ANDRÉ ZELANIS PALITOT PEREIRA

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE ONTOGENÉTICA DO
VENENO DE *Bothrops insularis* (Amaral, 1921)
(SERPENTES, VIPERIDAE): IMPLICAÇÕES
ADAPTATIVAS AOS ITENS ALIMENTARES**

**SÃO PAULO
2006**

ANDRÉ ZELANIS PALITOT PEREIRA

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE ONTOGENÉTICA DO
VENENO DE *Bothrops insularis* (Amaral, 1921)
(SERPENTES, VIPERIDAE): IMPLICAÇÕES
ADAPTATIVAS AOS ITENS ALIMENTARES**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências, na área de Fisiologia
Geral.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima
Domingues Furtado

**SÃO PAULO
2006**

Ficha Catalográfica

P 442a

Pereira, André Zelanis Palitot

Análise da variabilidade ontogenética do veneno de *Bothrops insularis* (Amaral, 1921): implicações adaptativas aos itens alimentares / André Zelanis Palitot Pereira. -- São Paulo : A. Z. P. P., 2006.
97. : il. + anexos

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, 2006.

1. *Bothrops insularis* 2. Venenos de serpentes
3. Ontogenia 4. Variabilidade I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento Fisiologia II. Título.

LC: QP 941.S6
QL 666.o6

Comissão Julgadora

Prof(a).Dr(a).

Prof(a).Dr(a).

Prof(a).Dr(a)

A Andréa da Luz, por você existir na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por orientar meus passos no frutífero caminho que venho trilhando.

O difícil não é lembrar de todos, mas sim conseguir expressar com palavras o auxílio tão importante de todas estas pessoas durante este projeto.

A meus pais José Arioswaldo Pereira e Suzete Zelanis da Silva, pelos ensinamentos e constante incentivo...meus maiores fãs. Amo vocês!

A minha namorada, Andréa Aparecida da Luz, companheira, fonte de inspiração, terapeuta particular e, acima de tudo, incentivadora.

Ao meu irmão Marcel Zelanis por estar sempre comigo e me ajudar sempre a colocar os pés no chão.

A minha orientadora e amiga, Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado, uma pessoa singular em todos os aspectos. Agradeço pela amizade, pelo incentivo, e pela possibilidade de poder trabalhar com um material tão raro.

Ao pesquisador Wilson Fernandes, Diretor do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela possibilidade de desenvolver este trabalho nas instalações do Laboratório de Herpetologia.

A amiga e pesquisadora Silvia Regina Travaglia Cardoso por manter e cuidar tão bem das ninhadas deste (e de outros) projeto(s), pelas extrações e pela amizade.

Aos amigos Érico Teodósio, Marlus Bueno Silva, André Liewton de Moura Germano pelos grandes momentos fora do laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Herpetologia/Venenos do Instituto Butantan pelos ótimos momentos: Laura Virgínia Pereira Narvaes, Adriana Rafael, Ana Carolina Parpinelli, Carla Pavan Manzato, Circe Albuquerque, Daniel Stuginski, Anderson Picanha Inácio, Marisa Rocha, Henrique Braz.

Ao Valdir Germano, pelo auxílio e presteza em selecionar espécimes fixados da coleção herpetológica do Instituto Butantan para as fotos e pelas extrações dos venenos nas expedições à Ilha da Queimada Grande.

Aos pesquisadores Dr. Otávio A.V. Marques e Dr. Ricardo Sawaya pelas fotos da Ilha da Queimada Grande e das serpentes na Ilha.

A pesquisadora do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi e sua aluna Janaína de Souza Ventura, pelo auxílio nos experimentos referentes à coagulação sanguínea.

Ao pesquisador Dr. Mário Sérgio Palma do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Laboratório de Biologia estrutural e Zooquímica da UNESP de Rio Claro, por me receber em seu laboratório e me auxiliar no experimento de Dose Letal média com abelhas.

A Dra. Ana Maria Moura da Silva, Dra. Beatriz Pacheco Jordão e Dr. José Carlos Freitas, pela participação na banca do meu exame de Qualificação e importantes discussões.

Ao Fábio Fernando pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Ao Sr. Zarzur pela amizade e acolhida em sua residência durante os primeiros meses de estadia em São Paulo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado (processo nº133384/2004-7).

“Ella se enrodilha, se ajeita bem junto aos fructos e, socegradamente, aguarda o amoderimento delles. Quando estes começam a lourejar, surgem os passaros em revoada, pipilando alegremente, num perfeito e suave descuido. Então a Jararaca fica alerta e, quando algum passarinho, mais incauto e esfomeado, se aproxima da manjuba, gargarejando umas notas alacres, ella, rapida e certa dá-lhes um bote, geralmente na região cervical ou thoraxica e mata-o instantaneamente, graças ao veneno activíssimo que nelle inocula sem demora.”

Afrânio do Amaral

Excursão à Ilha da Queimada Grande - Notas sobre a biologia de uma “Lachesis” ali existente. Colectanea dos Trabalhos do Instituto Butantan II: 49-55, 1927.

RESUMO

Mudanças ontogenéticas na dieta e na composição do veneno são características freqüentemente observadas em espécies do gênero *Bothrops*. A serpente *Bothrops insularis* é endêmica da Ilha da Queimada Grande, litoral Sul de São Paulo, cuja separação do continente ocorreu há aproximadamente 11 000 anos, após a última glaciação ao final do Pleistoceno. Não existem mamíferos na ilha e esta espécie alimenta-se, na fase juvenil, de animais ectotérmicos (artrópodes e anfíbios) e de endotérmicos (aves migratórias) na fase adulta. A população apresenta anormalidades sexuais evidenciadas por machos, fêmeas e intersexos (fêmeas que apresentam hemipênis rudimentares, porém não funcionais). Três filhotes de *B. insularis* (1 macho e 2 intersexos) nascidos em cativeiro, de uma fêmea intersexo, foram mantidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, seus venenos extraídos (idades de 10, 15, 20, 24,33 e 41 meses) e liofilizados para utilização em ensaios subseqüentes. Utilizou-se também o veneno da mãe da ninhada e um *pool* de venenos de exemplares adultos.

A análise eletroforética (SDS-PAGE 7,5- 17,5%) evidenciou similaridades entre as amostras de venenos nas diferentes fases de vida dos animais. A análise densitométrica revelou um aumento pronunciado da expressão de uma banda protéica na faixa de massa molecular de 24kDa. O teor protéico dos venenos variou de 618 a 1189 μg de proteína por mg de veneno. Os resultados experimentais sugerem que fosfolipases A_2 e hialuronidases não têm expressão pronunciada na fase adulta dos animais (41 meses).

Os venenos foram capazes de hidrolisar as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio e promover áreas de lise em placa de fibrina, independentemente da idade analisada. O progressivo aumento de intensidade da atividade hemorrágica e proteólise em zimografia sugere uma regulação da expressão de proteases, sobretudo de metaloproteases (uma característica importante, uma vez que esta espécie apresenta uma alteração ontogenética de dieta, alimentando-se de presas maiores quando os animais se tornam adultos). Por outro lado, a atividade

proteolítica sobre a caseína não apresentou um aumento ontogenético significativo. Ensaio com inibidores de proteases, mostraram que EDTA e ortofenantrolina (10 mM) diminuíram expressivamente a atividade gelatinolítica em zimografia, reduziram a área de lise em placa de fibrina e inibiram a clivagem das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio. Os venenos dos animais jovens (15 meses) mostraram-se mais ativos nos ensaios de coagulação sanguínea (Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma e ativação dos fatores X e II da cascata de coagulação sanguínea) em relação ao dos adultos (41 meses). Observou-se uma maior toxicidade dos venenos para abelhas e aves, contudo não foi possível estabelecer diretamente uma relação ontogenética. Para mamíferos (camundongos) os venenos do Intersexo 1 e do Macho (41 meses) apresentaram menores valores de DL_{50} em relação aos demais. A miotoxicidade das amostras dos venenos mostrou-se acentuada na fase inicial de vida dos animais (15 meses). Foram evidenciadas variações individuais ao longo das análises efetuadas neste trabalho, contudo a variabilidade ontogenética mostrou-se presente na maioria dos ensaios realizados. A seletividade do veneno para presas locais foi demonstrada pela eficácia do veneno para artrópodes e aves, em detrimento a mamíferos.

Desta forma, conclui-se que o veneno possui peculiaridades na sua composição que favorecem a alimentação desta serpente em seu habitat insular e, embora haja uma marcante alteração de dieta durante a ontogênese desta espécie, a toxicidade do veneno para os itens alimentares locais é uma característica presente durante toda a vida dos animais.

ABSTRACT

Ontogenetic changes on diet and venom composition are a common feature among *Bothrops* species. *Bothrops insularis* is an endemic snake of Queimada Grande Island, South coast of São Paulo State, which mainland separation has occurred for about 11 000 years ago, after the last glaciation, at late Pleistocene.

There are no mammals on the Island and *B. insularis* feed on ectothermic preys when young (arthropods and amphibians) and endothermic (migratory birds) when becomes adult. Sexual abnormalities are often verified on *B. insularis* population with males, females and intersexes existence (females with non-functional rudimentary hemypenis). Three *B. insularis* siblings (1 male and 2 intersexes) borned on captivity, from an Intersex female, were kept in Herpetology Laboratory on Instituto Butantan. Venoms were extracted (10, 15, 20, 24, 33 and 41 months of animal's age) and lyophilized for subsequent assays. Offspring's mother venom and a pool of *B. insularis* adult venoms were also analyzed as a comparison parameter.

Electrophoretic profiles (SDS-PAGE 7,5- 17,5%) showed similar patterns among samples at distinct animal's ages. Densitometric analysis showed increase of expression of proteic band at 24 kDa of molecular mass range. Protein content varies of 618 up to 1189 µg of protein per mg of venom. Experimental results suggests that phospholipases A₂ and hyaluronidases do not have an increase on its expression on adult phase (41 months) of *B. insularis*.

Venoms were able to hydrolyze A α and B β fibrinogen chains and to promote lysis on fibrin plate, regardless of animal's age. The increase of haemorrhagic activity and proteolysis on zymography profiles, suggests a regulation of protease expression, mainly of metalloproteases (an important characteristic, since this species has an ontogenetic shift on its diet, feeding on larger preys when becomes adult). On the other hand, proteolytic activity upon casein did not show significative ontogenetic variability. Protease inhibitors assays showed that EDTA and orthophenanthroline (10 mM) expressively reduced gelatinolytic activity on

zimography, fibrin plate lysis area, and were able to prevent A α and B β fibrinogen chains cleavage. Venoms from young animals (15 months) had higher coagulant activity than adult ones (Minimum Coagulant Dose upon human Plasma and activation of blood coagulation cascade factors X and II). Venom toxicity was higher for bees (just-emerged *Apis mellifera*) and chicks (one day age Bovans white chicks), although a direct relation with ontogeny was not established. Intersex 1 and male venoms (41 months) showed the lower LD₅₀ values for mammals (mice). Prominent myotoxicity was found for young venoms (15 months). Experimental results showed individual variability, and, mainly, a conspicuous ontogenetic variability. Venom selectivity towards local preys was demonstrated by the expressive toxicity upon arthropods and chicks, in comparison to mammals.

Our results show that *Bothrops insularis* venom had peculiarities on its composition that support snake's diet on its insular habitat and, although a clearly ontogenetic diet change occurs on this species, venom toxicity towards local preys is a characteristic present during all lifetime of this species.

SUMÁRIO DE FIGURAS.....	ii
SUMÁRIO DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Posição geográfica da Ilha da Queimada Grande no litoral de São Paulo.

Figura 2: Serpente *Bothrops insularis*.

Figura 3: Itens alimentares da *Bothrops insularis* na Ilha da Queimada Grande.

Figura 4: Exemplar intersexo de *Bothrops insularis*.

Figura 5: *Bothrops insularis* - aspectos biológicos e evolutivos.

Figura 6: Crescimento dos animais.

Figura 7: Produção de veneno dos exemplares de *B.insularis* durante a sua ontogênese.

Figura 8: Teor protéico dos venenos de *B.insularis*.

Figura 9: Perfil protéico dos venenos analisado em SDS-PAGE (7,5-17,5%) sob condições não redutoras.

Figura 10: Perfil protéico dos venenos coletados “*in situ*” analisado em SDS-PAGE (7,5-17,5%) sob condições redutoras.

Figura 11: Perfil protéico (SDS-PAGE 7,5-17,5% sob condições redutoras) do veneno do Intersexo 1 e análise densitométrica.

Figura 12: Perfil protéico (SDS-PAGE 7,5-17,5% sob condições redutoras) do veneno do Intersexo 2 e análise densitométrica.

Figura 13: Perfil protéico (SDS-PAGE 7,5-17,5% sob condições redutoras) do veneno do Macho e análise densitométrica.

Figura 14: Atividade gelatinolítica e avaliação da presença de metalo e serinoproteases no veneno do Intersexo 1 em zimografia em SDS-PAGE (10%).

Figura 15: Atividade gelatinolítica e avaliação da presença de metalo e serinoproteases no veneno do Intersexo 2 em zimografia em SDS-PAGE (10%).

Figura 16: Atividade gelatinolítica e avaliação da presença de metalo e serinoproteases no veneno do Macho em zimografia em SDS-PAGE (10%).

Figura 17: Atividade gelatinolítica e avaliação da presença de metalo e serinoproteases no veneno do pool de *B. insularis* e da mãe da ninhada em zimografia em SDS-PAGE (10%).

Figura 18: Atividade proteolítica dos venenos de *B.insularis* sobre a caseína.

Figura 19: Atividade fosfolipásica dos venenos de *B.insularis*.

