticas forradas com maravalha de pinho, com ração e água “*ad libitum*” e período de luz de 12 horas. A manipulação dos animais, antes e durante os ensaios, seguiu os princípios de ética de experimentação animal (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

3.1.6. Plasma humano

O plasma humano utilizado nos testes de atividade coagulante dos venenos foi gentilmente cedido pelo Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, Departamento de Banco de Sangue.

3.2. Métodos

3.2.1. Delineamento experimental

No presente estudo foram comparados os venenos das serpentes de até 180 dias, recém chegadas da natureza, mantidas em regime de quarentena, com aquelas mantidas em regime de cativeiro há mais de dois anos. Além disso, esses venenos foram comparados com o Veneno Referência Nacional, gentilmente cedido pelo Instituto Butantan, SP.

Os grupos de estudo compreenderam serpentes machos e fêmeas, adultas e filhotes, sendo considerados filhotes as serpentes com até 40 centímetros de comprimento, segundo metodologia de Ribeiro *et al.*⁶⁴.

As serpentes foram divididas em seis grupos, a saber:

Grupo I: 7 machos adultos recém chegados da natureza (mantidos em regime de quarentena);

Grupo II: 15 machos adultos (mantidos há mais de dois anos de cativeiro);

Grupo III: 11 fêmeas adultas recém chegadas da natureza (mantidas em regime de quarentena);

Grupo IV: 15 fêmeas adultas (mantidos há mais de dois anos de cativeiro);

Grupo V: 7 filhotes de ambos os sexos recém chegados da natureza (mantidos em regime de quarentena);

Grupo VI: 15 filhotes de ambos os sexos (nascidos no serpentário do CEVAP).

As amostras de veneno foram referidas ao longo do trabalho como: Grupo I – machos de natureza, Grupo II – machos cativos, Grupo III – fêmeas de natureza, Grupo IV – fêmeas cativas, Grupo V – filhotes de natureza de ambos os sexos, Grupo VI – filhotes cativos de ambos os sexos.

Ressalta-se que os dois grupos de filhotes (V e VI) foram alimentados exclusivamente de pequenos répteis e anfíbios (lagartixas e girinos) para avaliação do perfil do veneno durante a ontogênese e posterior comparação aos demais grupos de estudo. As Tabelas 1 a 6 descrevem as serpentes incluídas no estudo evidenciando o número do “microchip”, número de registro de entrada no Serpentário do CEVAP, local de procedência e biometria.

Todas as serpentes recém chegadas da natureza e mantidas em regime de quarentena não possuíam microchip (Θ), sendo apenas incluídas no Registro do CEVAP (RG).

Tabela 1. Serpentes *Bothrops jararaca* macho do Grupo I, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip", Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo.

<i>Bothrops jararaca</i>						
Serpentes	RG	Microchip	CRC (cm)	CC (cm)	Peso (g)	Procedência
01	1397	Θ	87	11,5	95	Botucatu
02	1458	Θ	50	6	40	Pardinho
03	1670	Θ	92	14	120	Botucatu
04	1695	Θ	72	8,5	30	Botucatu
05	1707	Θ	75	10	60	Botucatu
06	1708	Θ	78	11,5	70	Botucatu
07	1709	Θ	80,5	10,5	90	Botucatu

Tabela 2. Serpentes *Bothrops jararaca* macho do Grupo II, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip", Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo.

<i>Bothrops jararaca</i>						
Serpentes	RG	Microchip	CRC (cm)	CC (cm)	Peso (g)	Procedência
01	285	307255	63	7	50	Itatinga
02	1352	365497	89	11	100	Botucatu
03	807	332917	80	12	95	Itatinga
04	675	305893	81,5	11	60	Bofete
05	1354	366895	87	9,5	70	Botucatu
06	541	363261	75	12	70	Botucatu
07	809	346211	75	10	60	Itatinga
08	219	303115	85	11	95	Itatinga
09	192	327790	100	14	150	Botucatu
10	564	308050	56	8	35	Botucatu
11	964	312315	56,5	7,5	35	Itatinga
12	1422	329102	82	10	73	Botucatu
13	1159	339756	82	11,5	100	Botucatu
14	1360	306161	87	11	100	Botucatu
15	440	326113	76	11	50	Bofete

Tabela 3. Serpentes *Bothrops jararaca* fêmea do Grupo III, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip", Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo.

<i>Bothrops jararaca</i>						
Serpentes	RG	Microchip	CRC (cm)	CC (cm)	Peso (g)	Procedência
01	1374	Θ	87	12	90	Botucatu
02	1423	Θ	135	17	370	Botucatu
03	1525	Θ	84	10,5	100	Pardinho
04	1639	Θ	125	8	300	Itatinga
05	1653	Θ	78	10	100	Botucatu
06	1655	Θ	90	11	200	Itatinga
07	1696	Θ	82	5	90	Botucatu
08	1697	Θ	123	17,5	510	Botucatu
09	1698	Θ	102	12,5	300	Botucatu
10	1771	Θ	53	7,5	60	Bofete
11	1775	Θ	121	15	525	Botucatu

Tabela 4. Serpentes *Bothrops jararaca* do Grupo IV, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip, Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo.

<i>Bothrops jararaca</i>						
Serpentes	RG	Microchip	CRC (cm)	CC (cm)	Peso (g)	Procedência
01	210	345696	113	16	360	Botucatu
02	1395	307597	134	17	640	Itatinga
03	1364	346464	81	12	60	Bofete
04	861	331096	76	9,5	80	Avaré
05	603	340335	79	10,5	60	Botucatu
06	1353	363908	89	11	120	Anhembi
07	1282	324056	51,5	4,5	30	Botucatu
08	535	339162	111	13	250	Anhembi
09	233	332143	83	10,5	100	Itatinga
10	295	346003	102	11	210	Bofete
11	756	313201	108	9,5	400	Itatinga
12	860	313471	84	10,5	130	Avaré
13	1396	328512	97	12	230	Botucatu
14	1424	371589	125	14	500	Botucatu
15	1438	348878	67	8	50	Avaré

Tabela 5. Serpentes *Bothrops jararaca* do Grupo V, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip, Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo.

<i>Bothrops jararaca</i>						
Serpentes	RG	Microchip	CRC (cm)	CC (cm)	Peso (g)	Procedência
01	F - 01	Θ	30	5	20	Botucatu
02	F - 02	Θ	35	4,5	28	Botucatu
03	F - 03	Θ	33	4,5	25	Botucatu
04	F - 04	Θ	25	3	20	Botucatu
05	F - 05	Θ	37	5	30	Botucatu
06	F - 06	Θ	28	3	25	Anhembi
07	F - 07	Θ	30	4,5	25	Itatinga

Tabela 6. Serpentes *Bothrops jararaca* do Grupo VI, Registro no CEVAP (RG), número de "microchip, Comprimento-rostro-cloacal - CRC (cm), Comprimento de cauda – CC (cm), Peso (g) e local de procedência dentro da área de estudo.

<i>Bothrops jararaca</i>						
Serpentes	RG	Microchip	CRC (cm)	CC (cm)	Peso (g)	Procedência
01	F - 01	Θ	31	5	20	Botucatu
02	F - 02	Θ	39	4,5	28	Botucatu
03	F - 03	Θ	32	4,5	25	Botucatu
04	F - 04	Θ	27	3	20	Botucatu
05	F - 05	Θ	37	5	30	Botucatu
06	F - 06	Θ	28	3	25	Anhembi
07	F - 07	Θ	30	4,5	25	Itatinga
08	F - 08	Θ	35	5	30	Itatinga
09	F - 09	Θ	34	4,5	22	Bofete
10	F - 10	Θ	29	3,5	25	Bofete
11	F - 11	Θ	30	3,5	20	Itatinga
12	F - 12	Θ	25	3	25	Avaré
13	F - 13	Θ	28	3,5	25	Botucatu
14	F - 14	Θ	36	4,5	30	Botucatu
15	F - 15	Θ	30	4	28	Avaré

3.3. Caracterização bioquímica dos venenos

3.3.1. Dosagem protéica

O teor protéico dos venenos foi avaliado segundo o método descrito por Bradford⁶⁵. Inicialmente foi determinada em duplicata a curva padrão de albumina bovina (SIGMA-USA) e a correspondência entre os valores obtidos nas diferentes concentrações dentro do intervalo de 0,0625 a 1000 mg/mL (razão 1:2), de acordo com a Figura 5.

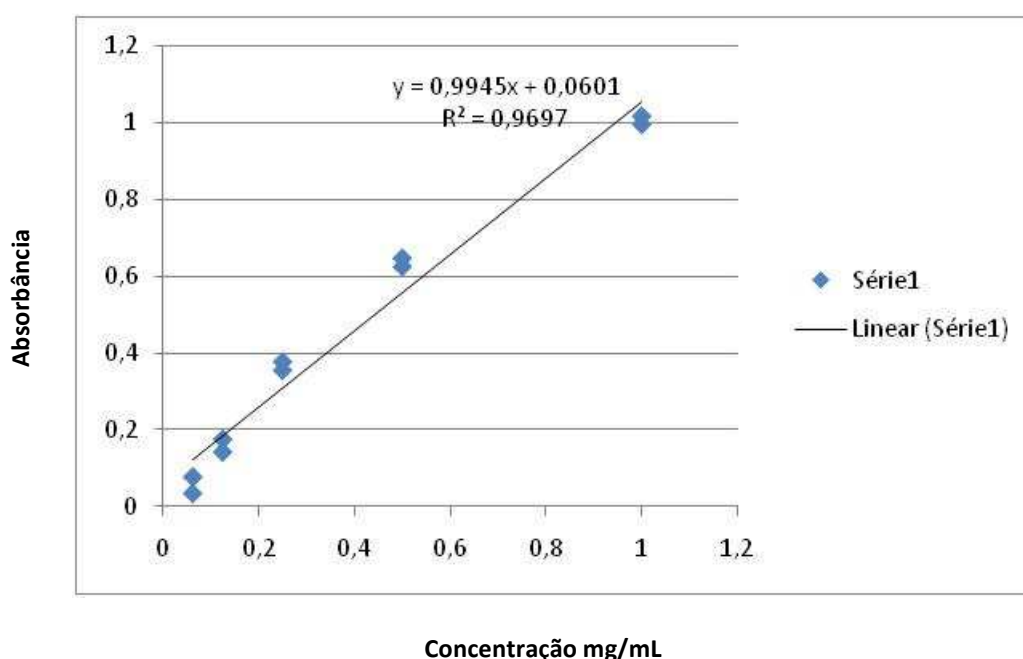


Figura 5. Curva padrão de albumina bovina (SIGMA-USA) utilizada para a realização da equação da reta.

As amostras foram preparadas utilizando-se 100 µL de uma solução de 1mg/mL de veneno, com 3,0 mL do reagente de Bradford. Para o branco, utilizado como controle, empregou-se 100 µL de solução fisiológica a 0,95% (m/v), adicionado a 3,0 mL de reagente. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm (SP-220, Bioespectro).

3.3.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Foi utilizado o método descrito por Laemmli⁶⁶. Foram utilizadas amostras individuais de veneno, segundo os grupos de estudo. Os géis foram preparados nas concentrações de 13% (m/v) para o gel de separação e 4% (m/v) para o gel de concentração ou empilhamento, em um sistema desnaturante e não reduzido.

Para o gel de separação 13% (m/v) foram utilizadas as seguintes soluções:

- Tampão de separação Tris-HCl (1,5 mol/L), pH 8,8;
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 10% (m/v) (Sigma Chem. Co.);
- Água destilada;
- Acrilamida – Bis 30,0: 0,8 (m/v) (Sigma Chem. Co.);
- Persulfato de amônio a 10% (m/v) (Sigma Chem. Co.);
- Temed (N'N'N'N' – tetrametilenodiamino) (Sigma Chem. Co.).

Para o gel de concentração ou empilhamento 4% (m/v) foram utilizadas as soluções:

- Tampão de empilhamento Tris-HCl (1 mol/L), pH 6,8;;
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 10% (m/v) (Sigma Chem. Co.);
- Água destilada;
- Acrilamida – Bis 30,0: 0,8 (m/v) (Sigma Chem. Co.);
- Persulfato de amônio a 10% (m/v) (Sigma Chem. Co.);
- Temed (N'N'N'N' – tetrametilenodiamino) (Sigma Chem. Co.).

Duas soluções contendo Tris-base, glicina e SDS 10% (m/v), pH 8,6 foram utilizadas como tampão de corrida para o cátodo e o ânodo respectivamente.

Para as amostras de eletroforese foi utilizado 80µL de uma solução-mãe contendo 1 mg/mL do veneno total de *Bothrops jararaca* diluído em 20µL do tampão da amostra (80 µL cada amostra), constituído de:

- β – mercaptoetanol (Sigma Chem. Co.);
- SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10% (m/v) (Sigma Chem. Co.);
- Tampão de empilhamento Tris-HCl (1 mol/mL), pH 6,8;
- Glicerol (2,5 v/v);
- Azul de bromofenol (Sigma Chem. Co.);
- Água destilada.

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

O sistema foi desligado quando ocorreu a migração das proteínas e o gel foi transferido para um recipiente contendo solução corante, cuja composição é Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma Chem. Co.), metanol, água destilada, e ácido acético. O gel foi corado por aproximadamente 40 minutos e posteriormente, descorado em uma solução contendo ácido acético, etanol comercial e água destilada, por aproximadamente 40 minutos. A solução foi trocada periodicamente até a visualização das bandas protéicas.

O padrão de comparação de massa molecular das bandas protéicas foi elaborado utilizando o marcador Kaleidoscope (Bio-Rad Co.).

Foi utilizado o fotodocumentador Hp scanjet automatic document feeder para digitalização dos géis. Para uma melhor visualização das imagens do gel utilizou-se o software Microsoft Office Picture Manager[®] para ajustes finos de brilho e contraste.

3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de fase reversa C₈ (RP-HPLC)

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

3.4. Caracterização enzimática dos venenos

3.4.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano

A atividade coagulante foi realizada utilizando-se 200 µL de plasma humano citratado, incubados em 100 µL do veneno, na concentração de 1 mg/mL. Posteriormente, essa mistura foi incubada em banho-maria a 37°C, sendo cronometrado o tempo em segundos a partir do imediato aparecimento da rede de fibrina. O teste foi realizado em triplicata para cada amostra e a média de tempo dos valores obtidos foi considerada. (Figura 6 A-B). Salienta-se que este teste é tido como padrão ouro de excelência para análise da atividade coagulante.

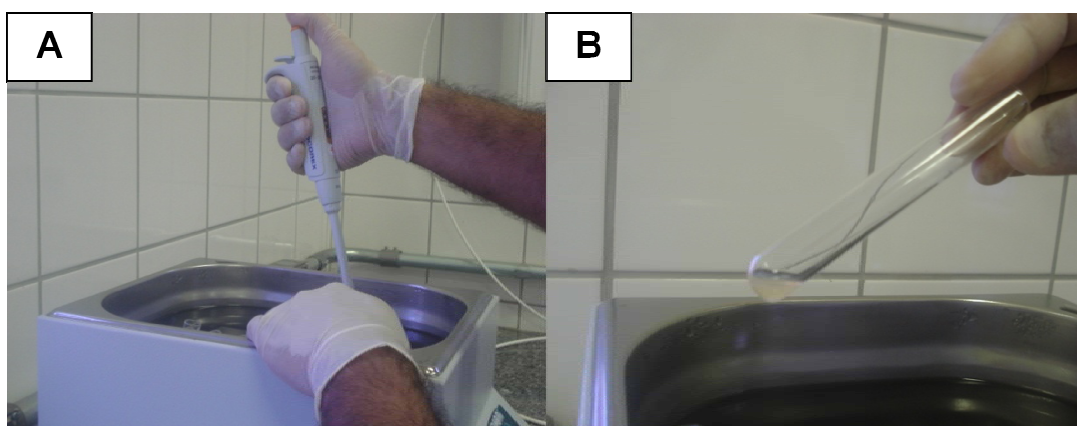


Figura 6 A-B. (A) Aplicação de veneno no plasma e posterior incubação em banho-maria a 37°C; (B) Imediato aparecimento da rede de fibrina (coágulo).

3.4.2. Índice de coagulação

Para a comparação das atividades coagulantes de cada amostra de veneno foi calculado o Índice Coagulante (I.C.) que é expresso em porcentagem segundo a fórmula:

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

Onde, I.C = índice de coagulação e T.C = tempo de coagulação.

3.5. Caracterização farmacológica dos venenos

3.5.1. Atividade hemorrágica

Para a determinação da atividade hemorrágica dos “pools” dos respectivos grupos de estudo do veneno de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência Nacional, foi utilizado o método de Kondo *et al.*⁶⁷ adaptado por Gutiérrez *et al.*³⁹ Foram utilizados cinco grupos, com quatro camundongos cada, da linhagem Swiss, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 22 g, inoculados por via intradérmica, com 10 µg de veneno, em 100 µL de solução

salina 0,9% (m/v) na região dorsal. Como controle negativo foi aplicado 100 μ L de solução salina 0,9% (m/v) nos camundongos, seguindo o mesmo protocolo experimental.