Figura 20: Atividade hialuronidásica dos venenos de *B.insularis*.

Figura 21: Atividade coagulante sobre o plasma dos venenos de *B.insularis*.

Figura 22: Perfil de degradação do fibrinogênio em SDS-PAGE (10%) pelos venenos de *B.insularis*.

Figura 23: Ativação do fator II pelos venenos de *B.insularis*.

Figura 24: Atividade amidolítica dos venenos de *B.insularis* sobre o substrato cromogênico S-2238.

Figura 25: Ativação do Fator X pelos venenos de *B.insularis*.

Figura 26: Atividade tipo-trombina dos venenos de *B.insularis*.

Figura 27: Atividade hemorrágica (Dose Mínima Hemorrágica) dos venenos de *B.insularis*.

Figura 28: Atividade miotóxica dos venenos de *B.insularis* (quantificação de creatina-quinase plasmática).

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1: Teor protéico dos venenos analisados em diferentes fases da ontogênese dos animais.

Tabela 2: Comparações (teste de Tukey) da atividade caseinolítica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Tabela 3: Comparações (teste de Tukey) da atividade fosfolipásica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Tabela 4: Comparações (teste de Tukey) da atividade hialuronidásica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Tabela 5: Atividade coagulante dos venenos de *B.insularis* sobre plasma humano citratado.

Tabela 6: Comparações (teste de Tukey) da Atividade coagulante dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Tabela 7: Atividade fibrinolítica dos venenos de *B.insularis* avaliada em duas fases de vida dos animais.

Tabela 8: Atividade tipo-trombina dos venenos em duas fases (15 e 41 meses) de vida dos animais.

Tabela 9: Comparações (teste de Tukey) da atividade tipo-trombina dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Tabela 10: Atividade hemorrágica (Dose Mínima Hemorrágica) dos venenos de *B.insularis*.

Tabela 11: Comparações (teste de Tukey) da atividade hemorrágica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Tabela 12: Comparações (teste de Tukey) da atividade miotóxica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Tabela 13: Dose Letal média (DL_{50}) dos venenos de *B. insularis* em diferentes modelos experimentais.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: Absorbância
CaCl₂: Cloreto de Cálcio
cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar
CK: Enzima creatino-quinase
Cu²⁺: íon cobre
D: Ácido aspártico
DL₅₀: Dose letal média
EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético
ESTs: *Expressed Sequence Tags* (marcadores de seqüências expressas)
Fg: Fibrinogênio
FII: Fator II / Protrombina
FIIa: Fator II ativado / trombina
FX: Fator X / Fator de Stuart
FXa: Fator X ativado
K: Lisina
kDa: Kilodáton
λ: lâmbda (comprimento de onda)
mA: miliampéres
nm: nanômetros
NaCl: cloreto de sódio
PLA₂: *Phospholipase A₂* (fosfolipase A₂)
pNa: Para-nitroanilina
PMSF: Fluoreto de fenil metil sulfonila
Rf: *Relative mobility* (mobilidade relativa)
RGD: Arginina-Glicina- Ácido aspártico
rpm: Rotações por minuto
SDS-PAGE: *Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
(Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio)
TCA: Ácido tricloroacético
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano
UA: Unidade arbitrárias
VEGF: *Vascular Endothelium Growth Factor* (fator de crescimento do endotélio vascular)
V: Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Veneno de serpentes: um produto biológico.....	1
1.2 A variabilidade em venenos ofídicos: aspectos biológicos	5
1.3 Ilhas	8
1.4 A Ilha da Queimada Grande	9
1.5 A serpente <i>Bothrops insularis</i> e suas peculiaridades	11
1.5.1 O veneno da <i>Bothrops insularis</i>	15
1.5.2 <i>Bothrops insularis</i> e o isolamento geográfico	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 <i>Material</i>	20
3.1.1 Serpentes - Criação e manutenção	20
3.1.2 Obtenção das amostras de veneno	20
3.2 <i>Métodos</i>	21
3.2.1 <i>Caracterização bioquímica dos venenos</i>	21
3.2.1.1 Dosagem Protéica	21
3.2.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	21
3.2.1.3 Análise densitométrica dos perfis protéicos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	22
3.2.1.4 Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS	23
3.2.1.5 Atividade proteolítica sobre a caseína	24
3.2.1.6 Atividade fosfolipásica	24
3.2.1.7 Atividade hialuronidásica	25
3.2.1.8 Dose mínima Coagulante sobre o Plasma (DMC-P)	26

3.2.1.9 Atividade proteolítica em placa de fibrina	26
3.2.1.10 Perfil de degradação de fibrinogênio em gel de poliacrilamida	27
3.2.1.11 Ativação da protrombina (Fator II)	27
3.2.1.12 Ativação do Fator X	28
3.2.1.13 Atividade tipo-trombina	28
3.2.2 Caracterização das atividades biológicas dos venenos.....	29
3.2.2.1 Atividade hemorrágica	29
3.2.2.2 Atividade miotóxica – Quantificação plasmática da enzima creatina-quinase	29
3.2.2.3 Dose letal média (DL ₅₀)	30
3.2.2.4 Determinação da dose letal média (DL ₅₀) em modelos experimentais alternativos	30
3.2.3 Análise estatística dos resultados.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Dados biométricos de crescimento e produção de veneno	32
4.2 Caracterização bioquímica dos venenos	34
4.2.1. Teor protéico	34
4.2.2 Perfil protéico analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
4.2.3 Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS.....	42
4.2.4 Atividade proteolítica sobre a caseína.....	44
4.2.5 Atividade fosfolipásica.....	47
4.2.6 Atividade hialuronidásica.....	49
4.2.7. Atividade coagulante – Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma (DMC-P)	52
4.2.8. Atividade fibrinolítica – Placa de fibrina.....	54
4.2.9 Perfil de degradação de fibrinogênio em gel de poliacrilamida	55
4.2.10 Ativação da protrombina (Fator II).....	58
4.2.11 Ativação do Fator X.....	60

4.2.12. Atividade tipo-trombina.....	61
4.3 Caracterização das atividades biológicas dos venenos.....	63
4.3.1 Atividade Hemorrágica –Dose Mínima Hemorrágica (DMH)	63
4.3.2 Atividade Miotóxica – Quantificação plasmática da enzima creatina- quinase (CK)	66
4.3.3 Dose Letal média (DL ₅₀).....	68
5. DISCUSSÃO.....	71
5.1 Aspectos gerais do desenvolvimento e da variabilidade ontogenética do veneno de <i>Bothrops insularis</i>	71
5.2 Dimorfismo sexual no veneno de <i>B.insularis</i> ?	79
5.3 Relação Adaptação x Dieta	80
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Veneno de serpentes: um produto biológico

A glândula de veneno é um epitélio extremamente especializado na produção, estocagem e secreção de um produto cuja composição principal são proteínas (aproximadamente 90% do peso seco dos venenos), que desempenham as mais variadas atividades biológicas (Gans e Elliot, 1968; Kochva, 1978; Kochva et al.1983; Yamanoue et al.1997). Os venenos têm um importante papel fisiológico para as serpentes: inicia e auxilia a digestão de uma presa “não triturada”; constitui um mecanismo de defesa contra predadores/agressores e é o fator responsável pela subjugação das presas, sendo de vital importância para estes animais (Gans e Elliot, 1968; Thomas e Pough,1979; Mackessy, 1993). Acredita-se que a glândula de veneno nas serpentes representa uma modificação de glândulas salivares e o aparecimento e desenvolvimento de um aparato venenífero é um fator crucial na radiação adaptativa e conseqüente sucesso ecológico das serpentes (Kochva et al.1983; Thomas e Pough, 1979). Fry *et al* (2005) estima que o aparato venenífero surgiu pela primeira vez há cerca de 200 milhões de anos na evolução dos Squamata, constituindo o principal fator norteador da diversidade ecológica em serpentes e lagartos.

Dentre as famílias de serpentes conhecidas atualmente, a família Viperidae abriga espécies que possuem um alto grau de especialização no aparato venenífero, caracterizado pela presença de complexos sistemas de produção e armazenamento de veneno, bem como por modificações morfológicas importantes, como: uma musculatura cefálica bem desenvolvida, sobretudo próxima às glândulas de veneno, além de dentes móveis e canaliculados, implantados na parte anterior do maxilar móvel, que permite a ereção das presas para frente no momento do bote (Gans, 1968; Thomas e Pough, 1979; Kochva, 1987).

Entre os componentes mais expressivos presentes nos venenos das serpentes pertencentes à família Viperidae estão: as metaloproteases, serinoproteases, disintegrinas, fosfolipases A₂ (PLA2) e lectinas tipo C.

Metaloproteases

As metaloproteases são componentes abundantes em venenos de viperídeos e têm como principal característica a presença de um íon inorgânico (geralmente zinco) associado a um motivo estrutural altamente conservado (Hite et al.1994; Bjarnason e Fox, 1995; Serrano e Fox, 2005). Estas enzimas são também chamadas de hemorraginas e estão envolvidas em diversos processos decorrentes do envenenamento como: dermonecrose, degradação de fatores de coagulação, inibição de agregação plaquetária, edema, degradação de componentes da matriz extracelular e hemorragia (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez et al.2005; Serrano e Fox, 2005). As metaloproteases são expressas na glândula na forma de zimógenos e apresentam uma seqüência de domínios que, após sofrerem um processamento pós-traducional, podem ser divididas em quatro classes: **Classe P-I:** enzimas de massa molecular entre 20 e 30 kDa, que apresentam apenas um domínio catalítico (protease); **Classe P-II:** enzimas de massa molecular de cerca de 30 a 50 kDa que, além do domínio catalítico, apresentam um domínio disintegrina. Nesta classe geralmente há uma autocatálise que leva ao processamento da metaloprotease PII em uma PI e uma disintegrina. **Classe P-III:** são enzimas que apresentam intensa atividade hemorrágica nos venenos. Estruturalmente apresentam o domínio catalítico, disintegrina e um terceiro domínio, rico em cisteínas. Apresentam massa molecular variando entre 50 a 80 kDa. **Classe P-IV:** são proteases de alta massa molecular (entre 80 e 100 kDa) que apresentam, além dos 3 domínios anteriores, dois domínios tipo-lectina ligados por pontes dissulfeto (Hite et al.1994; Bjarnason e Fox, 1995; Serrano e Fox, 2005).

Serinoproteases

As serinoproteases presentes em veneno de serpentes estão freqüentemente associadas a distúrbios hemostáticos, atuando sobre uma variedade de substratos, como componentes da cascata de coagulação sanguínea e sistema fibrinolítico. Estas enzimas apresentam massa molecular variando entre 26 e 67 kDa, dependendo do teor de glicosilações (Serrano e Maroun, 2005). Estruturalmente apresentam grande homologia com outras serinoproteases como a tripsina, um variável nível de glicosilações e um sítio ativo que compreende a tríade catalítica: Histidina, Ácido aspártico e Serina (Barret e Rawlings, 1995).

Disintegrinas

As disintegrinas são proteínas não enzimáticas que apresentam baixa massa molecular e um motivo estrutural típico composto pela seqüência Arginina, Glicina e Ácido Aspártico (seqüência RGD) que “mimetiza” a seqüência RGD presente em algumas moléculas que interagem com integrinas plaquetárias como, por exemplo, o fibrinogênio (Calvete et al. 2005). Desta forma, as disintegrinas têm a capacidade de inibir a agregação plaquetária. Estas proteínas são geralmente oriundas do processamento de metaloproteases da classe PII, embora recentemente tenham sido encontradas seqüências de cDNA codificantes apenas para disintegrinas (Okuda et al. 2002).

Fosfolipases A₂(PLA₂)

As fosfolipases são enzimas estereolíticas que hidrolisam fosfolípidos e estão presentes tanto em tecidos e secreções pancreáticas de mamíferos, quanto em venenos animais (Kini, 1997). Estas enzimas desempenham importantes funções em diversos processos fisiológicos como na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, reparo de membrana, e no auxílio a digestão. São divididas em várias classes, denominadas A₁, A₂, B, C e D, dependendo do sítio

de hidrólise na cadeia carbônica dos fosfolipídeos. As fosfolipases do tipo A₂ (PLA₂) são ainda divididas em duas classes: citosólicas ou secretadas. As PLA₂ dos venenos de serpentes pertencem a esta última classe. Estas enzimas hidrolisam a cadeia carbônica dos fosfolipídeos na posição do carbono 2. A consequência desta hidrólise é a liberação de ácidos graxos e lisofosfolípides. As PLA₂ são responsáveis por diversos efeitos farmacológicos, como formação de araquidonato, desestruturação de membrana, interferência na agregação plaquetária, miotoxicidade, neurotoxicidade, entre outras ações (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Kini, 1997). Estruturalmente as PLA₂ de venenos de serpentes podem ser divididas em dois grupos: **I** - PLA₂ isoladas dos venenos de serpentes da família Elapidae e **II** - PLA₂ dos venenos de viperídeos, cuja estrutura apresenta uma disposição de pontes dissulfeto semelhante àquela verificada em PLA₂ não-pancreáticas de mamíferos (Kini, 1997). Por fim, o grupo II é ainda subdividido em II-A e II-B. O primeiro grupo compreende as PLA₂ com um resíduo de ácido aspártico na posição 49 (PLA₂ D-49) e o segundo apresenta este resíduo substituído por uma lisina na mesma posição (PLA₂ K-49). O resíduo de ácido aspártico na posição 49 coordena a ligação com íons cálcio, um importante co-fator para a catálise. Nas PLA₂ K-49 a atividade catalítica é drasticamente reduzida ou ausente, por outro lado estas enzimas apresentam uma importante atividade miotóxica (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Arni e Ward, 1996; Kini, 1997).