Os animais foram observados pelo período de duas horas e, em seguida, foram eutanasiados em câmara de CO₂, sendo sua pele rebatida para a mensuração em mm² dos halos hemorrágicos formados na face interna. (Figura 7 A-F).

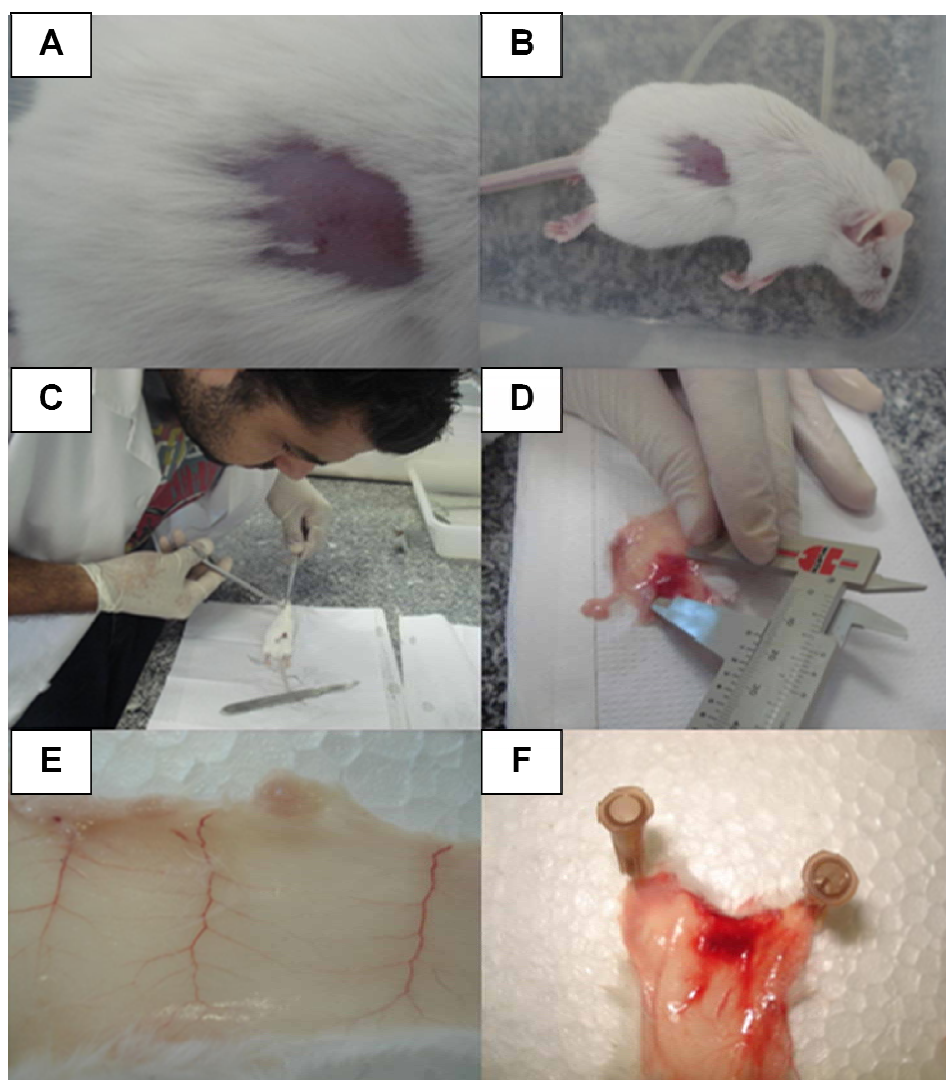


Figura 7 A-F. (A) Local de inoculação do veneno; (B) Após o período de duas horas os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂; (C) Pele rebatida para avaliação da atividade hemorrágica; (D) Mensuração do halo hemorrágico formado em mm²; (E) Controle; (F) Halo hemorrágico formado.

3.5.2. Dose letal média (DL₅₀)

Para a definição da dose letal média, foram utilizados 50 camundongos Swiss, pesando entre 18 e 22 g divididos em cinco grupos, sendo 10 animais em cada grupo. A inoculação foi realizada por via intraperitoneal com 0,5 mL de solução de veneno em diferentes concentrações, diluídas em solução salina 0,85% (m/v). Para avaliar esta toxicidade, foram feitos “pools” de venenos em cada grupo de estudo. O número de animais mortos e as respectivas doses foram avaliados por um período de 48 horas. A DL₅₀ foi calculada segundo o método de Probit⁶⁸ (Figura 8 A-D).



Figura 8. A-D. (A) Camundongos divididos em 5 grupos; (B) Caixa com 10 camundongos por grupo; (C) Veneno de *Bothrops jararaca* em diferentes concentrações; (D) Inoculação via intraperitoneal.

3.5.3. Atividade edematogênica

Para a determinação da atividade edematogênica foi utilizado o método de Yamakawa *et al.*⁶⁹, com algumas adaptações de Furtado *et al.*⁵⁵. Grupos de 6 camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 18 e 22g, foram inoculados com 50 µl no coxim plantar das patas traseiras. Na pata direita,

“experimental”, foi inoculado o veneno, e na pata esquerda, “controle”, solução salina estéril 0,85% (m/v). A espessura dos coxins foi mensurada utilizando-se um paquímetro universal Digimess 1/128 in, com intervalo de 0,02 mm, nos tempos T(0) antes da inoculação, T(1)30 min, T(2)60 min, T(3)120 min, T(4)180 min após a inoculação.

O edema foi expresso pela diferença entre os aumentos de espessura entre as patas “experimentais” e “controle”, dividida pela medida da pata controle e multiplicada por 100. (Figura 9 A-D).

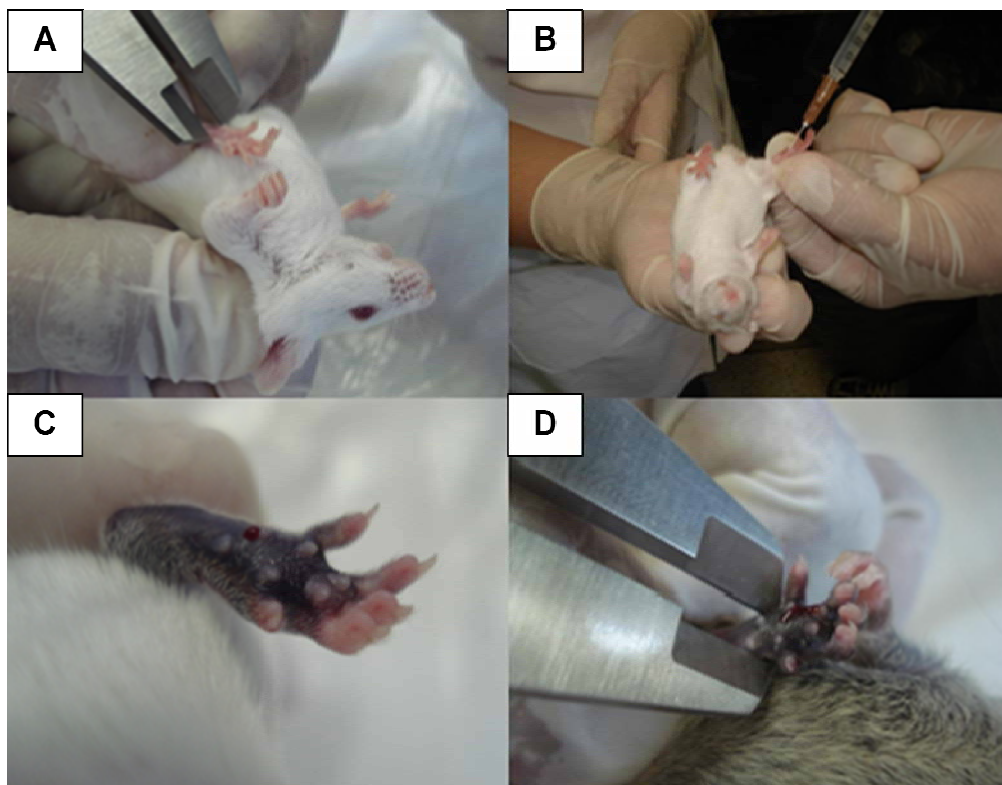


Figura 9 A-D. (A) Medidas do coxim plantar das patas dos camundongos antes da inoculação (T0); (B) Inoculação de veneno nas patas controle experimental; (C) Após 3 horas da inoculação pata experimental com edema; (D) Mensuração das patas em porcentagem de edema induzido.

3.6. Análise estatística dos resultados

Para a comparação dos resultados foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) com teste “a posteriori” de Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Caracterização da área de estudo

A cidade de Botucatu está localizada a 22°53'09" de latitude sul, 48°26'42" de longitude oeste, tendo como município limítrofe na região norte, o município de Santa Maria da Serra, localizada a uma altitude de 22°34'02" sul e longitude 48°09'38"; a leste está localizado o município de Anhembi à altitude de 22°47'21" e longitude de 48°07'22"; o município de Pardinho está localizado ao sul a uma latitude de 23°04'52" sul e longitude de 48°22'25" oeste; por fim o município de Avaré está situado ao oeste, estando localizado à altitude de 23°05'56" sul e longitude de 48°55'33". O marco zero está localizado na Praça Emílio Pedutti (Bosque).

O município possui clima ameno (temperatura média de 22°C) e altitude relativamente elevada, que varia de 756 metros na baixada (antigo matadouro) a 920 metros no Morro de Rubião Júnior (ponto mais alto). O clima da região é tropical de altitude, com invernos amenos e verões quentes. No inverno dificilmente a temperatura cai abaixo de 10°C, mas enquadrar as condições climáticas do município de Botucatu não é tarefa fácil devido à heterogeneidade do seu relevo (anexo 2).

O município de Botucatu, com quase 150.000 ha de área territorial, possui a seguinte composição (Programa de Obtenção de Imagens de Satélite – 1989):

- Cerradão 440 ha
- Várzea 663 ha
- Nativas:
 - o Mata 1ª 2556 ha
 - o Mata 2ª 1984 ha
- Exóticas:
 - o Pinus 76 ha
 - o Eucaliptos 3640 ha

O total da cobertura vegetal nativa no Município atinge 10,45% de sua área total.

4.2. Caracterização bioquímica dos venenos

4.2.1. Dosagem protéica

De uma forma geral, os venenos apresentaram um alto teor protéico variando de 518 a 1179 µg de proteína por mg de veneno (Tabela 7 e Figura 10).

Entre os Grupos I a IV não houve diferenças estatisticamente significativa. Entretanto, os venenos dos Grupos V e VI (filhotes recém chegados da natureza e mantidos no serpentário, respectivamente) apresentaram um teor protéico baixo, em média, 50% menor dos demais grupos, sendo estatisticamente significativa (machos e fêmeas adultos recém chegados da natureza e mantidos em regime de quarentena).

Tabela 7. Dosagem protéica das amostras de veneno de *Bothrops jararaca* segundo os grupos de estudo, segundo método de Bradford.

GRUPOS	Teor protéico (µg proteína/ mg veneno)
I	931,3 ± 48,1 ^a
II	975,6 ± 39,5 ^a
III	1047,6 ± 35,4 ^a
IV	1179,1 ± 32,9 ^{ab}
V	518,9 ± 13,0 ^c
VI	565,4 ± 35,0 ^c
VR	998,3±70,7 ^a

Análise estatística baseada no testes de ANOVA e Tukey-Kramer. Superíndices diferentes: a, b, c indicam diferenças estatisticamente significativas: $p \leq 0,05$, entre os grupos.

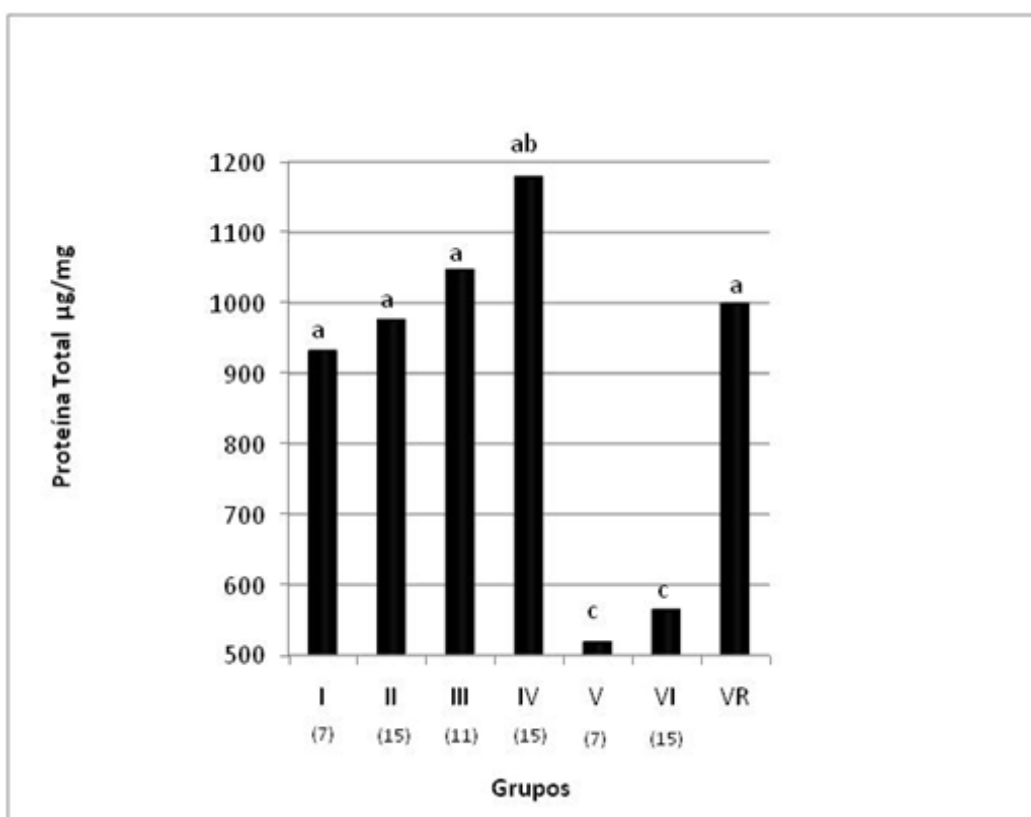


Figura 10. Dosagem protéica das amostras de veneno de *Bothrops jararaca*; GI – 07 machos adultos recém chegados da natureza; GII – 15 machos adultos mantidos em regime de cativeiro por mais de dois anos; GIII – 12 fêmeas adultas recém chegadas da natureza; GIV – 15 fêmeas adultas mantidas em regime de cativeiro por mais de dois anos; GV – 7 filhotes de ambos os sexos recém chegados da natureza; GVI – 15 filhotes de ambos os sexos mantidos em regime de cativeiro. Análise estatística baseada no testes de ANOVA e Tukey-Kramer. Superíndices diferentes: a, b, c indicam diferenças estatisticamente significativas: $p \leq 0,05$, entre os grupos.

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

A análise do perfil de migração eletroforética das amostras individuais do veneno de *Bothrops jararaca* apontou para perfis de maneira geral, semelhantes. Em condições não redutoras, os perfis protéicos mostraram-se semelhantes entre os animais adultos, apresentando componentes de massa molecular, abaixo de 75 kDa (Figuras 11 a 16). Duas regiões foram conservativas com massas moleculares de aproximadamente 24 kDa e 50 kDa,

com variações no número e disposição de bandas entre estas massas moleculares.

O Grupo I (Figura 11), apresentou dois indivíduos (2 e 6) com perfis protéicos semelhantes ao Veneno Referência Nacional na disposição e número de bandas, entretanto, houve uma grande variabilidade nas proteínas de massa molecular entre 10 e 15 kDa. O Veneno Referência Nacional não apresentou bandas protéicas de 20 kDa, que estiveram presentes na maioria dos indivíduos do Grupo I. No grupo II (Figura 12), houve diferenças entre os indivíduos de 8 a 15, que apresentaram proteínas entre 15 a 10 kDa, não sendo visualizado entre os indivíduos de 1 a 7.

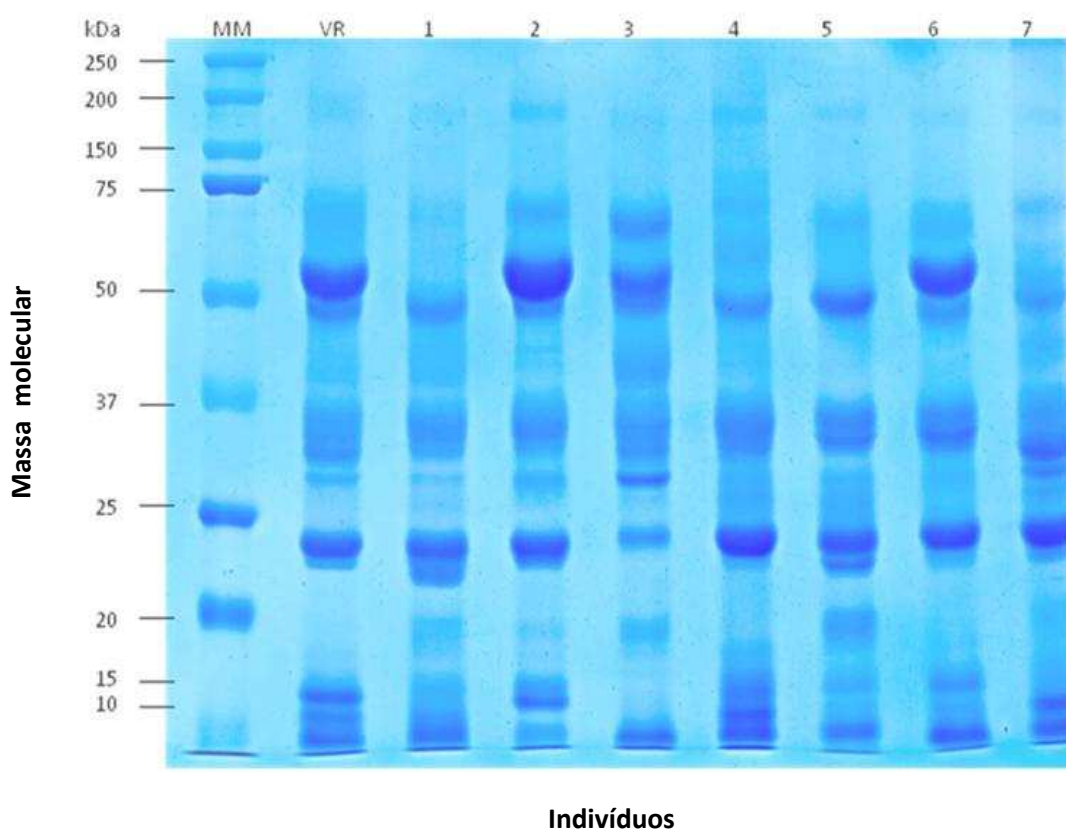


Figura 11. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% (m/v) sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo I. (MM) Massa molecular, (VR) Veneno Referência, (1-7) números respectivos de venenos obtidos de serpentes machos adultos, recém chegadas da natureza (Grupo I).

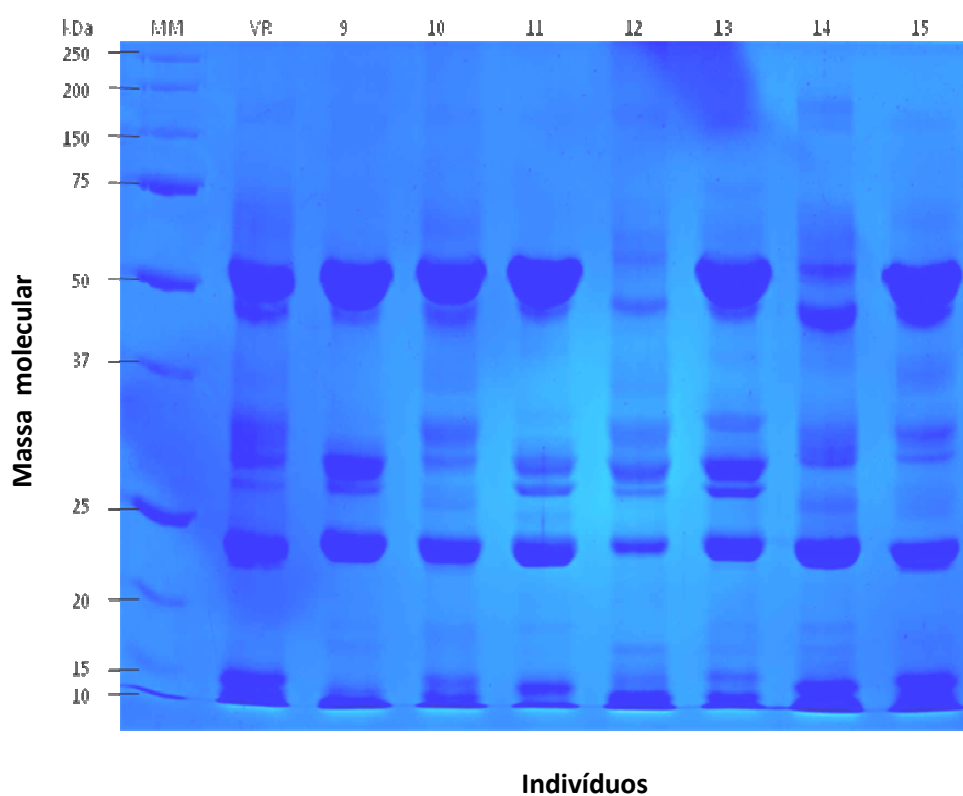
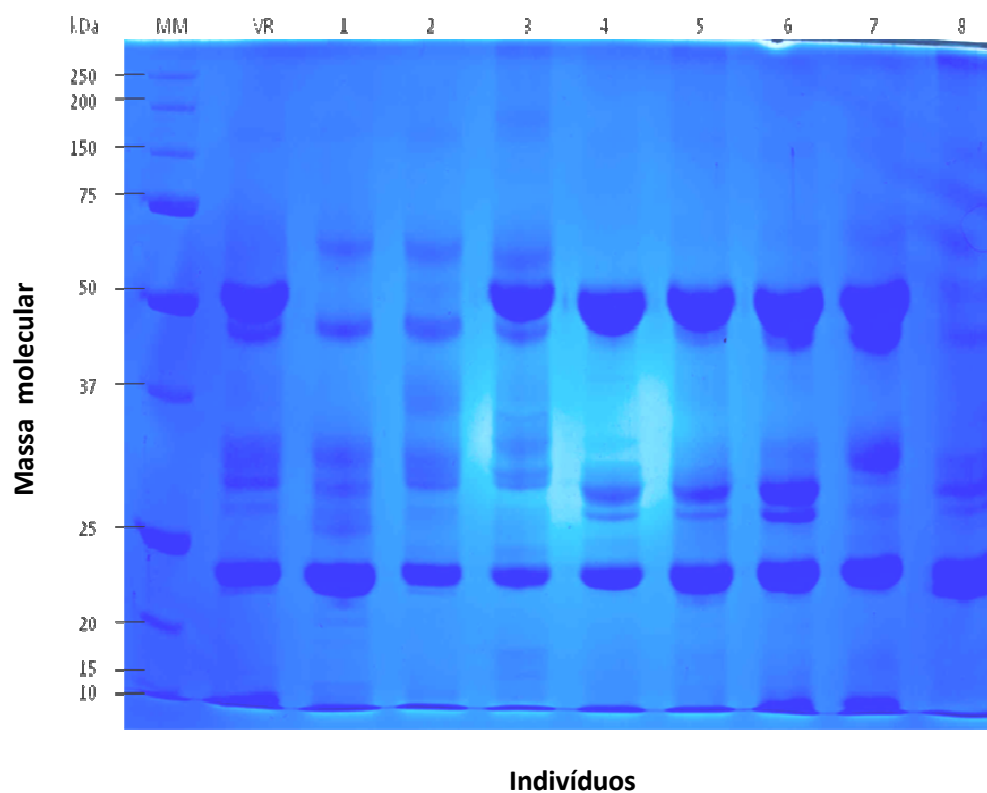
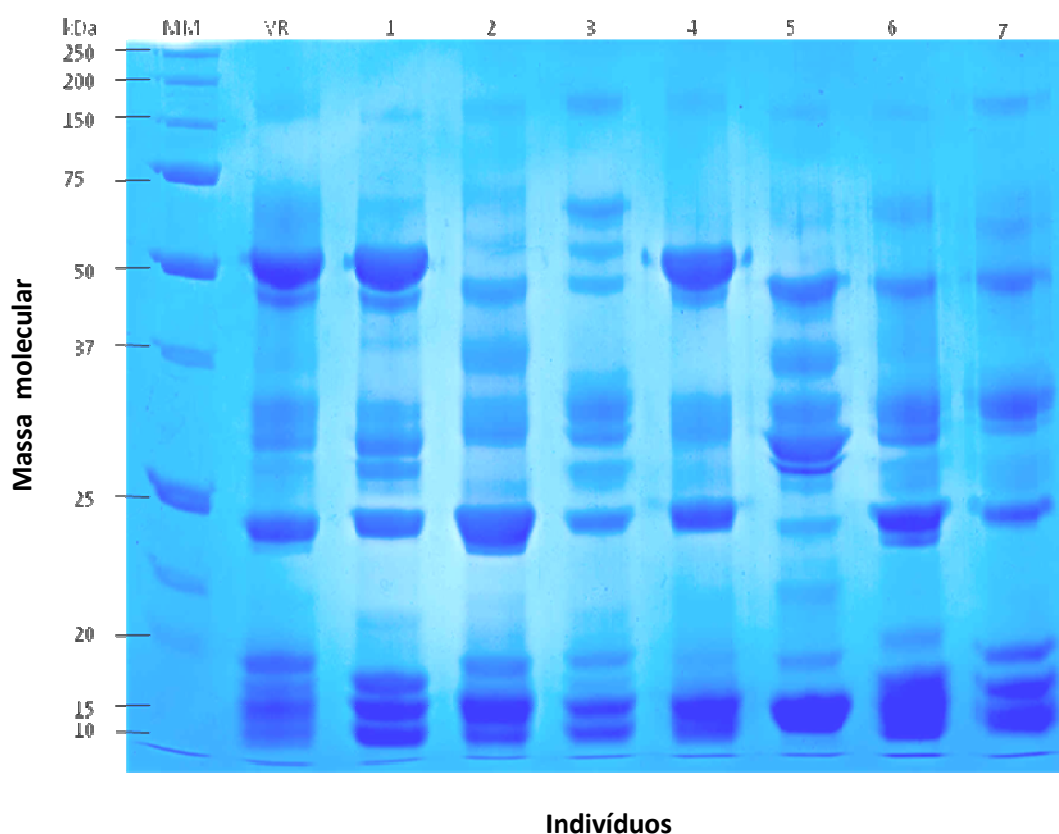


Figura 12. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% (m/v) sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo II. (MM) Massa molecular, (VR) Veneno Referência, (1-15) números respectivos de venenos obtidos de serpentes machos adultos, mantidos em regime de cativeiro (Grupo II).

O Grupo III (Figura 13), apresentaram bandas conservativas entre 24 e 50 kDa pela análise individual, similares ao Veneno Referência. No entanto, os indivíduos 1 a 7 evidenciaram, embora fracas, bandas protéicas entre 150 e 200 kDa, não demonstrado nos indivíduos 8 a 11. O indivíduo 8 apresentou um perfil eletroforético similar ao perfil do Veneno Referência Nacional. O grupo IV (Figura 14), também apresentou um perfil conservativo nas proteínas de massas de 24 a 50 kDa, embora com uma grande variabilidade na disposição ou intensidade das bandas. O indivíduo 3 apresentou similaridade com o Veneno Referência Nacional em seu perfil eletroforético, entretanto, apresentou uma proteína entre 150 e 200 kDa que também foi expressa no indivíduo 14, não sendo expressa nos demais indivíduos deste grupo.



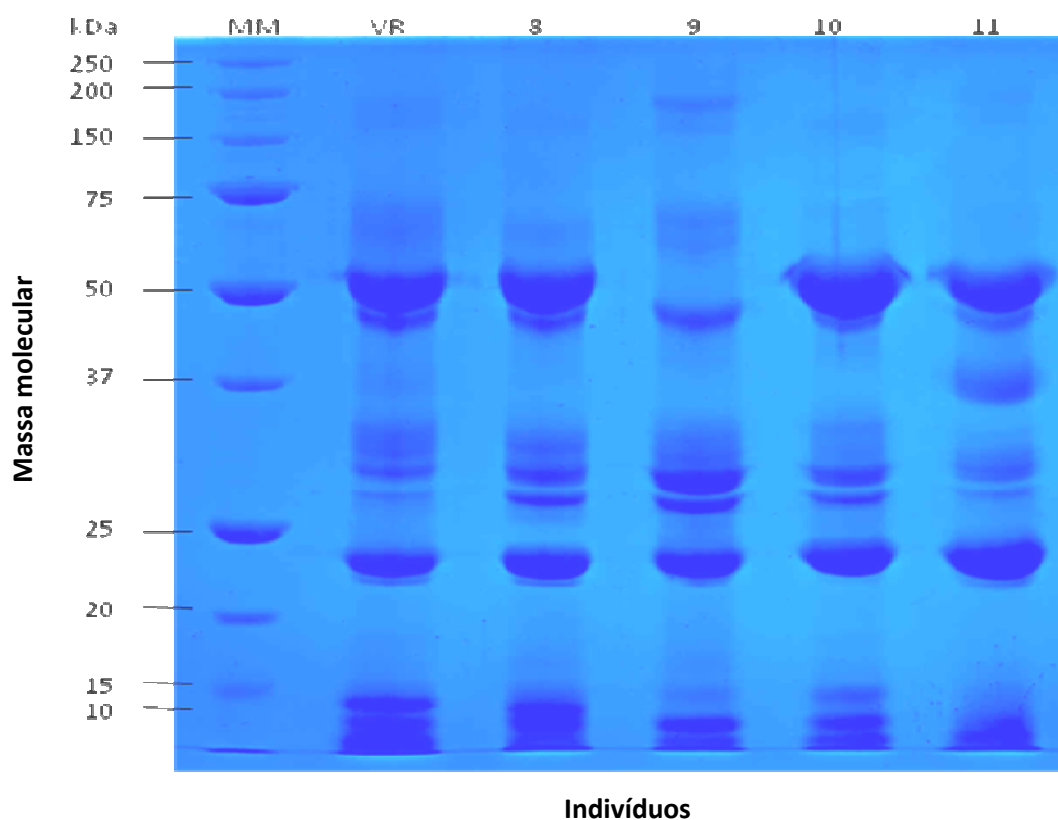


Figura 13. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% (m/v) sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo III. (MM) Massa molecular, (VR) Veneno Referência, (1-11) números respectivos de venenos obtidos de serpentes fêmeas adultas, recém chegadas da natureza (Grupo III).

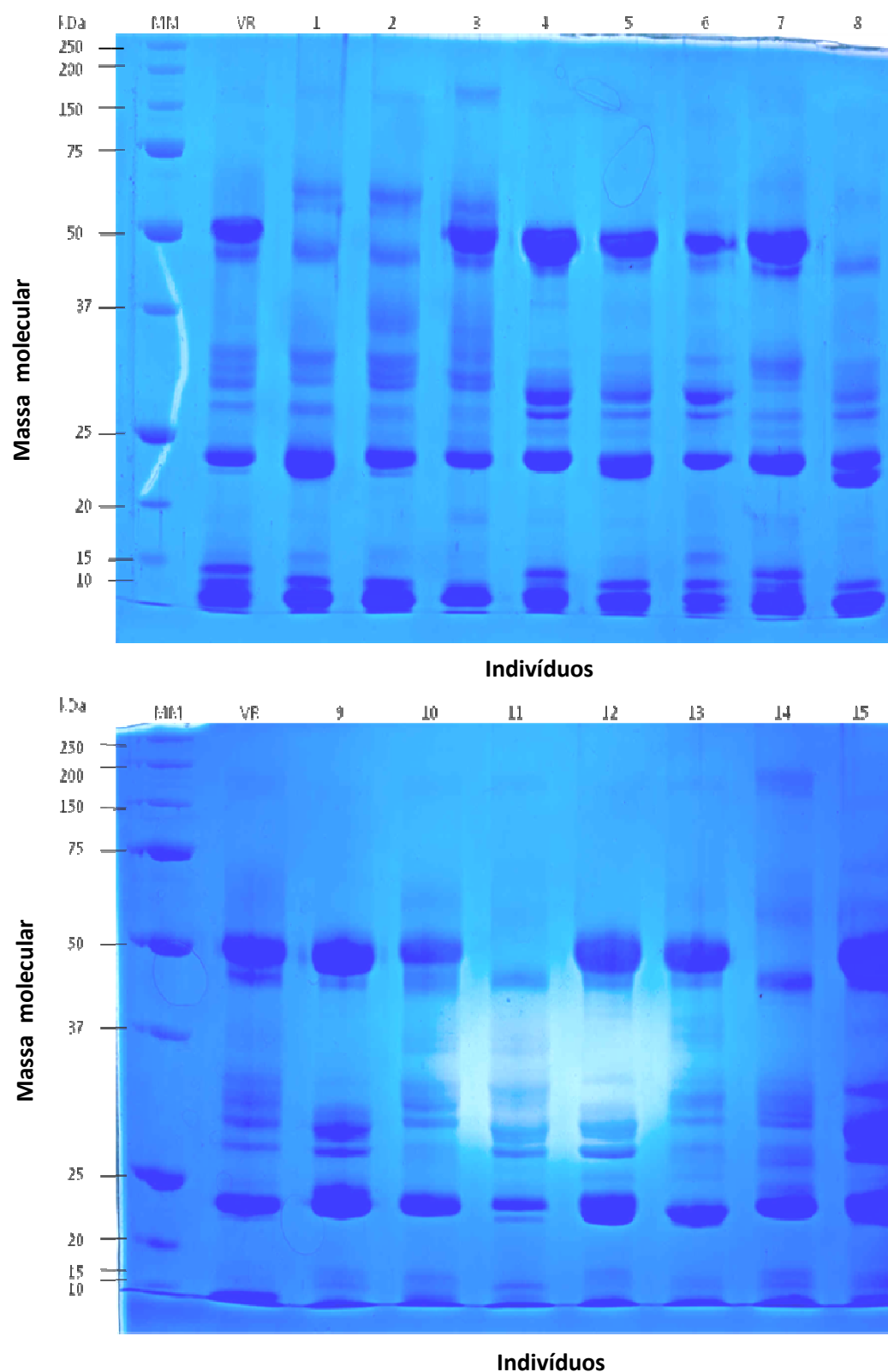


Figura 14. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13%(m/v) sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo IV. (MM) Massa molecular, (VR) Veneno Referência, (1-15) números respectivos de venenos obtidos de serpentes fêmeas adultas, mantidas em regime de cativeiro (Grupo IV).