Lectinas tipo C

As lectinas tipo C têm esta designação por pertencerem a uma família de lectinas que requerem íons cálcio para sua interação com glicoconjugados. Estas moléculas apresentam uma conformação típica em sua estrutura (um *loop*) cujos resíduos coordenam a ligação com íons cálcio (Drikamer, 1988). A maioria das lectinas encontrada em venenos de serpentes não apresenta o *loop* de ligação com o cálcio e nem todas se ligam a carboidratos (Clemetson et al. 2001). Geralmente as lectinas tipo C são diméricas, apresentando massa molecular aproximada de 30 kDa. Estas proteínas estão envolvidas principalmente nas alterações de processos hemostáticos decorrentes do envenenamento,

interagindo principalmente com receptores plaquetários e/ou fatores de da cascata de coagulação sanguínea (Zingali et al. 2001)

1.2 A variabilidade em venenos ofídicos: aspectos biológicos

A variabilidade na composição e atividades dos venenos ofídicos é relatada em diversos trabalhos e pode ser observada em vários níveis, tais como: ontogenético, sexual, geográfico, inter e intra-específico (Chippaux et al.1991). Neste contexto, a dieta dos animais tem um papel de extrema importância, uma vez que a subjugação de presas é uma das principais funções dos venenos (Gans e Elliot, 1968; Thomas e Pough,1979; Kochva et al.1983; Mackessy, 1993; Daltry et al.1996). A variabilidade em venenos tem implicações também na terapêutica dos acidentes. Ribeiro e Jorge (1989) e Kamiguti et al. (1986) relataram alterações no tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por filhotes e adultos de serpentes *Bothrops jararaca*. Warrel (1997) contrasta a variabilidade verificada nos venenos com a terapêutica dos acidentes e relata diferenças em quadros clínicos de pacientes picados por serpentes de diferentes idades.

Alterações ontogenéticas nos venenos estão presente na maioria das pesquisas que versam sobre variabilidade (Minton e Weinstein, 1986; Gutiérrez et al.1990; Gutiérrez et al. 1991; Chaves et al.1992; Mackessy, 1993; Tan et al.1993; Andrade e Abe, 1999; López-Lozano et al.2002; Saravia et al.2002; Mackessy et al. 2003; Saldarriaga et al. 2003; Daltry et al.1997; Andrade e Abe, 1999; López-Lozano et al. 2002; Mackessy et al. 2003) e as suas implicações permitem a elaboração das mais diversas hipóteses que, além de contribuírem para o entendimento da diversidade e complexidade dos venenos, constituem ferramentas importantes para estudos sobre a biologia das espécies estudadas.

Tan et al. (1993) constataram diferenças qualitativas nos perfis protéicos, analisados por eletroforese, de amostras de venenos de jovens e adultos de *Notechis scutatus*. Por outro lado, estes autores observaram similaridades nas atividades bioquímicas dos venenos tanto dos jovens quanto dos adultos, característica atribuída pelos autores a uma dieta generalista destes animais tanto

na fase jovem quanto adulta. Minton e Wistein (1986) observaram um aumento das atividades hemorrágica e proteolítica no veneno de *Crotalus atrox* conforme um aumento de idade dos animais. Furtado e et al. (1991), em análise das ações dos venenos de nove espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, constataram expressivas alterações ontogenéticas em atividades letais, enzimáticas (amidolítica e caseinolítica) e sobre a cascata de coagulação. Neste estudo, uma característica comum ao veneno dos filhotes foi a intensa capacidade de interferir em processos hemostáticos, como na ativação dos Fatores X e II da cascata de coagulação sanguínea e uma maior atividade coagulante sobre o plasma.

Mackessy (1993) observou expressivas alterações em proteases fibrinogenolíticas presentes no veneno de exemplares juvenis e adultos de *Crotalus viridis oreganus*, correlacionando as diferenças encontradas com possíveis alterações na dieta dos animais. Gutiérrez et al. (1990) reportaram a variação ontogenética em algumas atividades biológicas e bioquímicas do veneno de *Lachesis muta stenophrys*, sobretudo com relação a letalidade e atividade proteolítica, que se mostraram mais intensas no veneno dos animais adultos. Em análise da expressão de miotoxinas em venenos de jovens e adultos de *Bothrops asper*, Lomonte e Carmona (1992) observaram que apenas os venenos dos exemplares adultos apresentavam miotoxinas, fato corroborado por Chaves et al. (1992), que relatam atividade miotóxica apenas nos venenos dos adultos desta espécie.

Utilizando diferentes modelos experimentais (camundongos e rãs) Andrade e Abe (1999) demonstraram uma relação entre dieta e ontogenia em venenos de duas espécies de *Bothrops*: *B.alternatus*, uma serpente especialista, que tem a sua alimentação constituída exclusivamente por mamíferos durante toda sua vida (Martins et al. 2002) e *B. jararaca*, uma espécie generalista, que tem uma variação ontogenética de dieta durante sua vida, se alimentando principalmente de animais endotérmicos na fase adulta (Martins et al. 2002). Neste trabalho os autores conseguiram estabelecer uma correlação entre a letalidade do veneno e o tipo de dieta apresentado por estas duas espécies durante sua ontogênese.

Minton e Weinstein (1986), em análise da variabilidade geográfica do veneno de *Crotalus atrox* de diversas localidades do sudoeste norte-americano, reportaram a presença da toxina Mojave (uma fosfolipase A₂ neurotóxica) em regiões onde *Crotalus atrox* e *Crotalus scutulatus scutulatus* são simpátricas (a espécie *Crotalus scutulatus scutulatus* apresenta a toxina Mojave como um dos componentes majoritários do veneno). Neste trabalho, os autores formularam duas possíveis hipóteses para explicar o fato: (a) a toxina Mojave teria sido comum ao ancestral destas duas espécies de cascavéis norte-americanas (*C. atrox* e *C. s. scutulatus*) e pressões seletivas foram responsáveis por mantê-la em *C. s. scutulatus* e eliminá-la em *C. atrox* ou (b) uma troca genética (*inter-breeding*) entre as duas espécies em áreas em que elas ocorrem em simpatria.

Rael et al. (1993) propuseram as mesmas hipóteses para explicar a variabilidade geográfica no veneno de espécimes de *Crotalus scutulatus scutulatus*. Estes autores observaram três “tipos” de venenos possíveis para esta espécie: o *veneno A* caracterizado pela presença da toxina Mojave (uma fosfolipase A₂ neurotóxica), mas 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.

Rafael (2005), em análise do veneno de espécimes de *Bothrops jararacussu* provenientes de diferentes localidades de sua distribuição geográfica, constatou expressivas diferenças em atividades biológicas dos venenos desta espécie, como miotoxidade e hemorragia em camundongos, bem como no padrão de reconhecimento de metaloproteases da classe P-III e fosfolipases A₂ miotóxicas por anticorpos monoclonais produzidos contra estas duas enzimas (MAJar 3 e 7C9, respectivamente).

Daltry et al.(1996), trabalhando com o veneno de espécimes continentais e insulares da serpente *Calloselasma rhodostoma*, observaram variações nos perfis protéicos (analisados por focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida), uma característica que, segundo os autores, estaria intrinsecamente relacionada com a variação de dieta das serpentes nas diversas localidades analisadas. Williams et al.

(1988) reportaram variabilidade no perfil protéico de populações insulares de serpentes australianas (*Notechis ater niger* e *Notechis scutatus*) que, conforme os autores, estaria predominantemente relacionada com o tempo de isolamento das populações.

1.3 Ilhas

Ambientes insulares são, sem dúvida alguma, uma das fontes mais importantes para estudos evolutivos, além de possuir em sua fauna, flora e aspectos geomorfológicos, características que merecem especial atenção, por fornecerem indícios dos eventos geológicos e climáticos ocorridos em tempos pretéritos. Os dados obtidos em pesquisas realizadas em ilhas permitem traçar estimativas acerca de diversos aspectos biológicos e geológicos ocorridos, além de favorecer o planejamento de estratégias conservacionistas adequadas à dinâmica dos ambientes insulares (São Paulo, 1989). A gênese de ilhas é diversificada, contudo no litoral brasileiro ela está atrelada a um dos principais eventos geológicos ocorridos no período Quaternário: o final da última glaciação há aproximadamente 11 000 anos atrás, no final da época do Pleistoceno (Bennett e Glasser, 1996; Suguio et al.1985; Suguio e Sallun, 2004).

As glaciações foram períodos em que massas de gelo se formaram sob porções continentais tanto no Hemisfério Norte quanto no Sul e os períodos que compreenderam estes eventos são denominados *períodos glaciais* (Bennett e Glasser, 1996). Estima-se que o eixo de rotação da terra tenha oscilado diversas vezes durante os períodos geológicos, o que teria causado uma distribuição desigual da radiação solar em diferentes regiões do globo, sendo esta uma das principais causas das glaciações (Bennett e Glasser, 1996; Suguio et al.1985). Os eventos subseqüentes aos períodos glaciais têm implicações diretas em diversos aspectos geomorfológicos, entre eles, as flutuações do nível do mar. As transgressões oceânicas - períodos em que o nível relativo do mar avançou sobre porções continentais – são, entre outros fatores, resultado das deglaciações (derretimento das calotas de gelo continental). Durante este processo, as flutuações do nível relativo do mar foram responsáveis pela submersão de

porções continentais, processo que deu origem a diversas ilhas do litoral brasileiro (Suguio et al. 1985; Suguio e Sallun, 2004).

1.4 A Ilha da Queimada Grande

A Ilha da Queimada Grande (24° 30' S, 43° 42' W) está situada a aproximadamente 33 quilômetros do município de Itanhaém, litoral Sul de São Paulo (Figura 1) e é considerada Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) pelo Decreto Federal nº 91.887 de 5/11/1985, pertencendo a Área de Proteção Ambiental (APA) de Cananéia-Iguape-Peruíbe (Decreto Federal nº 90.347 de 23/10/1984). O acesso é restrito à marinha, ao IBAMA e a pesquisadores com autorização fornecida por estes dois órgãos. Assim como ocorreu em outras ilhas do litoral Sul e Sudeste brasileiro, estima-se que a Ilha da Queimada Grande tenha sido separada do continente no final do Pleistoceno, há 11 000 anos atrás, no fim da última glaciação, quando o derretimento das calotas de gelo continental ocasionou transgressões oceânicas e provocou a submersão de porções continentais (Vanzolini, 1973).

A Ilha da Queimada Grande é rochosa e escarpada, e possui uma área total de aproximadamente 430 000 m², com 1500 metros de comprimento, 500 de largura, altitude máxima a 200 m, sem praias arenosas e de difícil acesso quando o mar está revolto (Amaral, 1921; Hoge et al. 1959; Vanzolini, 1973; Duarte et al. 1995). Não há habitantes, porém na década de 1920 faroleiros realizavam a manutenção de um farol da Marinha brasileira instalado na ilha e, para tanto, moravam na ilha (Amaral, 1921). Além do farol, outros indícios de presença antrópica são áreas desmatadas, de capinzal, que outrora serviram para o plantio de subsistência dos faroleiros (Duarte, 1999). Acredita-se também que o nome Queimada Grande seja atribuído pelo fato de embarcações que por ali passaram terem ateado fogo em algumas áreas, com medo da elevada densidade de serpentes que lá existem e no intuito de ocupar a ilha (Duarte, 1999).

O clima é tropical úmido, com temperaturas acima dos 22 °C nos meses quentes e abaixo de 18 °C nos meses frios (Campos e Filho, 1966; Vanzolini, 1973; Duarte et al. 1995). A flora é composta predominantemente de espécies

comuns a mata atlântica, sendo em sua maior parte arbustos, áreas de capinzal e árvores de pequeno porte (Hoge et al. 1959; Campos e Filho, 1966; Duarte et al. 1995). Um fato interessante é a ausência de mamíferos na ilha (Duarte et al. 1995).

Figura 1: Mapa com a posição geográfica da Ilha da Queimada Grande (24°30'S 43°42'W). Escala - 1cm = 5 Km (Reproduzido de *Ilhas do Litoral Paulista*, Governo do estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente). Parte inferior - Foto aérea da Ilha (Foto: Otavio Marques).

Não se observa uma grande diversidade em sua fauna, que compreende algumas espécies de artrópodes, anfíbios, répteis e, em sua maioria, aves (Amaral, 1927; Hoge et al. 1959; Campos e Filho, 1966; Duarte et al. 1995). A Ilha

da Queimada Grande, bem como outras ilhas do litoral paulista, são exemplos de ambientes que vêm sendo constantemente alvos de estudos herpetofaunísticos que têm contribuído sobremaneira na elaboração de medidas conservacionistas com efeito para os ambientes insulares de uma forma geral (Amaral, 1921; Luderwaldt e Fonseca, 1923; Amaral 1927; Hoge, 1946; Hoge et al.1959; Campos e Filho 1966; Duarte et al.1995; Marques et al. 2002).

1.5 A serpente *Bothrops insularis* e suas peculiaridades

Há cerca de 90 anos atrás, o pesquisador João Florêncio Gomes, da “Secção de Ofiologia” do Instituto Butantan, estudava alguns exemplares de serpentes pertencentes ao gênero *Lachesis* na tentativa de posicioná-las sistematicamente entre as espécies de viperídeos conhecidas até então, porém faleceu antes de elucidar esta questão (Amaral, 1927). Alguns exemplares provenientes da Ilha da Queimada Grande foram primeiramente identificados por João Florêncio Gomes como *Lachesis lanceolatus* (nome científico dado a *Bothrops jararaca* na época), contudo, mais tarde, Afrânio do Amaral constatou que se tratavam de uma nova espécie, sendo então descritos como *Lachesis insularis* (Amaral, 1921; Amaral, 1927) e, posteriormente, agrupados ao gênero *Bothrops* (Amaral, 1929).