Os grupos V e VI apresentaram perfis semelhantes ao Veneno Referência Nacional com bandas protéicas de massa de 50 kDa. Entre 15 a 37 kDa, o veneno do Grupo V apresentou bandas protéicas, que apesar de brandas, não foi expressa no Grupo VI. Contudo, foram expressas proteínas de massas moleculares entre 10 a 15 kDa apenas no Grupo VI.

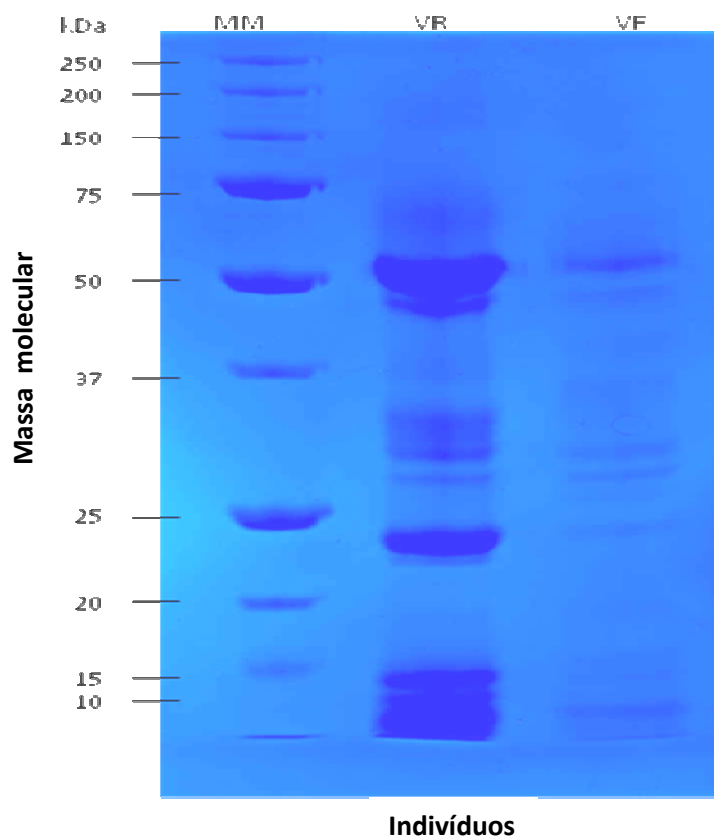


Figura 15. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13%(m/v) sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo V. (MM) Massa molecular, (VR) Veneno Referência, (VF) “pool” de venenos obtidos de serpentes de ambos os sexos com até 40 centímetros de comprimento, recém chegadas da natureza (Grupo V).

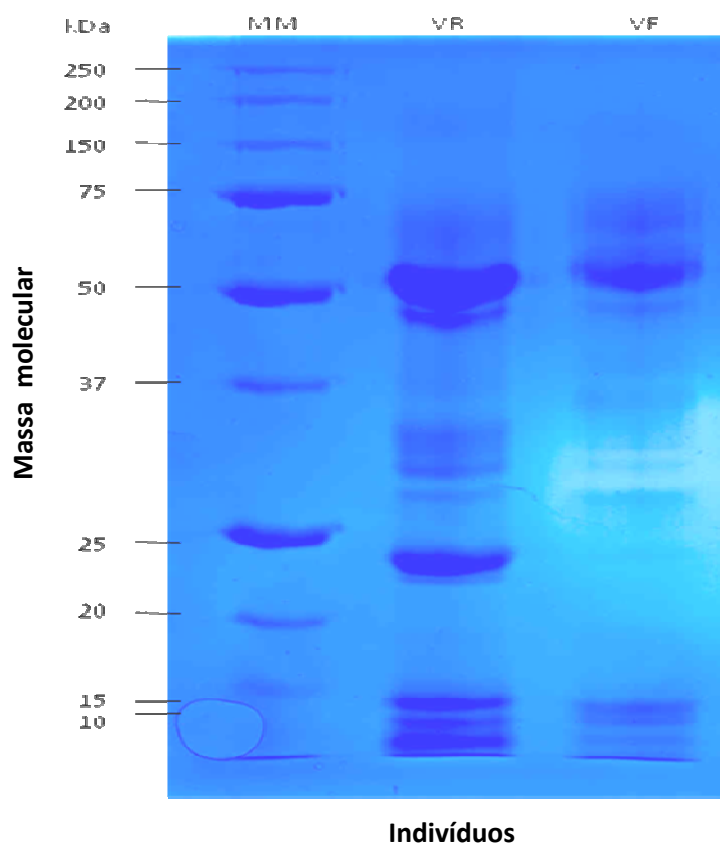


Figura 16. Análise eletroforética em SDS-PAGE 13% (m/v) sob condições desnaturantes e reduzidas, de amostras provenientes do Grupo VI. (MM) Massa molecular, (VR) Veneno Referência, (VF) “pool” de venenos obtidos de serpentes de ambos os sexos com até 40 centímetros de comprimento, mantidas em regime de cativeiro (Grupo VI).

4.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de fase reversa C₈ (RP- HPLC)

A Cromatografia Líquida foi realizada apenas em quatro grupos de estudo, a saber: Grupo II (machos adultos mantidos em cativeiro há mais de 2 anos), Grupo IV (fêmeas adultas mantidas em cativeiro há mais de 2 anos), Grupo VI (filhotes de ambos os sexos mantidos em cativeiro) e Grupo Veneno Referência (GVR). Os resultados da análise por HPLC revelaram grande

variabilidade na área e altura dos picos dos venenos de todos os grupos (Figuras 17 A-D), fato este corroborado pela análise eletroforética 1D.

O grupo Veneno Referência (GVR) apresentou diferenças em sua área e altura dos picos em comparação aos venenos das serpentes da região de Botucatu. As diferenças encontradas podem estar relacionadas com o tipo de dieta empregada, ou mesmo, a variações ambientais que podem ser características das serpentes da região de Botucatu-SP.

Porém, devido à complexidade da técnica e difícil identificação das alturas específicas, não foi possível detectar as variações cromatográficas individuais.

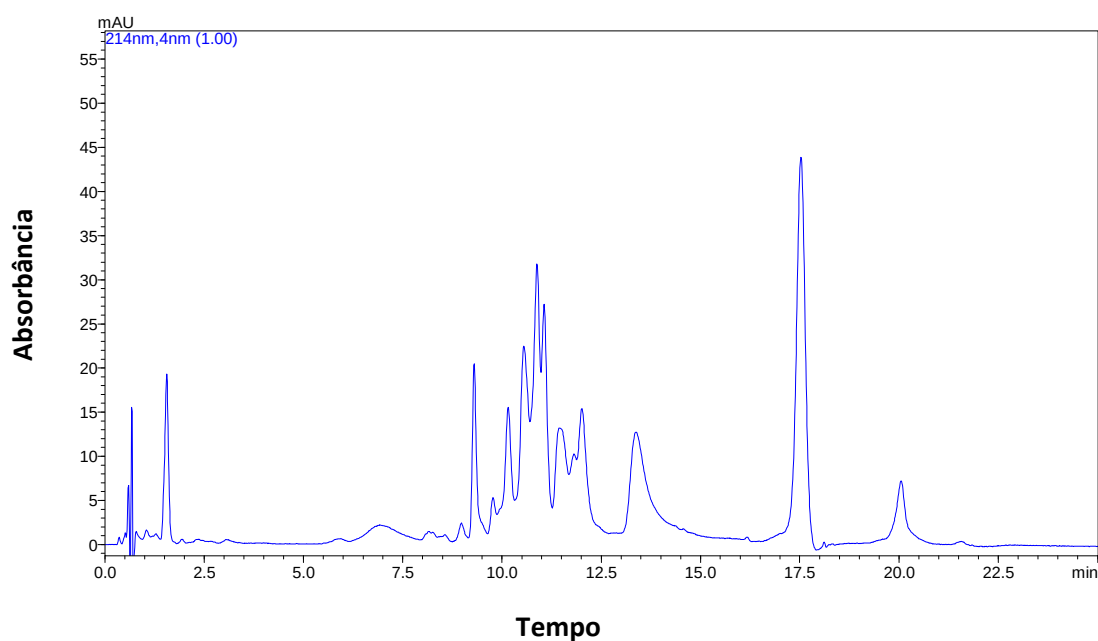


Figura 17 (A). RP-HPLC em coluna de fase reversa C₈ (50,0 x 4,6 mm), em um sistema Shimadzu Proeminence 20 A do “pool” de veneno de *Bothrops jararaca* do Grupo II (machos adultos mantidos em regime de cativeiro há mais de dois anos); Fluxo de 1,2 mL/min, durante 25 minutos e absorbância a 214 nm.

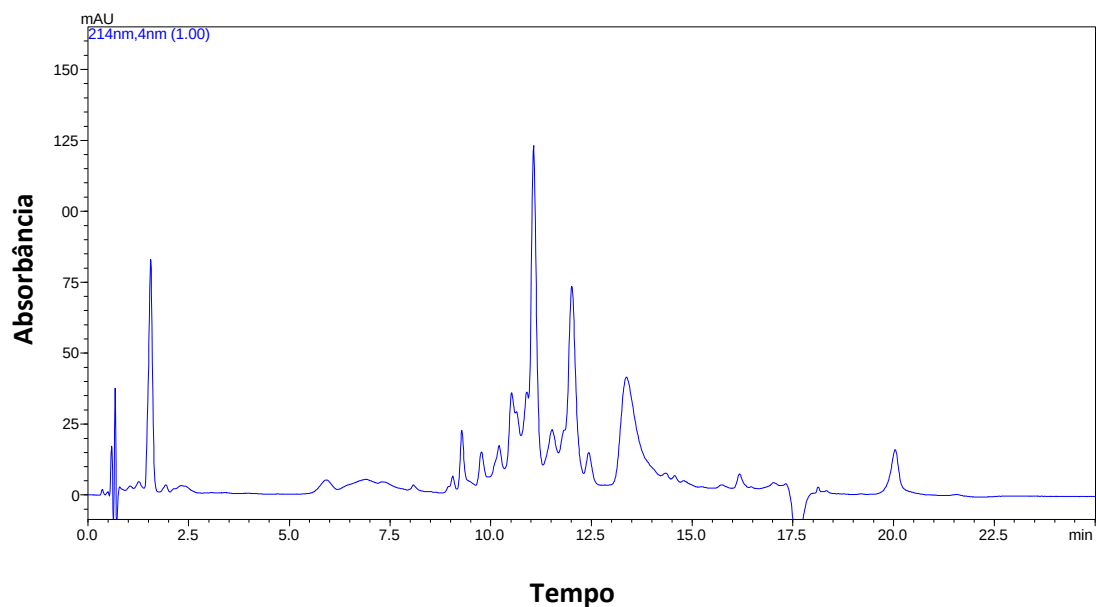


Figura 17 (B). RP-HPLC em coluna de fase reversa C₈ (50,0 x 4,6 mm), em um sistema Shimadzu Proeminence 20 A do “pool” de veneno de *Bothrops jararaca* do Grupo IV (fêmeas adultas mantidas em regime de cativeiro há mais de dois anos); Fluxo de 1,2 mL/min, durante 25 minutos e absorbância a 214 nm.

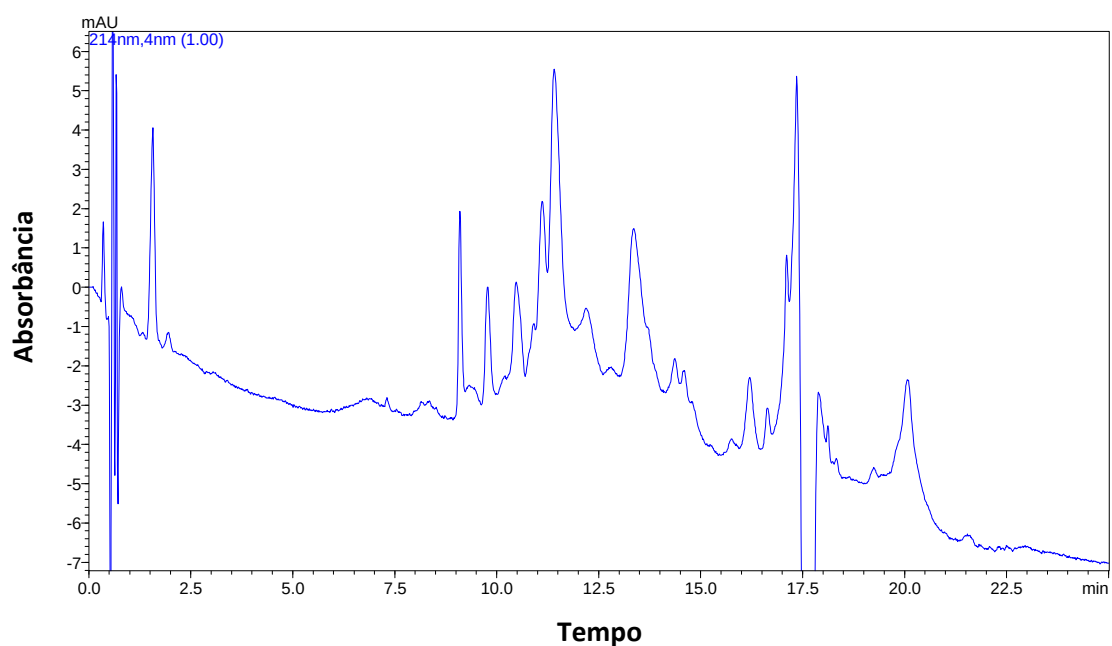


Figura 17 (C). RP-HPLC em coluna de fase reversa C₈ (50,0 x 4,6 mm), em um sistema Shimadzu Proeminence 20 A do “pool” de veneno de *Bothrops jararaca* do Grupo VI (filhotes de ambos os sexos mantidos em regime de cativeiro); Fluxo de 1,2 mL/min, durante 25 minutos e absorbância a 214 nm.

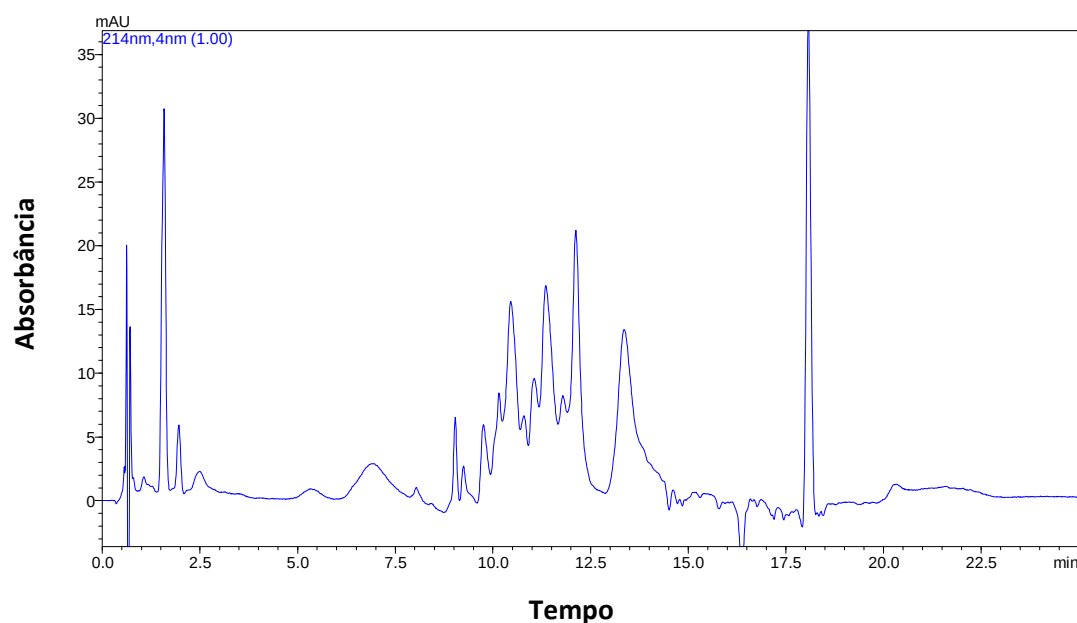


Figura 17 (D). RP-HPLC em coluna de fase reversa C₈ (50,0 x 4,6 mm), em um sistema Shimadzu Proeminence 20 A do “pool” de veneno de *Bothrops jararaca* do Grupo Veneno Referência Nacional; Fluxo de 1,2 mL/min, durante 25 minutos e absorbância a 214 nm.