Após retornar de uma excursão à Ilha da Queimada Grande, Afrânio do Amaral havia coletado diversos exemplares com o intuito a descrever esta nova espécie, bem como alguns aspectos de sua biologia (Amaral, 1921; Amaral, 1927). Diferente de outras *Lachesis* até então conhecidas, a espécie insular apresentava características bastante singulares: uma elevada densidade populacional, alimentação composta por aves, cabeça muito larga na região temporal (uma característica de espécies que se alimentam de aves), focinho relativamente curto e estreito, corpo delgado e achatado lateralmente, cauda ligeiramente preênsil (um padrão freqüente em serpentes arborícolas), a coloração pardo-amarelada (que confere ao animal uma certa camuflagem em meio a vegetação) e, embora esta espécie apresente a pupila vertical, uma característica

relacionada com hábitos noturnos, Amaral havia constatado espécimes em atividade durante o dia (Amaral 1921; Amaral 1927).

A observação de exemplares sob a copa das árvores e no solo levou Afrânio do Amaral a atribuir o hábito semi-arborícola a esta espécie. Em ensaios realizados com o veneno desta espécie, Amaral notara a expressiva toxicidade frente ao modelo experimental utilizado na época, o pombo (Amaral 1921; Amaral 1927). Esta interessante propriedade do veneno foi atribuída ao hábito alimentar desta espécie e, por este motivo a serpente *Bothrops insularis* ainda detém o título de “uma das espécies mais venenosas do mundo”, característica bastante arraigada entre os herpetólogos e o público leigo do mundo inteiro.

A

B

Figura 2: Hábito semi-arborícola verificado em *B.insularis*. (A) exemplar em galho de árvore e (B) exemplar no solo. (Fotos: Ricardo Sawaya e Silvia R.T. Cardoso, respectivamente).

Ao contrário do que acreditava Afrânio do Amaral a dieta de *B.insularis* não é constituída apenas de aves. Estudos relacionando filogenia e hábitos alimentares de viperídeos neotropicais demonstram que *B.insularis* possui uma expressiva mudança ontogenética em sua dieta, com os indivíduos jovens alimentando-se de animais ectotérmicos (artrópodes, anfíbios e lagartos) e os adultos apenas de aves migratórias (Figura 3) (Martins et al. 2002).

Figura 3: Alguns dos itens alimentares presentes na dieta de *B.insularis*. **(A)** lagartos e **(B)** aves (Foto: Ricardo Sawaya).

Alphonse Hoge et al. (1959) foram os primeiros a detalhar o nítido dimorfismo sexual nesta espécie, bem como a presença de anormalidades sexuais na população. Na Ilha existem machos, fêmeas e indivíduos denominados intersexos, que são fêmeas genéticas e funcionais, porém apresentam um hemipênis rudimentar que não está associado a gônadas masculinas e, portanto,

não é funcional (Figura 4) (Hoge, et al. 1959; Beçak et al.1990). Alguns parâmetros biométricos como tamanho e ganho de massa durante o desenvolvimento são similares às fêmeas e aos intersexos e diferem em relação aos indivíduos machos, fato também observado em outras espécies de *Bothrops* continentais, como *B. jararaca*, por exemplo, (Travaglia-Cardoso, 2000).

Figura 4: Exemplar intersexo de *B.insularis* (nº 48.731, coleção do Instituto Butantan - SP). Notar a presença de um hemipênis rudimentar (círculo) e a presença de ovos nos ovidutos (seta). (Foto: André Zelanis).

Em expedição à Ilha da Queimada Grande Hoge et al. (1959) coletaram um exemplar hermafrodita, apresentando ambos os hemipênis bem desenvolvidos, um testículo do lado direito e ambos os ovários. Outra característica importante verificada durante essa expedição foi que todos os exemplares prenhes que foram coletados eram intersexos (Hoge et al. 1959). As hipóteses mais plausíveis para o aparecimento dos intersexos são: (a) mutações eventuais que levaram ao aparecimento do fenótipo intersexo ou (b) consequências de cruzamentos consangüíneos (*Inbreeding*) na população de *B.insularis* (Hoge et al.1959; Beçak et al.1990). Em estudos de citogenética, Beçak et al. (1990) propuseram alguns mecanismos genéticos para explicar o aparecimento dos intersexos na população de *B.insularis*. Na maioria das serpentes a determinação do sexo é genotípica e, ao contrário dos mamíferos, a fêmea é o sexo heterogamético (ZW) e o macho homogamético (ZZ) (Raynaud e Pieau, 1985; Pough et al.1998). Os intersexos presentes na população de *B.insularis* são heterogaméticos (ZW) e apresentam

um polimorfismo no cromossomo W, que teria sido formado por translocações seguidas por outras alterações cromossômicas, como trocas desiguais de cromátides irmãs durante o *crossing over* (Beçak et al.1990). Essas mudanças podem ter envolvido o(s) gene(s) que normalmente inibe o desenvolvimento do hemipênis em embriões femininos, desta forma, uma repressão no gene anti-hemipênis levaria ao aparecimento de um hemipênis rudimentar nas fêmeas denominadas intersexos (Beçak et al.1990).

Filogeneticamente, a serpente *B.insularis* pertence ao Grupo Jararaca que compreende outras duas espécies: *Bothrops jararaca* e *Bothrops alcatraz*, esta última endêmica da Ilha de Alcatrazes, Litoral Norte de São Paulo (Marques et al. 2002). Acredita-se que *B.insularis* e *B.alcatraz* tiveram um mesmo ancestral comum, muito semelhante a *B.jararaca*, e que, após os fenômenos climáticos ocorridos no final do Pleistoceno e o conseqüente isolamento geográfico, estas serpentes divergiram como novas espécies (Salomão et al.1999; Martins et al. 2001; Marques et al. 2002; Wüster et al. 2005).

Atualmente *B.insularis* consta como espécie **criticamente em perigo** na lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção no mundo (The IUCN Red List of Threatened Species, - www.iucnredlist.org) devido ao seu endemismo e ao contínuo declínio da qualidade do habitat devido a influência antrópica (Marques et al.2004). Esta é uma categoria de extremo risco, o que reforça os esforços conservacionistas e os estudos referentes a esta espécie.

1.5.1 O veneno da *Bothrops insularis*

Os primeiros estudos com o veneno desta espécie foram conduzidos por Afrânio do Amaral no início do século XX que constatara intensa atividade hemolítica e coagulante e uma toxicidade cerca de cinco vezes maior em relação ao veneno de *B. jararaca*, por via endovenosa em pombos (Amaral 1921; Amaral 1927). Campos e Mello-Filho (1966) utilizando diferentes modelos experimentais (camundongos, coelhos e pombos) e diferentes vias de inoculação do veneno (subcutânea, endovenosa e intraperitônia) relataram uma rápida ação do veneno, refletida no quadro de “choque” e morte observado nos animais experimentais.

Tanto Amaral (1921) quanto Campos e Mello-Filho (1966) relataram a ineficácia do soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan e pelo Instituto Vital Brazil, respectivamente, em neutralizar as ações do veneno em animais experimentais.

Os estudos referentes ao veneno de *B.insularis* são poucos se comparados a outras espécies de *Bothrops*, como *B.jararaca*, por exemplo, contudo nas últimas décadas as pesquisas com veneno de *B.insularis* têm se intensificado e diversas toxinas já foram isoladas e caracterizadas (Selistre e Giglio, 1987; Selistre et al.1990; Cintra et al.1990; Cogo et al.1993; Cogo et al.1998; Rodrigues-Simioni et al. 2004; Junqueira-de-Azevedo et al. 2001; Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2002; Guimarães-Gomes et al. 2004; Modesto et al. 2005).

Cogo e et al. (1993) demonstraram uma ação pré-sináptica do veneno de *B.insularis* sob junção neuro-muscular de aves e mamíferos e constataram uma maior eficácia desta ação em aves. Posteriormente estes autores isolaram uma fração contendo uma fosfolipase A₂ com atividade pré-sináptica (Cogo et al.1998). Selistre e Giglio (1987) isolaram uma enzima tipo-trombina de aproximadamente 45 kDa, que hidrolisa as cadeias A α e B β do fibrinogênio e, assim como outras enzimas tipo-trombina purificadas de veneno de serpentes, não ativa o fator XIII da cascata de coagulação sanguínea. Selistre et al. (1990) purificaram três toxinas com atividade hemorrágica (duas de 26 kDa e uma de 29 kDa), e uma fosfolipase A₂ dimérica (cerca de 29 kDa) mionecrótica e indutora de edema; Cintra et al. (1990) isolaram 11 peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), dos quais 8 tiveram sua estrutura primária resolvida.

A partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *B.insularis*, Junqueira- de- Azevedo et al. (2001) clonaram, expressaram e caracterizaram um fator de crescimento do endotélio vascular, denominado svVEGF (do inglês, *snake venom Vascular Endothelium Growth Factor*) que, segundo os autores, corresponde a um novo membro da família de proteínas VEGF; Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002) analisaram a diversidade do transcriptoma da glândula de veneno de *B.insularis* através da montagem de um banco de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) o que permitiu um levantamento das toxinas putativas presentes no veneno desta espécie.

Ainda da biblioteca da glândula de *B.insularis*, Guimarães-Gomes et al. (2004) clonaram, expressaram e caracterizaram uma lectina dimérica de aproximadamente 32 kDa, com atividade hemaglutinante denominada BiL.

Della-Casa et al. (2005) isolaram e caracterizaram uma disintegrina do veneno de *B. insularis*, chamada insularina, com atividade inibitória sobre agregação plaquetária. Recentemente, Modesto et al. (2005) isolaram uma metaloprotease da classe P-I, de 22,6 kDa, ativadora de protrombina, denominada Insularinase A.

1.5.2 *Bothrops insularis* e o isolamento geográfico

As análises filogenéticas mais atuais, elaboradas com base em DNA mitocondrial, apontam para uma baixa variabilidade genética na população de *B.insularis* em relação a espécie continental mais próxima (*B. jararaca*), provavelmente devido a população ancestral que ocupou a ilha portar apenas uma fração da variação genética total da população na fonte (efeito do fundador) (Grazziotin, 2004).

Ambientes insulares além de possuírem características singulares (algumas até limitantes para algumas espécies de animais) apresentam também uma dinâmica peculiar (Begon et al.1996). Existem importantes fatores relacionados à dinâmica da população de *B.insularis* na Ilha da Queimada Grande (Figura 5), entre eles estão: (a) a alta densidade populacional, oriunda da ausência de predadores naturais na ilha e (b) a existência da população em uma pequena área (consequência do isolamento geográfico) leva, entre outros fatores, a um constante endocruzamento (*inbreeding*) que diminui a variabilidade genética e pode acarretar em efeitos deletérios na população (depressão endogâmica) (Futuyma, 2002). Por estes motivos tornam-se tão importante os estudos e as estratégias conservacionistas para estes ecossistemas e as espécies que eles abrigam.

Figura 5: *B. insularis* no contexto de isolamento geográfico: aspectos biológicos e evolutivos.

2. OBJETIVOS

Assumindo a dieta dos animais como um parâmetro relacionado diretamente com a composição e atividades dos venenos e acompanhando a idade dos animais a fim de se identificar mudanças ontogenéticas, este projeto teve como objetivos gerais: (a) Promover a caracterização biológica e bioquímica do veneno de *B. insularis* através de uma abordagem ontogenética e (b) Correlacionar os resultados obtidos com os itens alimentares consumidos por esta espécie durante a sua ontogênese. Para tanto, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Dosar os venenos em relação ao seu teor protéico;
- Analisar qualitativamente os venenos por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Testar os venenos em relação às suas atividades bioquímicas: proteolítica, fosfolipásica, hialuronidásica e quanto à interferência em processos hemostáticos;
- Caracterizar as seguintes atividades biológicas dos venenos: dose mínima, hemorrágica e atividade miotóxica;
- Caracterizar a atividade letal dos venenos em diferentes modelos animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Serpentes - Criação e manutenção

Uma fêmea intersexo prenhe, foi coletada na Ilha da Queimada Grande, São Paulo e mantida no Biotério de Serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan sob o número controle Bi 9801. O animal gerou cinco filhotes, nascidos todos em cativeiro (ninhada **Bif 9801-01 a 05**). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em sala com temperatura controlada (24 ± 3 °C). Receberam alimentação (camundongos da linhagem Swiss) a cada 15 dias durante o primeiro ano, e após, a cada 30 dias. Dados biométricos (peso e comprimento) foram obtidos quando eram efetuadas as extrações de veneno. Das cinco serpentes iniciais, sobreviveram apenas três animais (um macho e dois intersexos) até 41 meses de idade (Bif 9801-04, 02 e 03, respectivamente).

3.1.2 Obtenção das amostras de veneno

As serpentes foram anestesiadas com auxílio de gás carbônico (CO₂), para realização de extrações individuais dos venenos, segundo Biasi et al. (1976/77).

Filhotes - Amostras de venenos foram coletadas, liofilizadas e acondicionadas à temperatura de -20°C. Foram efetuadas extrações individuais durante 41 meses, perfazendo um total de 18 extrações para cada serpente. As amostras de veneno serão referidas ao longo deste trabalho como: *Macho*, *Intersexo 1* e *Intersexo 2*. Foram selecionadas para análise, os venenos correspondentes as idades de 4, 10, 15, 20, 24, 33 e 41 meses.

Adultos – Nove serpentes adultas coletadas na Ilha (machos e intersexos), foram mantidas em cativeiro, e tiveram seus venenos extraídos. Estas amostras foram utilizadas para preparação do *pool Bothrops insularis*, utilizado como veneno

referência. A amostra do veneno da mãe da ninhada (um intersexo) também foi analisada. Foram analisadas também (apenas em eletroforese) amostras de venenos coletados “*in situ*” durante a última expedição a ilha da Queimada Grande em Novembro de 2004.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização bioquímica dos venenos

3.2.1.1 Dosagem Protéica

O teor protéico dos venenos foi avaliado através método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Markwell *et al.* (1978). O método de Lowry consiste na ligação, em condições alcalinas, dos íons de cobre (Cu^{2+}) com átomos de nitrogênio presentes em ligações peptídicas, produzindo uma coloração azul (reação do biureto). A coloração é intensificada pela redução do reagente Folin-Ciocalteu por resíduos de tirosina e triptofano presentes na amostra.

Os venenos foram diluídos em solução salina 0,85% para a concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$ e analisados em triplicata. O teor protéico foi determinado com base em uma curva padrão construída com Albumina Sérica Bovina (SIGMA, St. Louis, USA).

3.2.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio é um método amplamente utilizado em avaliações quantitativas e qualitativas de amostras protéicas. Este método apresenta um alto poder de resolução, pela migração das proteínas numa matriz de poliacrilamida, permitindo a determinação de suas massas moleculares. Esta determinação é uma consequência da ligação uniforme das proteínas com SDS, resultando em uma relação constante de massa/carga. O sistema mais utilizado é aquele descrito por Laemmli (1970), e foi

empregado para que se fosse traçado o perfil protéico dos venenos analisados. O ensaio foi realizado em gel (18 x16 cm x 1,5 mm) de gradiente de poliacrilamida (7,5 a 17,5 %). A eletroforese ocorreu em voltagem de 500 V (200 a 500 V) e corrente de 80 mA, à temperatura de 10 °C, sob condições redutoras ou não (pela presença ou ausência de β -mercaptoetanol, respectivamente). A revelação das bandas protéicas dispostas nos géis deu-se através da utilização do corante Comassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA, St.Louis, USA). Para tanto, foram preparadas duas soluções:

Solução estoque: 0,4 g de Comassie Brilliant Blue R-250 dissolvidos em 80 ml de água destilada. Em seguida, foram adicionados 120 ml de metanol.

Solução de uso: 25 ml da solução estoque adicionados a 25 ml de ácido acético 20%.

Os géis foram descorados através da imersão contínua em uma solução contendo metanol/ácido acético/água, na proporção de 30:10:60. Juntamente com as amostras foi utilizado também um padrão de baixo peso molecular (Low Molecular Weight, Pharmacia, USA) composto por uma mistura de proteínas, são elas: Fosforilase b (94.000 Da), Albumina (67.000 Da), Ovalbumina (43.000 Da), Anidrase carbônica (30.000 Da), Inibidor de tripsina (20.100 Da) e α -Lactalbumina (14.400 Da).

3.2.1.3 Análise densitométrica dos perfis protéicos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os perfis protéicos obtidos por SDS-PAGE (em condições redutoras) foram avaliados com auxílio do programa de densitometria Quantity One 1-D Image analysis[®] (Bio-Rad). As análises densitométricas foram efetuadas no Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, com auxílio da pesquisadora Norma Yamanoue.

3.2.1.4 Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS

A zimografia é uma técnica na qual a matriz em que as proteínas serão separadas é composta por poliacrilamida co-polimerizada com determinados substratos, com a finalidade de se identificar atividades enzimáticas manifestadas por proteínas específicas. Este ensaio foi realizado para se caracterizar, de forma preliminar, a região aproximada de massa molecular em que se evidencia a presença de proteases nas amostras de venenos analisadas. Foi utilizado o método descrito por Heussen e Dowdle (1980) com algumas modificações. Para este ensaio, foram utilizados géis (10 x 7 cm x 0,75 mm) na concentração de 10% de poliacrilamida, contendo **gelatina** (na concentração final de 1mg/ml). A eletroforese ocorreu em temperatura de 4 °C, voltagem de 100 V, corrente de 40 mA e sob condições não redutoras. Após a corrida os géis foram lavados por 30 minutos em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, contendo 2,5% do detergente Triton X-100, para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida foram lavados por 10 minutos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para a remoção do Triton X-100. Por fim, foram mantidos em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 com CaCl₂ 10 mM e NaCl 200 mM e incubados por 3 horas a 37°C. Os géis foram submetidos ao mesmo processo de revelação de bandas protéicas aplicado para SDS-PAGE, utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA, St. Louis, USA), contudo a descoloração foi feita até o aparecimento das áreas de atividade proteolítica.

Para avaliar a presença de metalo e serinoproteases as amostras foram incubadas com inibidores por 15 minutos à temperatura ambiente, (ortofenentrolina 10 mM e fluoreto de fenil metil sulfonila PMSF 5 mM, respectivamente) antes da aplicação no gel de poliacrilamida.

A avaliação da atividade proteolítica deu-se com o aparecimento de regiões mais claras no gel, contrastando com o fundo azul (resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina).

3.2.1.5 Atividade proteolítica sobre a caseína

Este ensaio seguiu o método descrito por Lomonte e Gutiérrez (1983) em que foi utilizada caseína como substrato para a quantificar a ação proteolítica dos venenos. Os venenos foram diluídos em solução salina (NaCl 0,85%) para uma concentração final de 50µg/ml. Em tubos de ensaio foi adicionado 1ml da solução de veneno, juntamente com 1ml de solução de caseína 1% preparada em tampão fosfato (Sorensen) 0,1M pH 7,5. Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Decorrido esta fase inicial, 3ml de ácido tricloroacético (TCA) a 5% foram adicionados em cada tubo e estes deixados em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 9000 rpm, 25°C. A absorbância dos sobrenadantes foi mensurada em espectrofotômetro (Micronal B 382) a 280 nm. Foram feitas triplicatas para cada amostra, bem como um tubo “branco”, em que a solução de veneno foi substituída por 1ml de solução salina 0,85%.

A atividade proteolítica foi expressa em unidades por miligrama de veneno, sendo calculada através da fórmula:

$$\text{Atividade: } \frac{\Delta \text{ Abs (280 nm)}}{\text{Concentração do veneno (mg)}} \times 100 \quad \text{U/mg}$$

3.2.1.6 Atividade fosfolipásica

Esta atividade foi mensurada segundo o método descrito por Cho e Kézdy (1991) e modificado por Holzer e Mackeessy (1996) utilizando um substrato cromogênico, o ácido 4-nitro-3 octanoiloxi-benzóico (SIGMA, St. Louis, USA). O princípio do método consiste na liberação de um produto cromogênico (p-nitrofenol) a partir da hidrólise do substrato pela enzima.

Os venenos foram diluídos em solução salina 0,85% para a concentração de 300µg num volume de 100µl. Em seguida, foram adicionados 900 µl de tampão de reação (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM e NaCl 100 mM, pH 8,0) e 100µl do substrato (ácido 4-nitro-3 octanoiloxi-benzóico 0,3 mM) diluído em acetonitrila. Os

tubos foram agitados com auxílio de um vortex e a solução foi incubada por 10 minutos a 37 °C. A reação foi bloqueada pela adição de 100µl de Triton X-100 2,5% mantendo os tubos em banho de gelo. Em seguida, efetuou-se então a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 425 nm contra um tubo branco (solução em que o veneno foi substituído por solução salina) As amostras foram avaliadas em triplicata juntamente com um controle positivo (200µg do veneno de *Crotalus durissus terrificus*).

Segundo Holzer e Mackessy (1996), uma leitura de 0,1 UA a 425 nm é equivalente a 25,8 nano mols do cromóforo liberado. O resultado foi expresso como atividade específica em nano mols produzidos/minuto/mg de veneno utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Absorbância (425 nm)} \times 25,8 / \text{quantidade de veneno (mg)}$$

3.2.1.7 Atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi determinada segundo o método turbidimétrico descrito por Ferrante (1956) modificado por Pukrittayakamee et al. (1988), em que a solução de ensaio torna-se menos turva na medida em que ocorre hidrólise do ácido hialurônico por hialuronidases presentes na amostra. A solução consistia em 300µl de tampão de acetato (acetato de sódio 0,2M pH 6,0, com 0,15 M de NaCl), 100µl de ácido hialurônico (0,5mg/ml) dissolvido em tampão acetato, e 100µl da solução de veneno (0,5mg/ml) também dissolvido em tampão acetato. Esta mistura foi incubada por 15 minutos a 37 °C. Em seguida a reação foi bloqueada pela adição de 1ml do detergente catiônico brometo de hexadecil N,N,N- trimetil amônio 2,5% em NaOH 2% e as respectivas absorbâncias mensuradas no espectrofotômetro, a 400 nm, contra um tubo branco em que não se adicionou ácido hialurônico e nem solução de veneno, consistindo apenas de 500µl de tampão acetato. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para estimativa da porcentagem de redução de turbidez, utilizou-se um tubo chamado **100% turvo**, contendo 400µl de tampão acetato e 100µl do substrato. A

atividade específica foi determinada utilizando-se a relação Unidades de Redução de Turbidez (URT) / concentração de veneno em miligramas:

$$\text{URT}^* / \text{concentração de veneno(mg)} \quad \text{U/mg}$$

*Uma URT foi dada como sendo a absorbância em que se verificava a redução de 50% de turbidez da solução de ensaio.

3.2.1.8 Dose mínima Coagulante sobre o Plasma (DMC-P)

A dose mínima coagulante é definida como a menor quantidade de veneno (em mg de veneno seco por litro de solução de solução teste) capaz de coagular uma solução padronizada de plasma citratado em 60 segundos a 37°C (Theakston e Reid, 1983). Para este ensaio foi utilizado plasma humano citratado (citrato de sódio 3,8%) preparado a partir da proporção 1:9, citrato de sódio 3,8% e sangue, respectivamente. O sangue foi centrifugado a 4000 rpm, 4°C por 15 minutos e o plasma foi separado e congelado a -80 °C para uso posterior. Os venenos foram diluídos em solução salina 0,85% para a concentração final de 1mg/ml. A partir desta concentração fez-se diluições seriadas. O ensaio foi realizado em duplicatas. A 200µl de plasma foram adicionados 100µl de veneno em diferentes concentrações (obtidas através de diluições seriadas, partindo da concentração inicial de 1 mg de veneno). O plasma foi mantido em banho de gelo durante o uso, e a 37°C, quando nas cubetas do fibrômetro (BBL Fibrosystem, Becton Dickinson, Marylans USA).

3.2.1.9 Atividade proteolítica em placa de fibrina

A placa de fibrina foi preparada de acordo com o método descrito por Jespersen e Astrup (1983), utilizando 30 mg de fibrinogênio humano comercial (1mg/ml de proteína coagulável, Calbiochem, USA) diluídos em 14 ml de tampão Tris-HCl 50mM, CaCl₂ 5mM, NaCl 200mM, pH 7,3. A esta solução foram adicionados 700µl de CaCl₂ 1M e 300µl de trombina bovina (Roche) 2UI/ml. A

mistura foi posteriormente depositada em placa de Petri plástica (9,0 x 1,5 cm), permanecendo a temperatura ambiente sobre uma superfície previamente nivelada até a formação da rede de fibrina. Após a polimerização da placa foram adicionados, em pontos eqüidistantes, 10 µl da solução de veneno (1mg/mL em solução salina 0,85%) veneno. Para avaliar a presença de metalo e serinoproteases as amostras foram previamente incubadas à temperatura ambiente, por 15 minutos, com inibidores destas duas classes de enzimas, ortofenentrolina 10 mM e PMSF 5 mM (concentrações finais), respectivamente. A placa permaneceu por 18 horas em estufa à temperatura de 37 °C, quando foi retirada e as áreas de lise foram determinadas com auxílio de um paquímetro.

3.2.1.10 Perfil de degradação de fibrinogênio em gel de poliacrilamida

A atividade fibrinogenolítica dos venenos foi avaliada em gel de poliacrilamida (Laemmli,1970). As amostras de veneno foram incubadas a 37 °C com uma solução de fibrinogênio humano (1mg/ml de proteína coagulável, Calbiochem, USA) diluído em água destilada (proporção veneno: fibrinogênio = 1:100). As amostras foram incubadas por 2 horas em banho termostatizado (37°C). Após a incubação, as amostras foram reduzidas com β-mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos à 100°C. Em seguida, a mistura foi aplicada em gel de poliacrilamida (10% de poliacrilamida) e submetido à eletroforese com corrente de 80 mA e a 500V, à temperatura de 10 °C. A integridade da molécula do fibrinogênio utilizado foi verificada a partir de uma alíquota de solução de fibrinogênio incubada a 37°C por 2h. Para avaliar a presença de metalo e serinoproteases as amostras foram incubadas com inibidores, ortofenentrolina 10 mM e PMSF 5 mM (concentrações finais), respectivamente.

3.2.1.11 Ativação da protrombina (Fator II)

A ação ativadora de protrombina foi indiretamente testada através do ensaio de formação de trombina a partir de protrombina (Sigma) usando o substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix). Para isto, as amostras de veneno

(0,2 µg) foram pré-incubadas a 37° C com protrombina (0,55 µM), na presença de CaCl₂ (5mM) e Tris-HCl 20mM, pH 7,4 em um volume final de 100 µl. Após 10 minutos de incubação, o substrato S-2238 (H-D-Phe-PIP-Arg-pNA·2HCl), na concentração de 400 µM, foi adicionado e sua hidrólise monitorada a 405 nm por 30 minutos à 37° C. A ação direta das amostras sobre o S-2238 foi monitorada a 405 nm, por 30 minutos, pela incubação das mesmas à 37 °C, na ausência da protrombina.