4.3. Caracterização enzimática dos venenos

4.3.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano

Neste ensaio, a atividade coagulante dos venenos sobre o plasma humano citratado foi avaliada utilizando amostras de veneno individuais e “pool” em GV, GVI e GVR. Todas as amostras de veneno de *Bothrops jararaca* foram capazes de induzir a formação da rede de fibrina e, conseqüentemente, a formação de um coágulo (Tabela 8).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as atividades coagulantes do veneno dos Grupos I a IV (adultos de ambos os sexos), demonstrando que não houve perda da atividade coagulante do veneno durante o tempo decorrido no cativeiro, entretanto, diferiram significativamente em relação aos Grupos V e VI e GVR. O veneno dos animais jovens (GV e

GVI) se mostrou mais coagulante em relação ao veneno dos adultos e com atividade muito similar ao Veneno Referência Nacional (GVR).

4.3.2. Índice de coagulação

Para o índice de coagulação (Tabela 8), os resultados também se mostraram similares, não havendo diferenças entre os Grupos I a IV, que demonstrou não ocorrer perda da atividade coagulante do veneno durante o tempo de cativeiro. Já quando comparados ao veneno dos Grupos V, VI e GVR, houve grande variação, mostrando que filhotes recém chegados da natureza e cativos, possuem maiores Índice de Coagulação, muito próximos aos valores obtidos do Veneno Referência Nacional.

4.4. Caracterização farmacológica dos venenos

4.4.1. Determinação da atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica das amostras de “pools” do veneno de *Bothrops jararaca* e do Veneno Referência Nacional foi determinada comparando-se o halo hemorrágico formado entre as doses de cada grupo de estudo, a partir de uma dose previamente estabelecida de 10 µg de veneno. Todas as doses aplicadas foram capazes de formar um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro, em um período de até 3 horas.

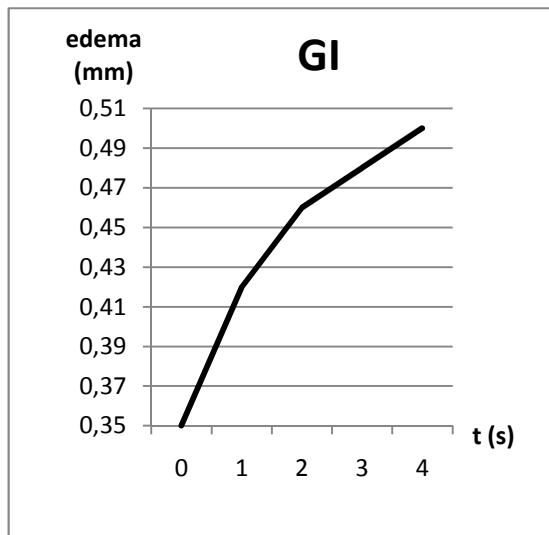
Foi observada diferença estatisticamente significativa apenas no Grupo I (machos adultos recém chegados da natureza), sendo mais hemorrágico quando comparado com os demais grupos ($0,17 \pm 0,08$ µg/cam). Nos Grupos II a V, houve similaridade nesta atividade, e o Grupo VI apresentou um valor mais próximo do Grupo I, sendo $0,11 \pm 0,03$ µg/cam, porém não estatisticamente significativo. O Grupo Veneno Referência (GVR) apresentou valores similares entre os Grupos II, III, IV e V, diferindo-se estatisticamente apenas do Grupo I (Tabela 8).

Segundo os resultados obtidos, pode-se sugerir que uma quantidade de 10 µg de veneno é capaz de formar um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro em todos os grupos de estudo, embora a área hemorrágica formada foi maior em machos recém chegados da natureza (Grupo I).

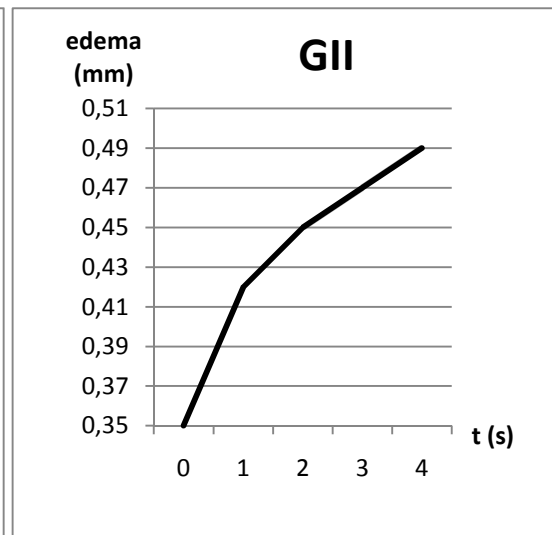
4.4.2. Determinação da atividade edematogênica

O aumento de volume de pata induzido pelo veneno de *Bothrops jararaca* foi determinado a partir de uma concentração de 5 µg/mL, previamente estabelecida e que expressa uma porcentagem de edema significativo. Em todos os grupos testados, foi utilizado um “pool” e o veneno induziu aumento do volume de pata, sendo que em alguns animais o aumento do edema vinha acompanhado de hemorragia local. O edema apresentou-se de forma crescente nos tempos analisados, sendo que o efeito máximo ocorreu 120 minutos T(4) após a inoculação. Entretanto, o Grupo V (filhotes recém chegados da natureza) apresentou uma baixa atividade edematogênica, diferindo significativamente do Grupo Veneno Referência (GVR). Os valores foram expressos pela média, em % de edema formado em relação aos tempos estabelecidos (Tabela 8).

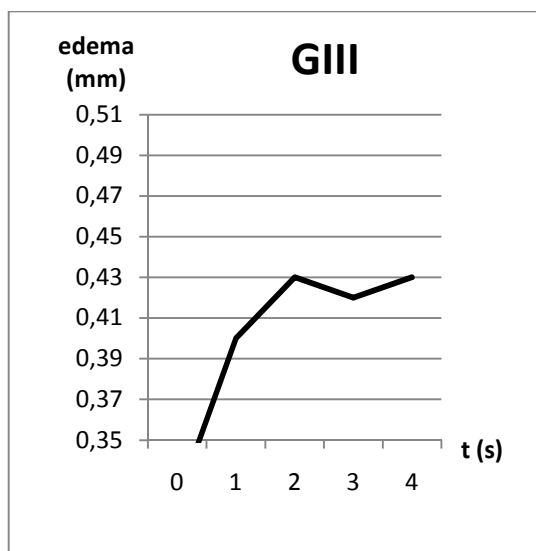
Os valores também estão apresentados em gráficos individuais segundo o grupo de estudo. Foram obtidas as médias de edema expresso nos seis camundongos utilizados para este ensaio e as médias dos cinco tempos de mensuração das patas, conforme metodologia estabelecida (Gráficos 1 A-G).



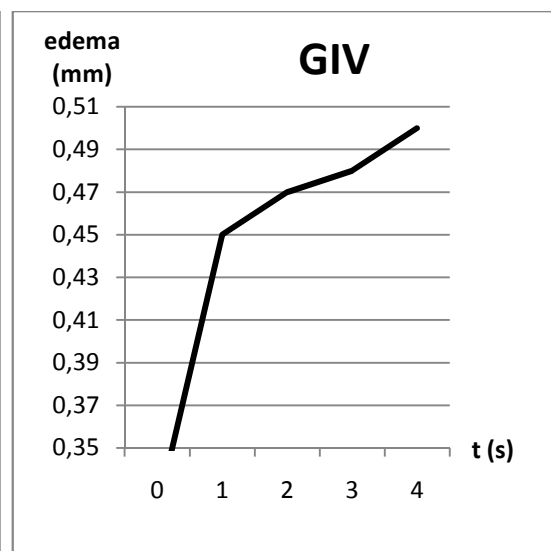
(A)



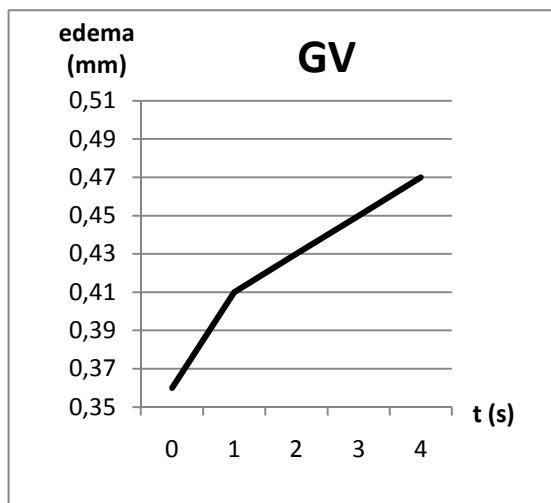
(B)



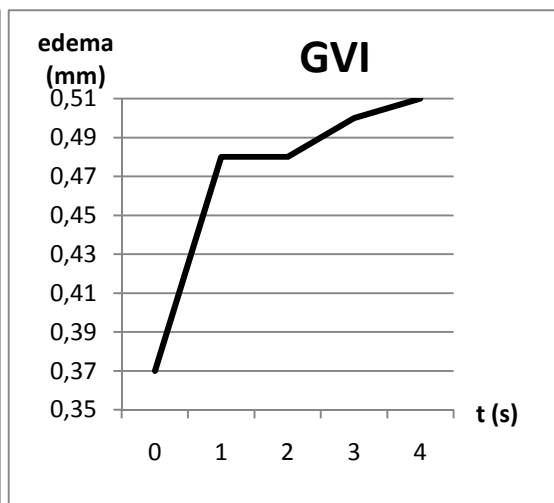
(C)



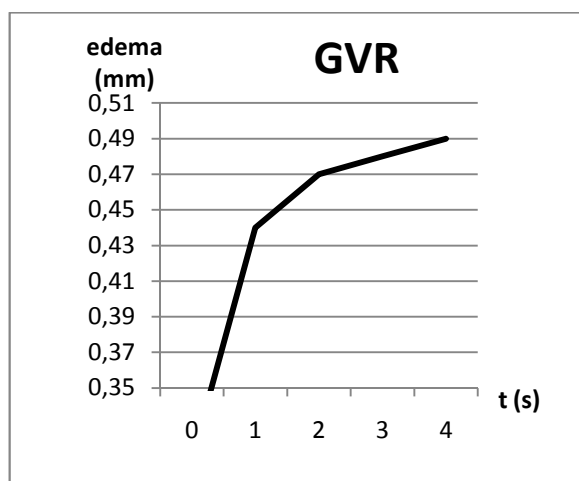
(D)



(E)



(F)



(G)

Gráfico 1 A-G. Valores obtidos na Atividade Edematogênica para cada grupo de estudo (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI e GVR). O edema é expresso em milímetros (mm) em função dos momentos de mensuração. Os momentos são T(0): início da inoculação; T(1): 30 minutos após a inoculação; T(2): 60 minutos após a inoculação; T(3): 90 minutos após a inoculação; T(4): 120 minutos após a inoculação.

4.4.3. Dose letal média (DL₅₀)

A Tabela 8 mostra a análise comparativa da Dose Letal Média dos “pools” dos venenos, onde os resultados foram expressos em miligramas (mg) de veneno por quilograma (kg) de animal modelo. Para camundongos, verificamos de uma forma geral, um aumento na letalidade com relação ao sexo, sendo as fêmeas (Grupos III e IV) mais letais, quando comparadas a machos (Grupos I e II) e filhotes (Grupos V e VI). O Grupo Veneno Referência (GVR) apresentou valores mais próximos aos Grupos I e II, sendo sua DL₅₀ de 66,4 mg/kg, entretanto estatisticamente significativa apenas para o Grupo IV (fêmeas cativas).

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa no Grupo IV (fêmeas cativas) com uma DL₅₀ de 36,2 mg/kg $\pm$ 10,3 mg/kg quando comparando ao Grupo VI (filhotes cativos) que apresentou uma DL₅₀ de 103,3 mg/kg $\pm$ 29,6 mg/kg ($p < 0,001$).

Os grupos I e II (constituídos de machos recém chegados da natureza e há mais de dois anos de cativeiro) apresentaram resultados idênticos, sendo a DL₅₀ de 72,3 mg/kg, menos letal quando comparados aos grupos III e IV, com 52,1 mg/kg e 36,2 mg/kg (constituídos de fêmeas recém chegadas da natureza e há mais de dois anos de cativeiro, respectivamente).

O grupo V (constituídos de filhotes recém chegados da natureza) apresentou como resultado uma DL₅₀ de 103,3 mg/kg, sendo menos tóxico quando comparado aos demais grupos de estudo. Não foi possível obter a DL₅₀ do grupo VI (filhotes cativos) em virtude da baixa quantidade de veneno extraído, visto que os filhotes são muito sensíveis à extração e vinham a óbito.

Tabela 8. Valores médios obtidos da atividade coagulante, índice de coagulação, atividade hemorrágica, atividade edematogênica e Dose Letal Média (DL₅₀) do veneno de *Bothrops jararaca* dos grupos estudados.

Atividade /Grupos	I	II	III	IV	V	VI	VR
Coagulante (µg/cam)	16,3±0,3 ^a	16,7±0,4 ^a	16,6±0,6 ^a	16,6±0,6 ^a	11,5±0,4 ^b	11,5±0,3 ^b	12,3±0,6 ^b
Índice de Coagulação (%)	61,3 ^a	59,9 ^a	60,3 ^a	60,3 ^a	87,1 ^b	87,0 ^b	81,0 ^b
Hemorrágica (µg/cam)	0,17±0,08 ^a	0,04±0,03 ^b	0,07±0,01 ^b	0,04±0,01 ^b	0,05±0,02 ^b	0,11±0,03 ^{ab}	0,06±0,02 ^b
Edematogênica (% edema mm)	25,9 ^a	24,5 ^a	33,5 ^a	28,6 ^a	15,4 ^b	26,9 ^a	39,6 ^{bc}
DL₅₀ (µg/cam)	72,3±20,7 ^a	72,3±20,7 ^a	52,1±14,9 ^a	36,2±10,3 ^b	103,3±29,6 ^c	n.d.	66,4±18,6 ^a

Análise estatística baseada no testes de ANOVA e Tukey-Kramer. Superíndices diferentes: a, b, c indicam diferenças estatisticamente significativas: $p \leq 0,05$, entre os grupos. n.d.: não determinado;

5. Discussão

O Brasil é um país com características climáticas e geográficas muito variadas e, por isso, possui uma riquíssima diversidade na fauna e na flora.

O gênero *Bothrops*, espécie *Bothrops jararaca* apresentam características morfológicas muito heterogêneas, com visíveis variações no padrão de coloração e escamação, sendo predominantemente terrestres e semi-arborícolas^{17,70}. Habita áreas florestadas, embora também possa ser encontrada em matas sazonais semi-decíduas, áreas que foram altamente degradadas e campos de cultivo⁷¹. Também são conhecidas populações de serpentes do gênero *Bothrops* em 11 ilhas continentais⁷².

Pesquisas utilizando seqüências de DNA mitocondrial sugeriram que a ampla distribuição de *Bothrops jararaca* pode ser formada por um complexo de diferentes espécies de serpentes⁷³.

A serpente *Bothrops jararaca* é a espécie mais abundante na região Sudeste do Brasil, sendo de grande importância do ponto de vista médico, já que ocasiona a maioria dos acidentes ofídicos notificados^{74,75}. Segundo dados do Sistema de Vigilância em Saúde²¹ (SVS/2008), foram notificados 6.689 (25%) de casos de acidentes por serpentes peçonhentas só na região Sudeste do Brasil, sendo o gênero *Bothrops* responsável por aproximadamente 4920 acidentes. Registros do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu apontam um número de 1800 casos de acidentes por serpentes peçonhentas, sendo 180 casos (10%) ocasionados pela espécie *Bothrops jararaca*. Assim o conhecimento desta espécie, bem como o seu veneno, tem se tornado altamente relevante devido à grande variação ambiental, ontogenética e sexual já identificado nesta espécie por diferentes autores^{55,56,76}.

As toxinas animais, inclusive antiofídicas, ganharam destaque no mercado farmacêutico por exercerem diversas ações. O homem aprendeu, juntamente com a evolução da ciência, que a diferença entre um medicamento e o veneno está intimamente ligada a administração correta da dose. Portanto, ensaios químicos, farmacológicos, bioquímicos, enzimáticos, fisiológicos e

toxicológicos de tais compostos, como proteínas, peptídeos e enzimas, estão sendo desenvolvidos de forma específica, visando à verificação nas próprias toxinas animais, de substâncias com efeitos benéficos ao homem⁷⁷.

O veneno de *Bothrops jararaca* tem sido objeto de uma série de investigações, revelando um grande espectro de atuações como a ativação plaquetária e da cascata de coagulação sanguínea^{78,79,80}, indução de inflamação e edema^{81,82}, além da hemorragia local e sistêmica^{83,84,85}.