3.2.1.12 Ativação do Fator X

A ação ativadora do veneno sobre o Fator X foi testada usando o substrato cromogênico S-2765 (Chromogenix) específico para fator Xa. Inicialmente, as amostras de veneno (0,2 µg) foram pré-incubadas, durante 10 minutos a 37° C, com Fator X (0,7 µM) e tampão Tris-HCl 25mM, NaCl 200mM, CaCl₂ 10mM, pH 8,3 para um volume final de 100 µl. A hidrólise do S-2765 (N-α-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl), na concentração de 400 µM, pelo fator Xa resultante da ação do veneno sobre o fator X, foi monitorada a 405 nm durante 30 minutos a 37 °C. A atividade amidolítica das amostras sobre o S-2765 foi também monitorada a 405 nm, por 30 minutos, pela incubação do mesmo a 37 °C, na ausência do Fator X.

3.2.1.13 Atividade tipo-trombina

A atividade tipo-trombina dos venenos foi avaliada a partir da incubação de 100µl das amostras (1mg/mL) com 200µl de solução de fibrinogênio humano, (1mg/ml de proteína coagulável, Calbiochem, USA), em solução salina 0,85%. A mistura foi colocada em tubos de vidro, em banho termostatizado a 37 °C sob observação, até a formação da fibrina, momento em que o tempo foi averiguado. A atividade tipo-trombina das amostras foi calculada a partir da realização de uma curva com diluições seriadas de trombina bovina (Roche), com o auxílio de um

fibrômetro (BBL,Fibrosystem, becton Dickson, Marylans, USA) em que os tempos necessários para a formação de fibrina foram avaliados.

A atividade foi expressa em Unidades de trombina (U). Uma unidade de trombina foi definida como sendo a concentração necessária para promover a formação de fibrina em 20 segundos, a 37°C.

3.2.2 Caracterização das atividades biológicas dos venenos

Todos os ensaios envolvendo animais tiveram a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (processo n° 159/2004).

3.2.2.1 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi avaliada segundo o método de Kondo et al. (1960) modificado por Gutiérrez et al. (1985). Grupos de 4 camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 18 a 22g foram inoculados na região abdominal através da via intra-dérmica, com diferentes doses de veneno em um volume de 50µl. Após 2 horas os camundongos foram mortos por inalação de gás carbônico, a pele foi removida, colocada sobre um transiluminador, e a área hemorrágica foi avaliada através da sobreposição sobre folhas de papel milimetrado . A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) é definida como a concentração de veneno que produz uma área hemorrágica de 78,5 mm² ou 10 mm de diâmetro.

3.2.2.2 Atividade miotóxica – Quantificação plasmática da enzima creatina-quinase

Foi utilizado o método de quantificação dos níveis séricos da enzima creatino-quinase (CK), como descrito por Gutiérrez et al. (1980). O princípio da reação está apresentado no esquema:

A intensidade de cor formada é proporcional a atividade da enzima creatina-quinase (determinada pela leitura espectrofotométrica a 520 nm).

Os animais (camundongos da linhagem Swiss, pesando entre 18 e 22g) foram inoculados com 50 µg da amostra de veneno administrada pela via intramuscular (n = 6), em um volume de 50µl no músculo da coxa direita. Os animais controle receberam salina estéril 0,85% no mesmo volume (n = 6). As amostras de sangue foram coletadas, via plexo orbital, 3 horas após a injeção dos venenos. O plasma foi separado por centrifugação por 10 minutos a 5000rpm e os níveis individuais de CK foram quantificados utilizando-se o kit CPK-520 da Sigma conforme instruções do fabricante. Os níveis séricos de CK foram estimados a partir da construção de uma curva com padrão de creatina-quinase.

3.2.2.3 Dose letal média (DL₅₀)

A dose letal média é definida como a dose responsável pela morte de 50% da população analisada. Camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 18 e 22g, receberam através da via intra peritonial, 0,5ml da solução de veneno em diferentes concentrações, diluída em solução salina 0,85%. O número de animais mortos nas doses analisadas foi avaliado em um período de 48 horas (Silles Villarroel, 1978/79). A DL₅₀ foi calculada segundo o método de Probito (Finney, 1971).

3.2.2.4 Determinação da dose letal média (DL₅₀) em modelos experimentais alternativos

A Dose letal média foi avaliada utilizando-se também modelos animais alternativos: abelhas e aves. Para o ensaio com abelhas foi utilizado o método descrito por Manzoli-Palma, et al. (2003). Abelhas (n=5) recém emergidas (pesando aproximadamente 82 mg), provenientes do apiário do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP-SP, campus de Rio Claro) receberam uma injeção intra-celomática (na cavidade torácica) de 2µl das amostras de veneno em diferentes concentrações (em solução salina 0,85%). Para este ensaio utilizou-se uma seringa Hamilton® de 10µl.

Como modelo endotérmico foram utilizadas também aves (pintinhos machos de 1 dia, linhagem Bovans White pesando entre 40-45g) provenientes da Granja Kunitomo, Mogi das Cruzes, São Paulo. Os animais (n=4) receberam injeção de diferentes concentrações das amostras de veneno (em solução salina 0,85%) pela via intra-muscular, num volume de 100µl no músculo peitoral esquerdo. Para ambos os ensaios as mortes após 24 horas de inoculação foram avaliadas e a DL₅₀ foi calculada segundo o método de Probit (Finney, 1971).

3.2.3 *Análise estatística dos resultados*

Foram efetuadas comparações entre os grupos amostrais através de análise de variância (ANOVA). Quando a ANOVA foi significativa, aplicou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias dos grupos amostrais. Para tanto, utilizou-se o programa estatístico MINITAB 13.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Dados biométricos de crescimento e produção de veneno

Durante o período de 41 meses foram observadas diferenças acentuadas entre os três animais em relação a produção de veneno, ao comprimento e a massa. Os animais apresentaram um crescimento (comprimento total e massa) similar até cerca de 24 meses, fase em que se observa uma nítida diferenciação, com os intersexos divergindo de forma mais expressiva em relação ao macho (Figura 6). A produção de veneno tornou-se acentuada a partir entre o 24° e o 29° mês de idade, período em que se observa uma nítida diferenciação entre os três animais, tendo o Intersexo 2 a maior produção durante o período analisado (Figura 7).

Figura 6: Crescimento dos animais. **A** – Comprimento (mm); **B** – Massa (g).

Figura 7: Produção de veneno durante a ontogênese dos animais. Os venenos coletados foram liofilizados e pesados.

4.2 Caracterização bioquímica dos venenos

4.2.1. Teor protéico

De uma forma geral, os venenos apresentaram um alto teor protéico variando de 618 a 1189 μg de proteína por mg de veneno (Tabela 1). Segundo o teste comparações múltiplas (Teste de Tukey), em relação ao teor protéico, o veneno do Intersexo 1 apresentou diferença significativa em relação ao do Intersexo 2 e o do Macho (Figura 8). A idade de 24 meses foi a fase de vida em que os animais apresentaram um teor protéico significativamente maior em relação às demais fases de vida. (Figura 8).

Tabela 1: Teor protéico (μg de proteína por mg de veneno) dos venenos analisados em diferentes fases da ontogênese dos animais. Os valores representam a média de quatro determinações $\pm$ desvio padrão.

Idade (meses)	Intersexo 1	Intersexo 2	Macho	Mãe da ninhada	Pool <i>B.insularis</i>
10	976,1 $\pm$ 20	740 $\pm$ 23	833,3 $\pm$ 27	1077,1 $\pm$ 68	991,6 $\pm$ 70
15	963,7 $\pm$ 44	894,9 $\pm$ 56	809,2 $\pm$ 39		
20	797,3 $\pm$ 67	734,2 $\pm$ 35	1144,2 $\pm$ 9,9		
24	661,6 $\pm$ 13	1188,1 $\pm$ 78	1038,4 $\pm$ 51		
33	618,1 $\pm$ 75	975 $\pm$ 45	814,3 $\pm$ 27		
41	628,3 $\pm$ 49	1036,6 $\pm$ 25	861,6 $\pm$ 44

Figura 8: Teor protéico dos venenos de *B.insularis* ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de veneno). **A**- variabilidade individual. **B** - variabilidade ontogenética.

4.2.2 Perfil protéico analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em condições não redutoras possibilitou a visualização de bandas protéicas majoritárias nas faixas de 94, 50, 27 e 14 kDa, presentes em todos os venenos e em todas as idades analisadas dos três indivíduos (Figura 9-A,B e C). A idade de 4 meses corresponde a um pool de veneno dos três animais (devido a baixa produção de veneno nesta fase de vida)

A

Figura 9: Eletroforese em gel de gradiente (7,5 a 17,5 %) de poliacrilamida em condições não redutoras. Foram aplicados 120 μ g de veneno por poço do gel. Os números acima dos géis representam as idades (em meses) em que foram efetuadas as extrações. **A** - Intersexo 1; **B** - Intersexo 2 e **C** - Macho. **M** e **PB** representam a mãe da ninhada e o Pool de *B. insularis*, respectivamente

O perfil protéico, evidenciado por SDS-PAGE, mostrou-se similar tanto entre os diferentes venenos quanto entre as diferentes fases de vida analisadas. Realizamos também eletroforese das amostras sob condições redutoras analisando ainda, amostras de venenos coletados "*in situ*" (amostras coletadas na Ilha da Queimada Grande) (Figura 10). O perfil protéico dos venenos coletados *in situ* apresentou-se similar àqueles extraídos das serpentes mantidas em cativeiro.

Figura 10: Eletroforese em gel de gradiente (7,5 a 17,5 %) de poliacrilamida em condições redutoras. Foram aplicados 120 µg de veneno por poço do gel. Foram analisadas amostras de veneno coletadas de animais adultos na Ilha da Queimada Grande durante a expedição realizada em Novembro de 2004 (24/11/2004).

Em condições redutoras os perfis protéicos mostraram-se semelhantes entre os animais e entre as diferentes fases de vida analisadas (Figuras 11, 12 e 13). Em todas amostras foi possível observar bandas protéicas majoritárias nas faixas de 50, 37,24 e 14 kDa. A banda de 24 kDa apresentou um aumento de intensidade durante a ontogênese dos animais, fato evidenciado também pela análise densitométrica dos géis

Figura 11: Interseco 1. **A** - Eletroforese em gel de gradiente (7,5 a 17,5 %) de poliacrilamida em condições redutoras. Foram aplicados 120 μ g de veneno por poço do gel. Os números acima do gel representam as idades (em meses) em que foram efetuadas as extrações. **B** - Análise densitométrica do perfil protéico do veneno do Interseco 1. **M** e **PB** representam a mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*, respectivamente. As setas referem-se a banda de 24 kDa (em A) e sua intensidade (Unidades Arbitrárias) analisada por densitometria (em B).

Figura 12: Interseco 2. **A** - Eletroforese em gel de gradiente (7,5 a 17,5 %) de poliacrilamida em condições redutoras. Foram aplicados 120 μ g de veneno por poço do gel. Os números acima do gel representam as idades (em meses) em que foram efetuadas as extrações. **B** - Análise densitométrica do perfil protéico do veneno do Interseco 2. **M** e **PB** representam a mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*, respectivamente. As setas referem-se a banda de 24 kDa (em A) e sua intensidade (Unidades Arbitrárias) analisada por densitometria (em B).

4.2.3 Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS

Foi possível evidenciar a presença de proteases gelatinolíticas, sobretudo nas faixas de massa molecular de cerca de 45 e 27 kDa, nos venenos dos animais analisados (Figuras 14-A, 15-A e 16-A). O aumento gradual da área de lise na matriz poliacrilamida-gelatina sugere um aumento de intensidade da atividade proteolítica dos venenos durante a ontogênese dos animais. De forma semelhante, verificou-se também nos venenos da mãe da ninhada e do Pool de *B.insularis* proteases de massa molecular aproximada de 45 e 27 kDa, contudo estas amostras apresentaram também proteases com massa molecular acima de 90 kDa (Figura 17-A).

A incubação prévia dos venenos com ortofenantrolina 10 mM ocasionou uma diminuição drástica da área de proteólise no gel, evidenciando a presença efetiva de metaloproteases (Figuras 14-B, 15-B e 16-B). Por outro lado, a incubação prévia dos venenos com PMSF 5 mM afetou pouco esta atividade (Figuras 14-C, 15-C e 16-C). O mesmo perfil foi verificado para os venenos da Mãe da ninhada e do Pool de *B.insularis* (Figura 17-B e 17-C)

Figura 14: **A** - Zimografia em SDS-PAGE do veneno do Intersexo 1. Gel a 10% de poliacrilamida com 1 mg/ml de gelatina (concentração final). Os números acima correspondem a idade (em meses) do animal. Foi aplicado um volume correspondente a 40 µg de veneno. **B** - amostras previamente incubadas com ortofenantrolina 10 mM (concentração final). **C** - amostras previamente incubadas com PMSF 5 mM (concentração final).

Figura 15: **A** - Zimografia em SDS-PAGE do veneno do Intersexo 2. Gel a 10% de poliacrilamida com 1 mg/ml de gelatina (concentração final). Os números acima correspondem a idade (em meses) do animal. Foi aplicado um volume correspondente a 40 μ g de veneno. **B** - amostras previamente incubadas com ortofenanolina 10 mM (concentração final). **C** - amostras previamente incubadas com PMSF 5 mM (concentração final).

Figura 16: **A** - Zimografia em SDS-PAGE do veneno do Macho. Gel a 10% de poliacrilamida com 1 mg/ml de gelatina (concentração final). Os números acima correspondem a idade (em meses) do animal. Foi aplicado um volume correspondente a 40 μ g de veneno. **B** - amostras previamente incubadas com ortofenanolina 10 mM (concentração final). **C** - amostras previamente incubadas com PMSF 5 mM (concentração final).

Figura 17: **A** - Zimografia em SDS-PAGE do veneno da mãe da ninhada (M) e do pool de *B. insularis* (PB). Gel a 10% de poliacrilamida com 1 mg/ml de gelatina (concentração final). Foi aplicado um volume correspondente a 40 μ g de veneno. **B** - amostras previamente incubadas com ortofenantrolina 10 mM (concentração final). **C** - amostras previamente incubadas com PMSF 5 mM (concentração final).

4.2.4 Atividade proteolítica sobre a caseína

Todos os venenos analisados apresentaram atividade proteolítica sobre a caseína, sendo esta atividade significativamente maior para os venenos do Intersexo 2 e Macho em relação ao Intersexo 1 (Figura 18-A). Na idade de 41 meses esta atividade foi significativamente menor, em relação às demais idades (Figura 18-B). Na fase de 15 meses tanto o Intersexo 2 quanto o Macho apresentaram valores significativamente maiores em relação à Mãe da ninhada e ao Pool, enquanto o Intersexo 1 apresentou um valor significativamente menor (característica verificada também para este veneno na idade de 41 meses). Contudo, na fase adulta (41 meses), apenas o veneno do Macho não difere significativamente em relação ao Pool e à Mãe da ninhada. O veneno do Intersexo 2 apresentou um valor maior em relação ao Pool e à Mãe da ninhada (Figura 18-C e Tabela 2).

Figura 18: Atividade caseinolítica dos venenos de *B. insularis*. **A** - variabilidade individual. **B** - variabilidade ontogenética. **C** - Representação gráfica da atividade proteolítica específica (U/mg) dos venenos.

Tabela 2: Nível de significância entre as comparações (teste de Tukey) dos valores obtidos para a atividade caseinolítica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B. insularis*.

Comparações/ Animais	Idade (meses) P-valor	
	15	41
Mãe x Intersexo 1	0,0209	0,0001
Mãe x Intersexo 2	0,0001	0,0031
Mãe x Macho	0,0000	0,1775
Pool x Intersexo 1	0,0012	0,0000
Pool x Intersexo 2	0,0015	0,0364
Pool x Macho	0,0000	0,8040

4.2.5 Atividade fosfolipásica

Todos os venenos apresentaram atividade fosfolipásica, que diferiu significativamente entre os 3 animais (Intersexo 1, 2 e Macho), sendo maior para os venenos do Macho e do Intersexo 2 em relação ao Intersexo 1 (Figura 19-A). A idade de 24 meses apresentou um comportamento significativamente diferente em relação às demais idades analisadas, sendo esta a fase de mais intensa atividade fosfolipásica (Figura 19-B). Os venenos do Intersexos na fase jovem (15 meses) apresentaram atividade fosfolipásica significativamente menor em relação ao veneno da mãe da ninhada e não diferiram significativamente em relação ao Pool de veneno de *B.insularis* (Figura 19-C e Tabela 3). Na fase adulta (41 meses) os venenos do Intersexo 1 e do Macho apresentaram atividade fosfolipásica significativamente menor em relação ao veneno da mãe da ninhada, e maior em relação ao Pool de veneno de *B.insularis* (Tabela 3).

Figura 19: Atividade fosfolipásica dos venenos de *B.insularis*. **A** - variabilidade individual. **B** – variabilidade ontogenética. **C** - Representação gráfica da atividade fosfolipásica específica (nmols/min/mg de veneno/mg) dos venenos. Como parâmetro de comparação foram utilizados 200 µg de veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Tabela 3: Nível de significância entre as comparações (teste de Tukey) dos valores obtidos para a atividade fosfolipásica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Comparações/ Animais	Idade (meses) <i>P-valor</i>	
	15	41
Mãe x Intersexo 1	0,0000	0,0006
Mãe x Intersexo 2	0,0013	0,4409
Mãe x Macho	0,4094	0,0138
Pool x Intersexo 1	0,3299	0,6661
Pool x Intersexo 2	0,1015	0,0011
Pool x Macho	0,0003	0,0416

4.2.6 Atividade hialuronidásica

Os venenos diferiram significativamente quanto à atividade hialuronidásica. Os Intersexos apresentaram uma atividade significativamente maior em relação ao veneno do Macho (Figura 20-A). A idade de 10 meses foi a fase em que se verificou uma atividade significativamente maior em relação às demais fases de vida analisadas (Figura 20-B). Na fase de 15 meses a atividade hialuronidásica do veneno do Intersexo 1 não diferiu significativamente em comparação com o veneno da Mãe da ninhada e do Pool de *B.insularis* (Figura 20-C e Tabela 4). Já o veneno do Macho apresentou uma atividade significativamente menor em comparação com o da Mãe e do Pool. O veneno do Intersexo 2 apresentou uma atividade maior em relação à Mãe da ninhada e não diferiu em relação ao Pool de *B.insularis*. Na fase de 41 meses a atividade dos venenos não diferiu significativamente em relação ao veneno da Mãe da ninhada e ao Pool de *B.insularis* (Figura 20-C e Tabela 4).

Figura 20: Atividade hialuronidásica dos venenos de *B. insularis*. **A** - variabilidade individual. **B** – variabilidade ontogenética. **C** - Representação gráfica da atividade hialuronidásica específica (U/mg) dos venenos.

Tabela 4: Nível de significância entre as comparações (teste de Tukey) dos valores obtidos para a atividade hialuronidásica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B. insularis*.

Comparações/ Animais	Idade (meses) <i>P</i> -valor	
	15	41
Mãe x Intersexo 1	1,0000	0,3006
Mãe x Intersexo 2	0,0438	0,9983
Mãe x Macho	0,0037	0,2069
Pool x Intersexo 1	0,4878	0,1382
Pool x Intersexo 2	0,2778	0,8362
Pool x Macho	0,0013	0,0958

4.2.7. Atividade coagulante – Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma (DMC-P)

Neste ensaio a atividade coagulante dos venenos sobre plasma humano citratado foi avaliada utilizando amostras de veneno extraídas em duas fases de vida dos animais: 15 e 41 meses, representando jovens e adultos, respectivamente. Não observamos diferença significativa entre a atividade coagulante do veneno do Intersexo 1 em relação ao Macho, porém ambos os venenos diferem significativamente em relação ao veneno do Intersexo 2, que mostrou menor atividade (Tabela 5 e Figura 21-A). O veneno dos animais jovens mostrou atividade coagulante significativamente maior em relação ao dos adultos (Tabela 5 e Figura 21-B).

Tanto os venenos do Intersexo 1 quanto do Macho na idade de 15 meses apresentaram atividade coagulante significativamente maior em relação ao veneno da mãe da ninhada e do Pool de *B.insularis* (Tabelas 5 e 6). O veneno do Intersexo 2 na idade de 15 meses não diferiu significativamente do veneno da mãe da ninhada e apresentou uma atividade coagulante significativamente maior em relação ao pool de veneno de *B.insularis* (Tabelas 5 e 6). Na idade de 41 meses os venenos dos Intersexos não diferiram significativamente dos venenos da Mãe da ninhada e do Pool de *B.insularis*. Já o veneno do macho apresentou uma atividade significativamente maior em relação ao veneno do Pool de *B.insularis* e não diferiu significativamente do veneno da Mãe da ninhada (Tabela 6).

Tabela 5: Atividade coagulante (DMC-P) dos venenos de *B.insularis* sobre plasma humano citratado. Foram avaliados os venenos dos jovens (15 meses) e adultos (41 meses). Os resultados representam a média de duas determinações $\pm$ desvio padrão.

Idade (meses)	Intersexo 1	Intersexo 2	Macho	Mãe da ninhada	Pool <i>B.insularis</i>
15	6,2 $\pm$ 0,35	11,2 $\pm$ 0,35	8,3 $\pm$ 0,5	11,9 $\pm$ 0,07	15,5 $\pm$ 0,7
41	9,5 $\pm$ 3,11	14,5 $\pm$ 1,5	9,1 $\pm$ 0,1

Figura 21: Atividade coagulante sobre o plasma dos venenos de *B.insularis* (DMC-P). **A** - variabilidade individual. **B** – variabilidade ontogenética.

Tabela 6: Nível de significância entre as comparações (teste de Tukey) dos valores obtidos para a Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Comparações/ Animais	Idade (meses) <i>P-valor</i>	
	15	41
Mãe x Intersexo 1	0,0003	0,5753
Mãe x Intersexo 2	0,5703	0,5294
Mãe x Macho	0,0026	0,4574
Pool x Intersexo 1	0,0000	0,0606
Pool x Intersexo 2	0,0012	0,9685
Pool x Macho	0,0001	0,0477

4.2.8. Atividade fibrinolítica – Placa de fibrina

A atividade fibrinolítica dos venenos mostrou um discreto aumento com a idade dos animais. Entre as amostras analisadas o padrão de atividade fibrinolítica foi similar (Tabela 7). Esta atividade foi sensivelmente afetada pela incubação prévia das amostras com ortofenantrolina 10mM, fato evidenciado pela redução na área de lise na placa. Uma pequena redução da área de fibrinólise foi verificada quando as amostras foram incubadas previamente com PMSF 5 mM.

Tabela 7: Atividade fibrinolítica dos venenos de *B.insularis* avaliada em duas fases de vida dos animais.

Animais	Idade (meses)	Área de fibrinólise (mm²)	Ortofenantrolina 10 mM	PMSF 5mM
Intersexo 1	15	360	0	289
	41	361	0	323
Intersexo 2	15	420	120	380
	41	462	121	256
Macho	15	324	0	320
	41	460	0	440
Mãe da ninhada		506	210	380
Pool		484	156	440
Controle [§]		228		

[§]Streptoquinase 12,5 U/ml

4.2.9 Perfil de degradação de fibrinogênio em gel de poliacrilamida

Todos venenos foram capazes de promover a hidrólise das cadeias A α e B β do fibrinogênio em ambas as idades analisadas (15 e 41 meses), com exceção para o veneno do Macho que hidrolisou parcialmente a cadeia A α na idade de 15 meses (Figura 22-A). A incubação prévia dos venenos com ortofenantrolina 10 mM preveniu a hidrólise da cadeia B β e parcialmente da cadeia A α (Figura 22-B). Por este motivo, utilizamos outro inibidor de metaloproteases, EDTA 10mM, que aboliu a hidrólise de ambas as cadeias (Figura 22-C). Por outro lado, quando os venenos foram previamente incubados com PMSF 5 mM, verificou-se a hidrólise da cadeia A α e parcialmente da cadeia B β (Figura 22-D).

Figura 22: **A** - Perfil de degradação do fibrinogênio em SDS-PAGE (10%) pelas amostras. **B** e **C** - Amostras incubadas com inibidores de metaloproteases (ortofenantrolina e EDTA 10 mM, respectivamente). **D** - Amostras incubadas com inibidor de serinoproteases (PMSF 5 mM).- Em cada poço do gel foi aplicada uma solução veneno + fibrinogênio na proporção de 1:100, respectivamente. As amostras foram incubadas em banho termostatzado a 37°C.por duas horas. **J**= idade de 15 meses e **A** = idade de 41 meses. **Fg** Fibrinogênio. **M** representa a mãe da ninhada e **PB** Pool de *B.insularis*.

4.2.10 Ativação da protrombina (Fator II)

Não se observou uma variação expressiva na atividade ativadora de protrombina tanto para os venenos dos animais jovens (15 meses) (Figura 23-A) quanto para o dos adultos (41 meses) (Figura 23-B). Após 5 minutos de incubação a hidrólise do substrato atingiu um platô para todas as amostras. Os venenos dos intersexos apresentaram uma atividade mais intensa que o do macho.

Figura 23: Ativação do fator II pelos venenos dos animais. **A** - venenos dos animais na idade de 15 meses e **B** - venenos dos animais na idade de 41 meses. Hidrólise monitorada por 15 minutos a 37°C, λ 405 nm. Substrato S-2238 (H-D-Phe-PIP-Arg-pNA.2HCl) (Chromogenix) específico para o fator IIa.

Todos os venenos apresentaram atividade amidolítica sobre o substrato cromogênico S-2238. O veneno dos jovens (15 meses) apresentaram valores de absorbância abaixo de 0,4 decorridos 30 minutos do início do ensaio (Figura 24-A). Na idade de 41 meses os venenos dos Intersexos, Mãe da ninhada e Pool de *B.insularis* apresentaram valores de absorbância acima de 0,4 no tempo de 30 minutos, sendo veneno do Macho o menos ativo (Figura 24-B)

Figura 24: Atividade amidolítica dos venenos sobre o substrato cromogênico S-2238 (H-D-Phe-PIP-Arg-pNA.2HCl) (Chromogenix). **A** - venenos dos animais na idade de 15 meses e **B** - venenos dos animais na idade de 41 meses Hidrólise monitorada por 30 minutos a 37°C, λ 405 nm.

4.2.11 Ativação do Fator X

Os venenos dos animais jovens (15 meses) foram capazes de ativar o Fator X da cascata de coagulação sanguínea de forma mais intensa que o dos adultos (Figura 25). Assim como verificado para a ação ativadora de protrombina, os venenos dos intersexos apresentaram uma atividade mais intensa que o do Macho para a idade de 15 meses (Figura 25-A). O Pool de *B.insularis* foi o que apresentou menor atividade (Figura 25-B).

Não foi observada atividade amidolítica sobre o substrato cromogênico S-2765 (dados não mostrados).

Figura 25: Ativação do Fator X pelos venenos dos animais. **A** - venenos dos animais na idade de 15 meses e **B** - venenos dos animais na idade de 41 meses. Hidrólise monitorada por 15 minutos a 37°C, λ 405 nm. Substrato S-2765 (N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA $\times$ 2HCl) (Chromogenix) específico para o fator Xa.