Fatores limitantes interferiram na realização do presente estudo, uma vez que ocorreu uma queda de aproximadamente 50% na chegada de serpentes *Bothrops jararaca* ao CEVAP. Por se tratar de amostras de serpentes individuais, havia pouca quantidade de veneno, principalmente para o grupo dos filhotes, fato este que impediu um tratamento estatístico mais adequado.

No presente estudo, pode-se sugerir uma variabilidade ontogenética nos venenos de *Bothrops jararaca* para explicar os resultados encontrados na maioria dos experimentos realizados. Ao contrário dos venenos dos animais considerados filhotes, os venenos dos adultos de ambos os sexos não diferiram estatisticamente do utilizado como parâmetro de comparação, o Veneno Referência Nacional.

O teor protéico observado para adultos de ambos os sexos foi de aproximadamente 90% de proteínas, corroborando os achados da literatura para venenos botrópicos⁵⁵. Entretanto, o teor protéico observado para filhotes foi menor, diferindo de Furtado *et al.*⁵⁵; Serrano *et al.*⁸⁶ e Antunes *et al.*⁸⁷, que apontaram teores protéicos semelhantes entre adultos e filhotes de ambos os sexos.

A dieta diferenciada entre os grupos, sendo que os filhotes se alimentavam exclusivamente de pequenos répteis e anfíbios, e as serpentes adultas exclusivamente de roedores, foi outro fator que pode ter influenciado a quantidade de proteínas encontradas no veneno. Segundo Fry *et al.*⁸⁸, a dieta apresenta um importante papel na composição dos venenos de serpentes e age como um selecionador de características. A disponibilidade e a

suscetibilidade das presas ao veneno estão relacionadas diretamente com os hábitos alimentares e conseqüentemente, com a composição do veneno de serpentes⁸⁹.

Apesar das serpentes adultas apresentarem um teor protéico mais alto, sugere-se que as ações das peçonhas “in vivo” são causadas pelas combinações entre as proteínas dos venenos, e não apenas pela quantidade delas.

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são misturas bastante complexas com diferentes propriedades tóxicas ou enzimáticas, e entre os principais componentes estão as lectinas, metaloproteinases, serinoproteinases, desintegrinas, fosfolipases e peptídeos, que agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina⁹⁰.

De acordo com estudos clássicos, a técnica de eletroforese possibilita grande resolução dos padrões de proteínas presentes nos venenos, permitindo a identificação de alguns de seus componentes⁹¹⁻⁹⁵.

No presente estudo, a análise dos perfis de migração eletroforética sob condições não reduzidas e desnaturantes do veneno de *Bothrops jararaca* de serpentes adultas de ambos os sexos, em geral, foram semelhantes e mostraram pequenas variações no número, disposição e intensidade das bandas. Todas as amostras apresentaram componentes abaixo de 60 kDa. Os Grupos I a IV apresentaram massas moleculares entre 24 e 50 kDa, sendo conservativas para quase todas as amostras estudadas. Nesta região estão presentes as lectinas tipo-C e as serinoproteinases, principalmente as que apresentam atividade tipo trombina⁷⁹.

Segundo achados de Antunes *et al.*⁸⁷ proteínas de 55 a 85 kDa são preferencialmente expressas em serpentes jovens, demonstrando serem proteínas de cadeia simples. Entretanto, nossos achados diferem da literatura, sendo que nas serpentes jovens (Grupos V e VI), através da análise eletroforética, as proteínas se expressaram com massas moleculares aproximadas de 50 kDa, não sendo encontradas proteínas acima deste valor.

Por outro lado, quando comparadas as proteínas expressas nos venenos de serpentes dos Grupos I a IV, os perfis corroboram os achados de Antunes *et al.*⁸⁷ que relatam a existência de proteínas de massas entre 14,7 kDa e 16 kDa.

Uma das primeiras lectinas tipo-C encontradas no veneno de *Bothrops jararaca* foi a Botrocetina, a qual promove aglutinação de plaquetas e apresenta massa molecular de 31 kDa. Outra lectina tipo-C identificada é a (GP)Ib, com massa molecular de 30 kDa, mas que não induz a agregação plaquetária^{96,97}. A Bothojaracina também é uma lectina tipo-C de 27 kDa, que está presente no veneno de *Bothrops jararaca* e possui um efeito anticoagulante resultante de dois mecanismos sinérgicos e distintos. Esta toxina forma um complexo com a trombina, inibindo-a de agir sobre substratos naturais, como o fibrinogênio⁹⁸.

Dentre as principais serinoproteinases presentes no veneno de *Bothrops jararaca* encontram-se a Botrombina, com 33 kDa que possui atividade tipo trombina, coagulando o fibrinogênio, mas não produz efeito direto sobre as plaquetas, ao menos que o fibrinogênio exógeno esteja presente⁹⁹. Por outro lado, a PA-BJ, com massa molecular de 30 kDa, possui atividade amidolítica e induz agregação plaquetária por interagir com o receptor de plaquetas PAR1 (protease activated receptor 1)¹⁰⁰. As serinoproteinases KN-BJ1 e KN-BJ2, com massas moleculares de 38 e 39 kDa, respectivamente, possuem atividade amidolítica, atividade sobre a liberação de cininas e atividade coagulante^{101,102}.

Dados da literatura descrevem proteínas com atividade proteolítica, tais como a Bothropasina, com aproximadamente 48 kDa, e algumas proteínas que possuem atividade hemorrágica, como a HF1 e HF2, localizadas entre 62 e 46 kDa¹⁰³, embora Mandelbaum *et al.*¹⁰⁴ discordem dessa afirmação, ressaltando que a toxina HF2 apresenta baixa atividade proteolítica.

Em 1992, Paine *et al.*¹⁰⁵ purificaram uma metaloproteinase com atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca* com massa de 52 kDa que foi chamada de Jararagina. Esta toxina promove lesão endotelial sistêmica e trombocitopenia.

No presente estudo, os Grupos III e IV apresentaram perfis semelhantes, embora o Grupo III tenha mostrado para alguns indivíduos, perfis protéicos de aproximadamente 150 a 250 kDa. Nos Grupos V e VI houve a prevalência de proteínas de baixa massa molecular, sendo encontradas proteínas de 50 kDa a aproximadamente 10 kDa. No Grupo VI não foram verificadas proteínas compreendidas entre massas moleculares de 20 a 50 kDa, porém quando foram comparados os perfis das proteínas com massas moleculares abaixo de 10 kDa, os venenos se tornaram semelhantes. Assim, esses achados diferem dos encontrados por Antunes *et al.*⁸⁷, que encontraram bandas protéicas de 55 a 85 kDa, principalmente em filhotes de *Bothrops jararaca*. Sugere-se que a variação ontogenética pode ter sido o fator responsável por essas diferenças protéicas, já que os Grupos V e VI tiveram sua dieta exclusivamente composta de pequenos répteis e anfíbios.

Os venenos botrópicos apresentam isoformas de fosfolipases A₂ (PLA₂) com atividade miotóxica. Algumas destas toxinas, não apresentam atividades enzimáticas de PLA₂. A falta da atividade enzimática é devida à substituição de Asp-49 por Lys-49 em sua estrutura protéica. Estudos realizados com fosfolipases miotóxicas demonstram mesmo após a inibição da atividade fosfolipásica, ocorrem danos musculares e citólise³⁹.

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, de uma forma geral, apresentam proteínas de massas moleculares entre 25 a aproximadamente 50 kDa, as quais englobam muitas serinoproteinases, mas principalmente metaloproteinases da classe P-I, que são responsáveis pela atividade proteolítica. Devido a esses fatores, sugere-se que os acidentes com serpentes adultas, por ser mais proteolítico, deve dispender maiores cuidados, uma vez que existe maior probabilidade de ocorrência de áreas decorrentes de necrose.

A purificação de toxinas presentes nos venenos de serpentes exige cuidados extremamente importantes para a obtenção de um produto final de qualidade com relação ao seu grau de pureza e suas atividades. Quando a estrutura da proteína a ser isolada é conhecida, no que tange à sua composição de aminoácidos, ou é ainda homóloga a outra proteína já estudada, o processo de purificação torna-se mais simples. No entanto, quando

não se conhece a composição da proteína a ser purificada, o processo para a obtenção desta torna-se empírico, devendo ser testadas várias condições e técnicas de purificação¹⁰⁷.

No presente estudo, a análise cromatográfica, por HPLC, revelou uma grande variabilidade nas áreas e alturas dos picos obtidos para os venenos de todos os grupos, fato este corroborado pela análise eletroforética. As maiores diferenças encontradas ocorreu no Grupo Veneno Referência Nacional (GVR), Pode-se sugerir que a variação ambiental e regional possa ser um fator desta variabilidade.

Entretanto, como não houve uma proteína específica de interesse e como há escassez de dados na literatura, não foi possível detectar as áreas e intensidades cromatográficas dos venenos individuais, visto que este não era o objetivo do estudo. No entanto, novos estudos devem ser realizados para o conhecimento do perfil protéico através da técnica de RP – HPLC.

Existem diversos trabalhos^{43,49,54,55} relatando implicações da variabilidade ontogenética na atividade coagulante dos venenos de serpentes. Kamiguti¹⁰⁸ evidenciou significativas diferenças na atividade coagulante dos venenos de serpentes recém-nascidas e espécimes adultos de *Bothrops jararaca*. Também foram verificadas diferenças na ação coagulante sobre o plasma humano em venenos de filhotes de algumas espécies brasileiras do gênero *Bothrops*, bem como uma acentuada ativação dos fatores X e II da cascata de coagulação sanguínea⁵⁵.

Nahas *et al.*⁷⁷ relataram atividades do tipo-trombina e ativadora do fator X em espécies do gênero *Bothrops*, incluindo *Bothrops jararaca*. Saldarriaga *et al.*¹⁰⁹ verificaram maior atividade coagulante nos venenos de exemplares jovens (de seis meses a aproximadamente um ano de vida) de *Bothrops atrox* e *Bothrops asper* na Colômbia. Em análise da atividade coagulante de venenos de jovens e adultos de *Bothrops atrox* da Amazônia, López-Lozano *et al.*¹¹⁰ encontraram resultados semelhantes, onde os exemplares jovens apresentaram maiores atividades coagulantes sobre o plasma humano.

No presente estudo, os valores obtidos por meio do ensaio da Dose Mínima Coagulante sobre o plasma, norteiam para uma atividade coagulante mais intensa no veneno de animais jovens pertencentes aos Grupos V e VI, corroborando dados da literatura^{55,75,76}. A alimentação destas serpentes foi exclusivamente composta por répteis e anfíbios e concordam com os achados de Fry *et al.*⁸⁸, que afirmaram que serpentes cuja alimentação é generalista (composta por uma variedade de tipos de presas) necessitam de uma multiplicidade de diferentes toxinas para burlar os diferentes sistemas de defesa das presas, afetando seus alvos fisiológicos.

A atividade mais intensa do veneno dos filhotes (Grupos V e VI) pode ser atribuída à expressão diferencial de metaloproteinases envolvidas na ativação do fator X e da protrombina, e não a um aumento na atividade da trombina-like, conforme mostrado por Rosenfeld *et al.*¹¹¹, Kamiguti¹⁰⁸, e Furtado *et al.*⁵⁵.

A semelhança para o Índice de Coagulação entre os Grupos I a IV e a diferença estatisticamente significativa observada entre os Grupos V e VI e GVR era esperada, uma vez que o Índice de Coagulação está diretamente relacionado com a Atividade Coagulante, sendo apenas utilizada uma fórmula para expressar esta atividade, em porcentagem.

Segundo Céspedes *et al.*¹¹², após análise do veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, comparando-se animais adultos com animais mantidos em cativeiro, não ocorreram variações para a atividade coagulante sobre o plasma humano. Este fato corrobora os achados encontrados na presente pesquisa.

A ativação do fator X é um passo importante na cascata de coagulação sanguínea e se apresenta em maior concentração em venenos de animais jovens⁸⁷, o que poderia estar associado à intensa atividade coagulante sobre o plasma, verificada no Grupo V e VI.

Em análise das atividades coagulante e ativadora dos fatores X e II (mais intensas nos venenos de filhotes com relação aos venenos de adultos), Kamiguti¹⁰⁸ sugere tanto diferenças qualitativas, como por exemplo, a

possibilidade de isoformas presentes nos venenos dos animais jovens que atuariam eficazmente na ativação dos fatores X e II da cascata de coagulação sanguínea, como quantitativas, decorrentes de uma maior expressão de ativadores dos fatores X e II nos venenos de serpentes jovens.

Em relação à atividade hemorrágica, a variação observada nos venenos pode estar associada à presença de diferentes bandas protéicas na região, com massa molecular aproximada de 50 kDa, uma vez que as metaloproteinases são freqüentemente vinculadas a processos hemorrágicos^{113,114}.

Outro fator que poderia implicar nas variações encontradas, seria a quantidade de animais utilizados que poderia ter ocasionado erros encontrados nas análises, que embora aceitáveis, impedem a comparação estatística de uma forma mais específica. Além disso, apenas a medida do diâmetro do halo não expressa toda a hemorragia incidida, podendo se considerar outras medidas como, por exemplo, a espessura, embora esta seja de difícil avaliação.

Os resultados do presente estudo mostraram que existe uma maior atividade hemorrágica nos venenos de animais adultos, principalmente em machos recém chegados da natureza (Grupo I). Neste grupo foi encontrado um percentual hemorrágico de $0,17 \pm 0,8 \mu\text{g/cam}$. Considerando que o veneno dos filhotes do gênero *Bothrops* não causa lesões locais significativas nos acidentados, ao passo que o envenenamento por serpentes adultas causa lesões bastante graves¹¹⁵, este resultado era esperado. Os resultados corroboram os achados de Furtado *et al.*⁷⁶ que relataram uma atividade hemorrágica maior no veneno de serpentes macho. Entretanto, o Grupo VI (filhotes mantidos em regime de cativeiro há mais de dois anos) apresentou valores elevados, ficando muito próximos aos valores obtidos pelo Grupo I ($0,11 \pm 0,03 \mu\text{g/cam}$), mas não mostraram diferença estatisticamente significativa. No entanto, os fatores que poderiam estar agindo sobre esse estágio do desenvolvimento, levando a um aumento da atividade hemorrágica permanecem desconhecidos.

Segundo estudos de Antunes *et al.*⁸⁷, as atividades mais acentuadas são observadas nas amostras de veneno de exemplares juvenis de *Bothrops jararaca*, enquanto que as menores atividades são observadas nos venenos provenientes de serpentes mais velhas (adultas). Estes fatores discordam em parte, dos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que as atividades hemorrágicas foram mais acentuadas nos Grupos I a IV (adultos), com exceção do Grupo VI (filhotes mantidos em regime de cativeiro). Resultados similares foram descritos por Gutiérrez *et al.*⁴⁵ que relataram aumento da atividade de acordo com a idade dos animais. Segundo estudos de Lomonte *et al.*¹¹⁶ na espécie *Crotalus durissus terrificus* apenas o veneno de serpentes adultas induz atividade hemorrágica.

Com base nesses achados, é possível inferir que a metodologia empregada na avaliação da atividade hemorrágica se mostrou eficaz sobre a visualização da ação dos venenos e sua correlação dose-dependente, no entanto, este método não é o mais indicado para quantificar e comparar esta atividade. Segundo Owby *et al.*¹¹⁷ uma dosagem de hemoglobina seria mais adequada para a investigação deste parâmetro, permitindo reduzir a quantidade de animais empregados.

Os ensaios de atividade edematogênica permitiram verificar um aumento marcante (expresso em %) de edema em todos os grupos estudados. Em contrapartida, não foi possível avaliar se houve variação ontogenética, visto que o Grupo V (filhotes recém chegados da natureza) manteve uma dieta exclusiva, composta de répteis e anfíbios, mostrando valores menos expressivos, ou seja, menos edematogênicos. Dessa forma, pode-se sugerir que a dieta empregada e variações ambientais podem influenciar a atividade edematogênica no caso de um acidente real, já que essa dieta era desconhecida antes da chegada dos animais ao CEVAP.

As diferenças significativas entre as porcentagens de edema induzido encontradas entre a comparação dos Grupos V e VI permitem sugerir que a variação ontogenética e ambiental em serpentes *Bothrops jararaca* pode influenciar também a terapêutica dos acidentes, visto que as serpentes que pertenciam ao Grupo VI, foram exclusivamente alimentadas com pequenos

répteis e anfíbios, além da temperatura e umidade terem sido monitoradas constantemente.

Segundo Gonçalves¹¹⁸, a atividade edematogênica do veneno de *Bothrops jararaca* é dose-dependente, assim como outros venenos do gênero *Bothrops*. No presente estudo, entretanto, optou-se pelo emprego de uma dose previamente estabelecida e que produz um edema significativo, já que o objetivo principal foi analisar e comparar a variabilidade dos venenos das serpentes entre os grupos, e não definir a dose-dependente para cada grupo.

No presente estudo, a inoculação dos camundongos com venenos de serpentes adultas e filhotes de *Bothrops jararaca* induziu a formação de um edema inflamatório, sendo que nos espécimes adultos este edema foi mais intenso, corroborando os resultados obtidos por Antunes *et al.*⁸⁷.

A atividade edematogênica foi estudada por Gutierrez *et al.*⁴⁹ em venenos de *Lachesis muta stenophrys* adultos e filhotes. Os autores observaram variações ontogenéticas, sendo que o veneno dos filhotes se mostrou menos edematogênico. Lomonte *et al.*¹¹⁶ ao estudarem venenos de serpentes *Crotalus durissus durissus* de acordo com a idade, verificaram que somente serpentes adultas apresentaram edema, sendo esta atividade não evidenciada em filhotes. Por outro lado, venenos de serpentes adultas de *Bothrops asper* e *Bothrops atrox* produzem um edema menos intenso em camundongos, quando comparados a exemplares adultos destas espécies^{109,119}.

A constatação de que o veneno de serpentes adultas da espécie *Bothrops jararaca* é mais edematogênico, pode estar correlacionada a uma maior atividade proteolítica, que poderia desencadear danos nos tecidos e, conseqüentemente, a uma elevada resposta inflamatória, quando comparada ao veneno dos filhotes.

Na atividade de dose letal média (DL₅₀) houve uma grande variação de toxicidade em relação aos venenos estudados, principalmente nos Grupos IV (fêmeas adultas mantidas em regime de cativeiro) e Grupo V (filhotes recém chegados da natureza). O veneno do Grupo IV mostrou-se três vezes mais letal

em camundongos quando comparados aos venenos de filhotes (Grupo V), estando de acordo com estudos de Andrade e Abe⁴⁵, Furtado *et al.*⁵⁵ e Zelanis *et al.*⁵⁶.

Segundo Ferreira *et al.*¹²⁰, os principais fatores que afetam a letalidade dos venenos de várias espécies do gênero *Bothrops* são as atividades hemorrágica e edematogênica. Assim, seria esperado que o veneno dos filhotes, que apresentam maior atividade hemorrágica, fosse mais letal que o veneno dos adultos. Entretanto, isto não ocorreu, já que o Grupo que apresentou uma maior atividade hemorrágica foi o Grupo I (machos recém chegados da natureza), e quando comparado aos demais Grupos, não mostrou diferença estatisticamente significativa. Portanto, poderia ter ocorrido uma variação ontogenética no veneno, o que foi observado em outras espécies do gênero *Bothrops*. Estas atividades apresentam variações de acordo com a espécie estudada, sendo que o veneno de filhotes pode ser mais ou menos letal que o veneno dos animais adultos.

Segundo Andrade¹²¹, após comparação da toxicidade dos venenos de filhotes e adultos de *Bothrops moojeni*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus*, foram encontradas variações ontogenéticas quando se utilizou como modelo experimental rãs touro (*Rana catesbeiana*). Os venenos dos filhotes de *Bothrops jararaca* e *Bothrops moojeni*, mostraram-se mais tóxicos para rãs (53,64 e 45,02 mg/kg, respectivamente) do que os venenos de adultos das mesmas espécies (91,44 e 83,5 mg/kg). Estes valores são bem maiores que os obtidos para camundongos, o que demonstra a especialização e resistência dos anfíbios anuros ao veneno de serpentes.

Embora, no presente estudo não tenha sido realizada, é importante ressaltar que a avaliação da capacidade de neutralização dos antivenenos está diretamente relacionada à composição dos mesmos⁷⁵. Assim, teoricamente, um soro que não contemplasse amostras oriundas das regiões onde ocorreu o acidente seria “menos eficaz”. A produção de antivenenos, de acordo com Ratanabanangkoon¹²², seria mais eficaz se contemplasse uma gama maior de espécies quando não é possível determinar a serpente causadora do acidente

ou ainda, quando existem inúmeras espécies que poderiam ter causado o acidente.

No presente estudo, as diferenças identificadas na composição e em algumas ações dos venenos sugerem que o antiveneno tenha um perfil mais regionalizado, o que poderia possibilitar o seu acréscimo ao “pool” que visa a fabricação do soro de distribuição nacional, além de permitir a sua utilização em regiões mais próximas das áreas de coleta. Neste caso, o ideal seria incluir amostras de peçonhas de animais de todas as áreas de ocorrência das espécies, porém isto se torna difícil devido a grande extensão territorial do Brasil e a impossibilidade do envio de animais ou dos venenos aos órgãos responsáveis pelos anti-venenos. Além disso, a produção de um soro regionalizado seria inviável em virtude do alto custo. Podemos dispor da soroneutralização cruzada, a qual é obtida por meio da maioria dos “pools” de veneno botrópico e demonstra uma eficácia diferente para cada tipo de acidente, porém é vital no tratamento em acidentes por serpentes peçonhentas.

Estudos futuros sobre a capacidade de soroneutralização são necessários para a confirmação dos achados do presente trabalho.

Toda a variação de toxicidade encontrada nos venenos estudados vem acrescentar dados aos resultados anteriormente discutidos e também da literatura, por indicar variações de toxicidade em venenos de um mesmo país, ou de um Estado, além do tempo decorrido em cativeiro. Contudo, a literatura é insuficiente em relação à variabilidade dos venenos de serpentes de uma região tão delimitada e com um grande número amostral.

Para alguns ensaios deste estudo, foram analisados separadamente os venenos dos animais, com o objetivo de preservar e evidenciar possíveis diferenças, seja elas, individuais, sexuais ou ontogenéticas. Menezes *et al.*¹²³ demonstraram diferenças no perfil proteômico e em algumas atividades bioquímicas de venenos de *Bothrops jararaca* machos e fêmeas pertencentes a uma mesma ninhada.

Estudos de Furtado *et al.*⁷⁵, demonstraram que o dimorfismo sexual encontrado em *Bothrops jararaca* tem implicações nos diferentes constituintes

do veneno desta espécie. As fêmeas apresentam um corpo mais delgado e alongado, refletindo a tendência de se alimentar de presas maiores (preferencialmente pequenos roedores), o que não ocorre nos machos, que possuem tamanho menor e mantêm sua dieta muito similar aos filhotes, constituída de presas menores e ectotérmicas (anfíbios e répteis).

Por meio de diferentes modelos experimentais, Mackessy *et al.*¹²⁴ evidenciaram a variabilidade ontogenética no veneno de *Boiga irregularis*. Os resultados apresentados por estes autores apontam para especializações dos venenos que conferem uma maior eficácia na alimentação de diferentes presas.

Todavia, como forma de reforçar as hipóteses já encontradas e descritas na literatura, seria importante uma análise no conteúdo estomacal de machos, fêmeas e filhotes de *Bothrops jararaca* da área de estudo, a fim de que os dados encontrados sejam fidedignos aos achados literários.

As pesquisas atuais que envolvem venenos de serpentes consistem na busca de um melhor entendimento dos aspectos clínicos do envenenamento humano e de mecanismos da ação dos venenos e de suas toxinas isoladas, na prospecção de toxinas com potenciais terapêuticos, no desenvolvimento de novos soros antiofídicos, e na busca de terapias alternativas aos tratamentos convencionais.

Os resultados do presente estudo ilustram a complexidade intra e interespecífica, presente em venenos de serpentes, possivelmente devido à variabilidade ontogenética, sexual e ambiental no veneno de *Bothrops jararaca*. Os dados apresentados neste trabalho sugerem uma possível especialização do veneno, frente a todos os fatores estudados.

6. Considerações finais

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram tecer as seguintes considerações finais:

- O teor protéico encontrado no veneno das serpentes adultas de ambos os sexos foi de aproximadamente 90%. No entanto, este teor foi relativamente menor em filhotes recém-chegados da natureza em relação aos mantidos em regime de cativeiro. Essa diferença entre os teores protéicos pode estar relacionada com a diferença na dieta destas serpentes, já que os adultos se alimentavam de pequenos roedores e os filhotes, de anfíbios e répteis;
- Os venenos apresentaram perfis eletroforéticos semelhantes para a maioria dos Grupos de estudo, com bandas protéicas de 24 a 50 kDa. Os Grupos III e IV (formados por fêmeas adultas recém chegadas da natureza e mantidas em cativeiro há mais de dois anos) apresentaram também proteínas de alta massa molecular, variando de 150 a 250 kDa. Os Grupos V e VI (formados por filhotes recém-chegados da natureza e mantidos em cativeiro respectivamente) apresentaram resultados similares, entretanto o Grupo VI (formado por filhotes mantidos em cativeiro) não apresentou proteínas entre 20 a 50 kDa;
- A partir da análise cromatográfica foi possível confirmar a grande diversidade de proteínas presentes nos venenos dos diferentes grupos, seja na sua concentração ou mesmo em relação à presença de múltiplas formas;
- Os venenos dos filhotes (Grupos V e VI) têm maior eficácia na ativação dos fatores X e II da coagulação sanguínea, por isso apresenta uma atividade coagulante mais elevada, muito similar ao Veneno Referência Nacional;

- O Índice de coagulação mostrou-se semelhantes nos grupos I a IV, porém com diferenças estatísticas comparados aos grupos V, VI e GVR;
- Na análise da atividade hemorrágica, o grupo I e VI apresentaram maiores halos hemorrágicos, diferindo dos demais grupos de estudo. As massas moleculares de aproximadamente 50 kDa são responsáveis pelos processos hemorrágicos e estão localizadas nestas regiões protéicas. Entretanto, esses resultados eram esperados apenas para espécies adultas de *Bothrops jararaca*;
- Diversos são os fatores que podem estar relacionados com a elevada atividade hemorrágica em filhotes mantidos em cativeiro. Sugere-se que haja uma variação individual na composição do veneno, em virtude do tipo de dieta, variações ambientais e sexuais;
- A atividade edematogênica mostrou-se semelhante em todos os grupos de estudo, com um aumento do edema diretamente relacionado com o tempo analisado, sendo que no T(4): 120 minutos, o edema foi o mais significativo;
- Os venenos do grupo IV (fêmeas mantidas em regime de cativeiro a mais de dois) mostraram ser três vezes mais letal quando comparado ao grupo V (filhotes recém chegados da natureza). A toxicidade dos venenos pode estar relacionada com a ontogênese destes animais;
- A variabilidade ontogenética no veneno de *Bothrops jararaca* pode estar associada com sua divergência de dieta, verificada para esta espécie que na fase adulta, se alimenta de presas maiores;

Assim, os dados apresentados neste trabalho sugerem uma possível especialização do veneno das serpentes *Bothrops jararaca*, frente às

variações sexuais, ambientais e ontogenéticas, podendo ser característicos de serpentes da região de Botucatu a qual possui clima característico, com temperatura anual média de 22 °C e altitude máxima de 920 metros;

Por fim, novos estudos devem ser conduzidos para a melhor compreensão da variabilidade inter e intraespecífica do veneno de serpentes *Bothrops jararaca* de Regiões mais delimitadas, visto que esta espécie tem abrangência e importância nacional. Diante disso, a verificação da capacidade de soroneutralização pelos antivenenos comerciais produzidos no Brasil deve ser considerada.

7. Resumo

O veneno de *Bothrops jararaca* é constituído de misturas complexas de toxinas e entre os principais componentes estão as lectinas, metaloproteinases, serinoproteinases, desintegrinas, fosfolipases e os peptídeos. Esta composição pode variar de acordo com a idade, o sexo e a região da serpente. Este trabalho avaliou a variação individual do veneno de *Bothrops jararaca* da região de Botucatu – São Paulo, por meio da sua caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica. Foram utilizados testes *in vitro* e ensaios biológicos. As atividades dos venenos foram comparadas ao Veneno Referência Nacional. A dosagem protéica apresentou variações entre os grupos de serpentes adultas (80% proteínas) e filhotes (40% proteínas). O perfil eletroforético apresentou perfis similares, geralmente com massas moleculares de 50 a 25 kDa, porém com variações intraespecíficas. O RP-HPLC revelou variações na concentração das proteínas. Na atividade coagulante não houve variação entre os grupos formados por adultos, no entanto, houve uma grande variação entre os grupos de filhotes e Veneno Referência Nacional, sendo estes mais coagulantes. A atividade hemorrágica mostrou maior atividade nos venenos de animais adultos, principalmente em machos recém chegados da natureza. Entretanto, os filhotes mantidos em regime de cativeiro apresentaram valores elevados, ficando muito próximos aos valores obtidos de machos adultos. Na atividade edematogênica, verificou-se um aumento do edema em todos os grupos de estudo não sendo possível avaliar se houve uma variação ontogenética entre os grupos estudados. Na dose letal média (DL₅₀) houve uma grande variação de toxicidade em relação aos venenos, sendo as fêmeas cativas, três vezes mais tóxicas comparadas aos filhotes. Os resultados deste estudo ilustram a complexidade intra e interespecífica presentes em venenos de serpentes, neste caso, possivelmente representado por variabilidade ontogenética, sexual e ambiental no veneno de *Bothrops jararaca*. Os dados apresentados neste trabalho sugerem uma possível especialização do veneno, frente a todos os fatores estudados.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*, variação ambiental, variação sexual, variação ontogenética, veneno.

8. Abstract

Bothrops jararaca venom comprises a complex mixture of toxins. Among its main components are: lectins, metalloproteinases, serine proteinases, disintegrins, phospholipases, and peptides. The venom composition can be present age, sex and region variation. This present study evaluated the individual variation of *Bothrops jararaca* venom in Botucatu region, São Paulo state, through enzymatic, biochemical and pharmacological characterizations of snake venoms which employed *in vitro* techniques and *in vivo* analysis. Venoms actions were compared with those of the National Venom Reference. Protein dosage varied between adult (80% proteins) and newborn (40% proteins). The electrophoretic profiles were similar, usually presenting molecular masses from 25 to 50 kDa; however, intraspecies variations were present. Due to the complexity of the technique, it was not possible to detect the individual chromatographic variations by means of RP-HPLC revealed individual protein variations on venom composition. There was no variation in the coagulant activity among adult groups; however, a great variation was observed between newborn groups and the National Venom Reference, the latter showing higher coagulant activity. Venoms from adult animals revealed greater hemorrhagic activity, mainly in newly captured males. Nevertheless, newborn kept in captivity also presented elevated hemorrhagic activity, close to that of adult males. Regarding the edematous activity, there was edema increase in all studied groups, therefore, it was not possible to evaluate if ontogenetic variations were present among studied animals. Concerning the median lethal dose (LD₅₀), a great variation in venom toxicity was observed and captive females were three times more toxic when compared to newborn. Our findings showed the intra- and interspecies complexity of snake venoms possibly represented by ontogenetic, sexual and environmental variability of *Bothrops jararaca* venom. Data herein presented suggest a possible venom specialization in relation to all studied factors.

Keywords: *Bothrops jararaca*, environmental variation, sexual variation, ontogenetic variation, venom.

9. Referências

1. Santos JI. Estudos estruturais com Fosfolipases A2 do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*: Proposição de um novo sítio miotóxico. [Tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2007. 93p. Pós graduação em Biologia Geral e Aplicada.
2. Mader DR. Reptile Medicine Surgery. 2nd ed. Saunders: Missouri, 2006.
3. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823-46.
4. Weinstein SA, Kardong KV. Properties of Duvernoy's secretions from opistoglyphous and aglyphous colubrid snakes. *Toxicon*. 1994;32(10):1164-85.
5. Hayes WK, Herbert SS, Rehling GC, Gennaro JF. Factors that influence venom expenditure in viperids and other snakes species during predatory and defensive contexts. In: Schuett G, Höggren M, Greene HW (editors). *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing; 2002.
6. Melgarejo-Gimenez AR. Serpentes Peçonhentas no Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FF, MálaqXue CMS, Haddad Jr V (editores). *Animais Peçonhentos no Brasil*. São Paulo: Sarvier; 2003. p 33-61.
7. Salomão MG, Wuster W, Thorpe RS. MtDNA Phylogeny of neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Squamata:Serpentes:Viperidae). *Kaupia*. 1999;8(127):134.
8. Wuster W, Salomão MG, Quijada-Mascarenãs JA, Thorpe RS. Origin and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: *Biology of the vipers*. Eagle Mountain Publishing, 111-128, 2001.
9. Campbell JA, Lamar W. *The Venomous Reptiles of Latin America*. Cornell Univ. Press, Ithaca, 1989.
10. Martins M, Araujo MS, Sawaya RJ, Nunes R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of neotropical pitvipers (*Bothrops*). *J. Zool. London*. 2001;254:529-38.

11. Martins M, Marques OAV, Sazima I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habitats in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: Biology of the vipers. Schuett, GW, Hoggren, M, Douglas, ME, Greene, HW (Editores). Eagle Mountain Publishing, L.C., 307-328, 2002.
12. Sociedade Brasileira de Herpetologia; Brasil; 2011. [capturado em 19 jan 2011] Disponível em : www.sbherpetologia.org.br.
13. Finwick AM, Gutberlet Jr RL, Evans JA, Parkinson CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). Zoological Journal of the Linnean Society. 2009;156:617-40.
14. Gomes N & Puerto G. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). Mem. Inst. Butantan. 1993;55(1):69-100.
15. Sazima I. Um estudo da biologia comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. Mem. Inst. Butantan. 1988;50:83-99.
16. Sazima I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: Campbell JA, Brodie ED. Biology of the Pit vipers. Selva, Tyler, TX, 199-216, 1992.
17. Vanzolini PE. Regressão do peso sobre o comprimento em *Bothrops jararaca* e sua variação sexual e estacional. Pap. Avulsos. Zool. São Paulo Bras. VII (25) 271-292, 1946.
18. Janeiro-Cinquini TRF, Leini FF, Figueiredo VCF. Sexual dimorphism in adult *Bothrops jararaca*. Bulletin of the Chicago Herpetologic Society. 1992;27(4):94-5.
19. Cardoso SRT. Estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). Dissertação de mestrado em Ciências. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia. Universidade de São Paulo, São Paulo. 89p., 2001.
20. Puerto G, Laporta- Ferreira IL, Sazima I. Serpentes na selva de pedra. Ciência Hoje. 1991;13(76):66-67.

21. Guia de Vigilância Epidemiológica. Secretaria da Saúde. 823 p, 2009.
22. Barraviera B, Ferreira Jr RS. Acidentes por animais peçonhentos. 1ª ed. Lar Anália Franco: São Paulo, 2007.
23. WHO – World Health Organization. Progress in the characterization of the venom and standartization of anti venom. Geneve WHO Publication, 1981: 58.
24. Ribeiro LA. Epidemiology of ofidic accidents. Mem. Inst Butantan.1990;52:15-16.
25. Ribeiro L, Jorge M. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. Rev. Inst. Med. Tropical. 1990;32:436-42.
26. Ribeiro L, Pires de Campos VAF, Albuquerque MJ, Takaoka NY. Acidente ofídico no Estado de São Paulo. Rev. Ass. Med. Bras. 1993;39(1):4-7.
27. Secretaria do Estado de São Paulo da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos: identificação, diagnóstico e tratamento. Manual de Vigilância Epidemiológica, 1993.
28. Cardoso JLC, Fan HW, Fonseca SOS, Jorge MT, Leite RP. Randomiset comparative trial of three anti-venom in the treatment of envenoming by lance headed zips (*Bothrops jararaca*). Q. J. Med. 1993;83.
29. Sazima I, Haddad CFB. Répteis da Serra do Japi: notas sobre história natural. In: L.P.C. Morellato (Org.). História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. Ed. Unicamp/Fapesp. Campinas, SP. 321p. 212-236, 1992.
30. Izidoro LF, Ribeiro MC, Souza GR, Sant´Ana CD, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, Goulart LR, Beleboni RO, Nomizo A, Sampaio SV, Soares AM, Rodrigues VM. Biochemical and functional characterization of na L-amino acid oxidase isolate from *Bothrops pirajai* snake venom. Bioorg Med. Chem, Epub. 2006;14(20):7034-43.

31. Stocker KF. Composition of snake venom. In: Sticker, KF. ed. Medical use of snake protein. CRC Press., Boca Raton. 1990;2:33-57.
32. Kochva E, Nakar O, Ovardia M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. Amer. Zool. 1983;23:427-30.
33. Thomas RG, Pough FH. The effects of rattlesnake venom on the digestion of prey. Toxicon. 1979;17:221-28.
34. Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SF, Kuruppu S, Fung K, Hedges SB, Richardson MK, Hodgson WC, Igjatovick V, Summerhayes R, Kochva E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. Nature. 2005;439:584-8.
35. Gans C, Elliot WB. Snake venom production, injection, action. Adv. Oral. Biol. 1968;3:45-81.
36. Kochva E. The origin of snake and evolution of the venom apparatus. Toxicon. 1987;(1):65-106.
37. Barret AJ, Rawlings ND. Families and clans of serine peptidases. Arch. Biochem. Biophys. 1995;318:247-50.
38. Varanda EA, Giannini MJS. Bioquímica de veneno de serpentes. In: Venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Barraviera, B., 205-223, 1999.
39. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂, myotoxins from *Bothrops* snake venom. Review Article. Toxicon. 1995;33(11):1405-24.
40. Kini RM. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. Toxicon. 2005;45:1147-61.
41. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. J Biol Chem. 1994;269:13057-60.
42. Nevalainen TJ, Graham GG, Scott KF. Antibacterial actions of secreted phospholipase A₂. Biochem Biophys Acta. 2008;1781:1-9.

43. Perrone MAL, Villarroel MS, Furtado MFD. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfológicamente duvidosas. Mem. Inst. Butantan. 1989;51:25-32.
44. Mackessy SP. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). Comp. Biochem. Physiol. 1993;106B(1):181-9.
45. Andrade DV, Abe A. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. Herpetological. 1999;55:200-4.
46. Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Gutiérrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* snake venoms from Colombia. Toxicon. 2003;42:405-11.
47. Tu AT. Overview of snake venom chemistry. Adv. Exp. Med. 1996;381:37-62. In: matsui T, Fujimura *et al*. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochem. Biophys Acta. 2000;1477:146-56.
48. Tan NH, Ponnudurai G, Mirstschin PJ. A comparative study on the biological properties of venoms from juvenile and adult common tiger snake. Comp. Biochem. Physiol. 1993;106B(3):651-54.
49. Gutiérrez JM, Ávila C, Camacho Z, Lomonte B. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (Bushmaster) from Costa Rica. Toxicon. 1990;28(4):419-426.
50. Gubensek F, Sket D, Turk V, Lebez D. Fractionation of *Vipera ammoytes* venom and seasonal variation of its composition. Toxicon. 1974;12:167-71.
51. Mayr E. Populações, espécies e evolução. São Paulo: Nacional: EDUSP, 1977. 485 p.
52. Pianka ER. Comparative ecology of *Varanus* in the Great Victoria desert. Aust. J. Ecology. 1994;19:395-408.

53. Minton SA, Weinstein SA. Geographic and ontogenetic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*. 1986;24(1):71-80.
54. Rael ED, Lieb CS, Madduz N, Varela-Ramirez A, Perez J. Hemorrhagic and mojave toxins in the venoms of the offspring of two mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Com. Biochem. Physiol.* 1993;106B(3):595-600.
55. Furtado MFD, Maruyama M, Kamuguti AS, Antonio LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*. 1991;29(2):219-26.
56. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MMT, Furtado MF, Camargo ACM, Serrano SMT. Analysis of the Ontogenetic variation in the venom proteome / peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J. Prot. Res.* 2010;9:2278-91.
57. Warrel DA. Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes. *Sump. Zool. Soc. Lond.* 1997;70:189-203.
58. Kamiguti AS, Silva MV, Cardoso JLC. Desfibrinação do sangue no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical. São Paulo*. 1986;31:84-90.
59. Ribeiro LA, Jorge MT. Alteração no tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adulto e filhote. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S.Paulo*. 1989;44:143-5.
60. Chippax JP, William V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 1991;29:1279-303.
61. Brasil. Constituição. Constituição da república federativa do Brasil: atualizada até 02.01.2006. 11.ed.rev., atual. e ampl. São Paulo: Revista dos Tribunais, 2006. 315p. 1988.

62. Prefeitura de Botucatu. Secretaria de turismo e Lazer. Botucatu, Brasil; 2008. [capturado 25 set. 2008] Disponível em : www.botucatu.sp.gov.br/
63. De Biasi P, Belluomini HE, Hoge AR, Puerto G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. Mem Inst Butantan. 1976;40/41:167-72.
64. Ribeiro LAR, Jorge MT, Iversson LB. Epidemiologia do acidente por serpentes peçonhentas: estudo de casos atendidos em 1988. Revista da saúde publica, ed. 29, São Paulo, 1995.9p
65. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-54.
66. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-85.
67. Kondo H, Kondo S, Ikezawa H, Murate R, Ohsaka A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Jap J. M. Sc. Biol. 1960;13:4351.
68. Finney DJ. Probit Analysis. 3rd ed. University Press: Cambridge, 1971.
69. Yamakawa S A, Nozaki M , Hokawa A. Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema formim activities of the fractions. Animal, Plant an Microbial Toxins. New York: Plenum.1976;1.
70. Hoge AR, Belluomini HE, Fernandes W. Variação do número de placas ventrais de *Bothrops jararaca* em função dos climas (Viperidae, Crotalinae). Mem. Inst. Butantan. 1976;40/41:11-7.
71. Sazima I. Natural history of the jararaca pit viper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: Campbell, JA, Brodie, ED. Biology of the Pit vipers. Selva, Tyler, TX, 199-216, 1992.
72. Cicchi JP, Sena MA, Peccinini-Seale DM, Duarte MR. Snakes from islands of State of São Paulo, Southeastern Brazil. Biota Neotrop. 2007;7(2):14p.

73. Salomao MG, Wuster W, Thorpe RS. DNA evolution of South American pit vipers of the genus *Bothrops*. In: Thorpe RS, Wuster W, Malhotra A. Venomous Snakes: Ecology, Evolution and Snakebite. Claredon, Oxford, UK. 89-98, 1997.
74. Ribeiro LA; Jorge MT. Epidemiologia e quadros clínicos dos acidentados por serpentes *Bothrops jararaca*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1990;32:436-442.
75. Fan HW, Cardoso JL. Clinical toxicology of snakes bites in south America. In: Meier, J, White, J. Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. C.R.C., Boca Raton. 1995:668-88.
76. Furtado MFD, Travaglia-Cardoso SR, Rocha MMT. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). Toxicon. 2006;48:4010-410.
77. Soares AM, Fontes MRM, Giglio JR. Phospholipases A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. Curr. Org. Chem. 2004;8:1677-90.
78. Nahas L, Kamiguti AS, Barros MAR. Thrombin-like factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. Thromb. Haemost. 1979;41:314-28.
79. Zingali RB, Carlini CR, Francischetti IM, Guimaraes JA. *Bothrops jararaca* snake venom effects on platelet aggregation. Throm. Res. 1990;58:303-16.
80. Kamiguti AS, Sano-Martins, IS. South American snake venoms affecting haemostasis. J. Toxicol. 1995;14:359-374.
81. Cury Y, Teixeira CFP, Sudo L. Edematogenic responses induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of lymphocytes. Toxicon. 1994;32:1425-31.
82. Farsky SHP, Costa-Cruz JWM, Cury Y, Teixeira CFP. Leulocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. Toxicon. 1997;35:185-193.

83. Mandelbaum FR, Reick AP, Assakura MT. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: Ohsaka A, Hayashi K. Animal, Plant and Microbial toxins. Penum, London. 1976;111-21.
84. Assakura MT, Reichel AP, Mandelbaum FR. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). Toxicon. 1986;24:943-6.
85. Kamiguti AS, Theakston RDG, Desmond H, Hutton RA. Systemic haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. Toxicon. 1991;9:1097-1105.
86. Serrano SMT, Mauron RC. Snake venom serine proteinases; sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon. 2005;45(8):1115-32.
87. Santoro ML, Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M. Comparative analysis of newborn and adult of *Bothrops jararaca* snake venoms. Toxicon. 2010;56:1443-58.
88. Fry BG, Wuster W, Kini RM, Brusic V, Khan A, Venkataraman D, Rooney AP. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. J. Mol. Evol. 2003;57:110-29.
89. Daltry JC, Wuster W, Thorpe RS. Diet and venom evolution. Nature. 1996;379:537-40.
90. Brinkhous KM, Barnes DS, Potter JY, Read MS. Von Willebrand syndrome induced by a *Bothrops* venom factor: bioassay for venom coagglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981;78:3230-34.
91. Rael ED, Knight RA, Zepeda H. Electrophoretic variations of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venoms and migration differences of Mojave toxins. Toxicon. 1984;26(7):980-5.

92. Aird SD, Kaiser I. Comparative studies on three rattlesnake toxins. *Toxicon*. 1985;23(3):362-74.
93. Moura da Silva, AM. Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida. *Bol. Biotechnol*. 1992;3:3-7.
94. Mendonza CEC, Bhatti AR. Eletrophoretic analysis of snake venoms. *J. Chromatography*. 1992;580:355-63.
95. Tan NH, Ponndurai G. A comparative study of the biological proprieties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American Lance-Headed Viper). *Comp. Biochem. Physiol*. 1992;102B(1):103-9.
96. Fujimura Y, Ikeda Y, Miura S, Yoshida E, Shima H, Nishida S. Isolation and characterization of jararaca GPIb-Bp, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. *Thromb. Hemost*. 1995;74:743-50.
97. Kawasaki T, Fujimura Y, Usami Y, Susuki M, Miura S, Sakurai Y. Complete aminoacid sequence and identification of the platelet glycoprotein Ib-binding site of jararaca GPIb-Bp, a snake venom protein isolated from *Bothrops jararaca*. *J. Biol. Chem*. 1996;271:10635-39.
98. Fenton JW, Ofosu FA, Brezniak, DV, Hassouna HI. Thrombin and antithrombotics. *Semin. Thromb. Hemost*. 1998;24:87-91.
99. Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 1994;33:1843-9.
100. Serrano SM, Mentele R, Sampaio CA, Flink E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 1995;34:7186-93.
101. Santos BF, Serrano SM, Kuliopulos A, Niewiarowski S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors in human platelets. *FEBS Lett*. 2000;477:199-202.

102. Serrano SM, Hagiwara Y, Murayama N, Higuchi S, Mentele R, Sampaio CA. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. Eur. J. Biochem. 1998;251:845-53.
103. Gutierrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. Mem. Inst. Butantan. 1989;51:211-33.
104. Mandelbaum FR, Assakura MT. Antigenic relationship of hemorrhagic factor and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. Toxicon. 1998;26:379-85.
105. Paine MJ, Desmond HP, Theakston RDG, Crampton JM. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight haemorrhagic metalloproteinase, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. J. Biol. Chem. 1992;267:22869-79.
106. Machado LF, Laugesen S, Botelho ED, Ricart CAO, Fontes W, Barbaro KC, Roepstorff P, Souza MV. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxoscelin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. Proteomics. 2005;5(8):2167-76.
107. Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo e Dulce Helena Ferreira de Souza. Métodos em Toxinologia – toxinas de serpentes. 1ª Ed. São Carlos: EdUFSCar; 2007.
108. Kamiguti AS. Atividades coagulante, inflamatória e proteolítica dos venenos de *Bothrops jararaca* recém-nascida e adulta. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1988; 112p.
109. Saldarriaga MM, Otero R, Nuñez V, Toro MF, Diaz A, Gutiérrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. Toxicon. 2003;42:405-11.
110. Lopez-Lozano JL, de Souza MV, Ricart CA, Chávez-Orlotequi C, Flores Sanchez E, Muniz EG, Buhrnheim PF, Morhy L. Ontogenetic variation of

metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazon rain forest. *Toxicon*. 2002;40:997-1006.

111. Rosenfeld G, Hampes OG, Kelen EMA. Coagulant and fibrinolytic activity animal venoms; determination of a coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*. 1959;29:143-63.

112. Céspedes N, Castro F, Jiménez E, Montealegre L, Castellanos A, Cañas CA, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Biochemical comparison of venoms from young Colombian *Crotalus durissus cumanensis* and their parents. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2010;16(2):269-84.

113. Gutierrez JM, Ruvocado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochemistry*. 2000;82:841-50.

114. Serrano SMT, Shannon JD, Wang D, Camargo ACM, Fox JW. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics*. 2005;5:501-10.

115. Ribeiro LA, Jorge MT. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3139 casos. *Rev. Soc. Bras Med. Trop.* 1997;30:475-80.

116. Lomonte B, Gutierrez JM. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre caseína. *Rev. Biol. Trop.* 1983;31:37-40.

117. Ownby CL, Colberg TR, Odell GV. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms. Ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon*. 1984;22:227-33.

118. Gonçalves LRC. Hemorragia local induzida experimentalmente pelo veneno de serpentes *Bothrops jararaca*: participação de fatores endógenos do tecido lesado. [dissertação]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1993.

119. Chavez F, Gutierrez JM, Brenes F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*. 1992;30(9):1099-109.
120. Ferreira ML, Moura da Silva AM, França FOS, Cardoso JL, Mota I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*. 1992;30(12):1603-8.
121. Andrade DOV. Variação ontogenética do veneno em serpentes do gênero *Bothrops* (Squamata, Viperidae) Rio Claro, 1995. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista.
122. Ratanabanangkoon K. Merit and demerit of polyvalent snake antivenoms. *J Toxicol. Tox. Rev.* 2003;22:77-89.
123. Menezes MC, Furtado MFD, Travaglia-Cardoso SR, Camargo ACM, Serrano SMT. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*. 2006;47:304-12.
124. Mackessy SP, Sixberry NM, Heyborne WH, Fritts T. Venom of the brown treesnake, *Boiga irregularis*: ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. *Toxicon*. 2006;47:537-48.
125. *Uniform Requeriments for Manuscripts to Biomedical Journal"* (International Comitte of Medical Journal Editors, 2008. <http://www.icmje.org>).

10. Anexos

10.1. Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

10.2. Anexo 2: Classificação climática do Município de Botucatu.