4.2.12. Atividade tipo-trombina

A atividade tipo trombina não apresentou diferença significativa entre os animais (Intersexos e Macho) (Tabela 8 e Figura 26-A) e nem entre as duas fases de vida analisadas (15 e 41 meses) (Tabela 8 e Figura 26-B). Nas idades de 15 e 41 meses os venenos dos animais (Intersexos e Macho) não diferiram em relação ao veneno da Mãe da ninhada e ao Pool de *B.insularis*, com exceção para o veneno do Intersexo 2, que mostrou uma atividade tipo-trombina significativamente maior na idade de 15 meses em relação ao Pool de *B.insularis* (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8: Atividade tipo trombina dos venenos em duas fases (15 e 41 meses) de vida dos animais. A atividade foi expressa como Unidades de Trombina (UT). Os resultados representam a média de duas determinações $\pm$ desvio padrão.

Idade (meses)	Intersexo 1	Intersexo 2	Macho	Mãe	Pool
15	0,15 $\pm$ 0,003	0,21 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,007	0,09	0,05
				$\pm$	$\pm$
41	0,20 $\pm$ 0,09	0,13 $\pm$ 0,09	0,17 $\pm$ 0,01	0,01	0,01

A

Figura 26: Atividade tipo-trombina dos venenos de *B.insularis*. **A** - variabilidade individual. **B** – variabilidade ontogenética. Atividade expressa em Unidades de Trombina (UT).

Tabela 9: Nível de significância entre as comparações (teste de Tukey) dos valores obtidos para a atividade tipo-trombina dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Comparações/ Animais	Idade (meses) <i>P</i> -valor	
	15	41
Mãe x Intersexo 1	0,5073	0,5067
Mãe x Intersexo 2	0,0670	0,9599
Mãe x Macho	0,9947	0,7468
Pool x Intersexo 1	0,1452	0,2672
Pool x Intersexo 2	0,0221	0,7468
Pool x Macho	0,8987	0,4354

4.3 Caracterização das atividades biológicas dos venenos

4.3.1 Atividade Hemorrágica –Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

A atividade hemorrágica não diferiu significativamente entre os venenos dos Intersexos (Figura 27). O veneno do Macho mostrou atividade significativamente maior em relação aos Intersexos (Figura 27-A). A atividade hemorrágica apresentou uma expressiva variação ontogenética (Figura 27-B e Tabela 10), com o veneno dos animais adultos (41 meses) sendo significativamente mais hemorrágicos que o dos jovens (15 meses). Na idade de 15 meses os venenos dos Intersexos não diferiram significativamente em relação ao veneno da Mãe da ninhada e do Pool de *B.insularis* (Tabelas 10 e 11). Já o veneno do Macho apresentou atividade significativamente maior nesta fase de vida quando comparado com os venenos da Mãe da ninhada e do pool de *B.insularis* (Tabelas 10 e 11). Na idade de 41 meses não foi observada diferença significativa entre a atividade hemorrágica do veneno do Intersexo 1 em relação aos venenos da Mãe da ninhada e do Pool de *B.insularis*. Nesta idade, o veneno do Intersexo 2 não diferiu significativamente do veneno da Mãe da ninhada, porém apresentou atividade hemorrágica significativamente menor em relação ao Pool de venenos de *B.insularis*. O veneno do Macho na Idade de 41 meses apresentou atividade hemorrágica significativamente maior que o da Mãe da ninhada e não diferiu significativamente do pool de venenos de *B.insularis* (Tabelas 10 e 11).

Figura 27: Atividade hemorrágica (Dose Mínima Hemorrágica) dos venenos de *B.insularis*. **A** - variabilidade individual. **B** – variabilidade ontogenética.

Tabela 10: Valores obtidos no ensaio de Dose Mínima Hemorrágica* (em μg de veneno) com os venenos dos jovens (15 meses) e adultos (41 meses). Os valores representam a média de quatro determinações $\pm$ o desvio padrão.

Idade (meses)	Intersexo 1	Intersexo 2	Macho	Mãe da ninhada	Pool <i>B.insularis</i>
15	2,0 $\pm$ 0,35	2,0 $\pm$ 0,26	1,4 $\pm$ 0,05	1,4 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2
41	1,3 $\pm$ 0,05	1,66 $\pm$ 0,20	0,6 $\pm$ 0,4		

* A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) é definida como a dose de veneno capaz de produzir uma área hemorrágica de 78,5 mm² ou 10 mm de diâmetro em camundongos.

Tabela 11: Nível de significância entre as comparações (teste de Tukey) dos valores obtidos para a Dose Mínima Hemorrágica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Comparações/ Animais	Idade (meses) <i>P-valor</i>	
	15	41
Mãe x Intersexo 1	0,0275	0,9824
Mãe x Intersexo 2	0,0487	0,2880
Mãe x Macho	0,9954	0,0120
Pool x Intersexo 1	0,0052	0,8250
Pool x Intersexo 2	0,0090	0,0270
Pool x Macho	0,6013	0,1364

4.3.2 Atividade Miotóxica – Quantificação plasmática da enzima creatina-quinase (CK)

A quantificação dos níveis plasmáticos da enzima creatina-quinase indicou uma atividade miotóxica significativamente menor para o veneno do Intersexo 1 em relação ao veneno do Macho e do Intersexo 2, que não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 28-A)

Foi observada uma significativa diminuição da atividade miotóxica nas amostras de veneno dos animais na fase adulta (41 meses) (Figura 28-B). Na idade de 15 meses a atividade miotóxica não diferiu significativamente para os venenos do Macho e Intersexo 2 em relação aos venenos da Mãe da ninhada e ao do Pool de *B.insularis*. Nesta idade, o veneno do Intersexo 1 apresentou uma baixa atividade miotóxica, pois não diferiu significativamente em relação ao controle utilizado no experimento. Na fase adulta (41 meses) a atividade miotóxica apresentada pelos venenos não diferiu significativamente do controle utilizado no experimento, sugerindo uma baixa atividade miotóxica (Figura 28-C e Tabela 12).

A

Figura 28: Atividade miotóxica dos venenos de *B.insularis* (quantificação de creatina-quinase plasmática). **A** - variabilidade individual. **B** – variabilidade ontogenética. **C** - Representação gráfica da atividade miotóxica específica dos venenos (U/ml).

Tabela 12: Nível de significância entre as comparações (teste de Tukey) dos valores obtidos para a atividade miotóxica dos venenos nas idades de 15 e 41 meses com o veneno da Mãe da ninhada e o Pool de *B.insularis*.

Comparações/ Animais	Idade (meses) <i>P-valor</i>	
	15	41
Mãe x Intersexo 1	0,2075	0,3321
Mãe x Intersexo 2	0,3841	0,6310
Mãe x Macho	0,3047	0,9945
Pool x Intersexo 1	0,0120	0,0195
Pool x Intersexo 2	0,9997	0,0506
Pool x Macho	0,9967	0,2660
Controle x Intersexo 1	0,9440	
Controle x Intersexo 2	0,0018	
Controle x Macho	0,0014	
Controle x Mãe	0,0506	
Controle x Pool	0,0028	

4.3.3 Dose Letal média (DL₅₀)

Na análise comparativa da Dose Letal média dos venenos os resultados foram convertidos em microgramas de veneno por grama de animal modelo. Para camundongos verificamos, de uma forma geral, um aumento da letalidade na fase adulta dos animais (41 meses), contudo, considerando os limites inferior e superior de confiança 95%, verificamos variabilidade ontogenética apenas para os venenos do Intersexo 1 e Macho, que se tornaram mais letais na fase adulta (Tabela 13). No ensaio com camundongos utilizamos um Pool de venenos de exemplares adultos de *Bothrops jararaca* e um Pool de filhotes (serpentes com até 3 meses de idade) como parâmetros de comparação.

O veneno de *B.jararaca* não apresentou variabilidade ontogenética quando avaliada sua Dose Letal média em camundongos. Considerando os intervalos de confiança 95 % não observamos variabilidade ontogenética nos resultados obtidos com aves e abelhas (Tabela 13).

Os valores de DL_{50} tendem a diminuir de acordo com o modelo experimental testado, seguindo o padrão: camundongos > artrópodes > aves, sendo estas últimas mais sensíveis, com exceção dos venenos do Intersexo 2 e do Pool de *B. insularis*, que apresentam valores próximos tanto para artrópodes quanto para aves.

Tabela 13: Dose Letal média (DL₅₀) (µg de veneno/g de animal) dos venenos de *B.insularis* em diferentes modelos experimentais e em duas fases de vida (15 meses - jovens e 41 meses - adultos). Os números em negrito representam os valores das DL₅₀ e os números em parênteses os respectivos intervalos (superior e inferior) de confiança 95%.

Modelo experimental	Intersexo 1		Intersexo 2		Macho		Mãe da ninhada	Pool <i>B.insularis</i>	<i>B.jararaca</i> (filhotes)	<i>B.jararaca</i> (adultos)
	15	41	15	41	15	41				
Mamíferos	4,6	1,9	3,7	2,6	7,1	3,6	2,8	3,3	1,9	1,8
(Camundongos)	(4,5 - 5,8)	(1,4 - 2,8)	(3,4 - 4,6)	(2,0 - 3,9)	(6,0 - 9,3)	(2,9 - 4,6)	(2,3 - 3,1)	(2,7 - 5,2)	(1,6 - 2,2)	(1,5 - 2,4)
Artrópodes	1,6	1,7	2,3	1,7	2,6	1,4	1,9	2,4	n.d	n.d
(Abelhas)	(1,4 - 1,9)	(1,4 - 1,9)	(1,8 - 3,1)	(1,3 - 1,9)	(1,9 - 3,4)	(1,0 - 1,9)	(2,4 - 2,2)	(0,5 - 4,0)		
Aves	1,0	0,8	1,2	2,0	2,6	0,9	0,9	2,4	n.d	1,3
(Pintinhos)	(0,9 - 1,2)	(0,5 - 1,2)	(0,7 - 2,3)	(1,5 - 2,3)	(1,9 - 3,4)	(0,5 - 2,5)	(0,5 - 1,6)	(1,9 - 2,7)		(0,5 - 2,5)

n.d: não determinado.

5. DISCUSSÃO

5.1 Aspectos gerais do desenvolvimento e da variabilidade ontogenética do veneno de *Bothrops insularis*

Neste trabalho reportamos a variabilidade ontogenética no veneno da serpente *Bothrops insularis*, um animal endêmico e criticamente ameaçado de extinção. O status de Criticamente em Perigo (Critically Endangered) ocupado por esta espécie na lista vermelha da IUCN, bem como algumas peculiaridades biológicas, como uma ninhada pequena - uma média de 6 filhotes (Hoge et al. 1959) - e a infertilidade de algumas fêmeas verdadeiras, são fatores limitantes até mesmo no manejo em cativeiro desta espécie (Hoge et al. 1959; Marques et al. 2004). Atualmente, não é mais permitido a retirada de animais da Ilha, o que impossibilitou a obtenção de uma amostragem maior. Apesar destes fatores, os resultados obtidos neste trabalho forneceram importantes subsídios para o entendimento da relação veneno / presa em *B. insularis*.

Não existem dados na literatura a respeito do desenvolvimento em cativeiro desta espécie. Nós observamos que, tanto na produção de veneno, quanto no crescimento (comprimento total e massa) os animais apresentaram um padrão similar até aproximadamente os 24 meses, quando houve então uma nítida divergência, com os intersexos apresentando um padrão semelhante entre si, e diferenciado em relação ao macho. O período de 20 a 24 meses de idade é reportado como sendo a fase de maturação sexual em *Bothrops* (Leloup, 1975), uma possível causa das divergências em relação aos dados biométricos observados neste trabalho. O dimorfismo sexual verificado durante o desenvolvimento de *B. insularis* é relativamente comum na maioria das espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*, em que as fêmeas apresentam um porte maior (massa e comprimento total) em relação aos machos (Travaglia-Cardoso, 2000). Wüster et al. (2005), em análise de caracteres morfológicos de *B. insularis*, também relata uma diferenciação entre machos e fêmeas (fêmeas verdadeiras e intersexos), sobretudo em relação ao tamanho (comprimento rostro-cloacal).

Na grande maioria dos experimentos realizados neste trabalho, observamos uma expressiva variabilidade ontogenética nos venenos de *B.insularis*. Diferente dos venenos dos animais na fase jovem (10-15 meses), os venenos dos adultos não diferiram significativamente dos venenos utilizados como parâmetros de comparação (o veneno da Mãe da ninhada e do Pool de *B.insularis*), ou seja, animais adultos. O teor protéico observado foi similar àquele reportado na literatura para os venenos botrópicos de uma forma geral, da ordem de cerca de 90% (Furtado et al.1991). Embora o veneno do Intersexo 1 tenha apresentado menores valores em relação aos outros animais, o perfil eletroforético (sob condições redutoras ou não) demonstrou um padrão semelhante aos outros venenos. A eletroforese sob condições não redutoras revelou a presença de bandas protéicas majoritárias nas faixas de 94, 50, 27 e 14 kDa em todos os venenos e em todas as idades analisadas. Entretanto, na eletroforese em condições redutoras foi possível observar diferenças expressivas entre os venenos e entre as diferentes fases de vida dos animais, uma vez que a redução de pontes dissulfeto inter e intra-moleculares exprime com melhor desempenho diferenças nos perfis protéicos, favorecendo a desagregação de complexos protéicos e, desta forma, permitindo uma diferenciação mais evidente entre as amostras (Serrano et al.2005). Através desta abordagem, as bandas protéicas majoritárias encontraram-se dispostas nas faixas de 50, 37, 24 e 14 kDa.

Tan et al.(1993) detectaram bandas de alta massa molecular em amostras de venenos de exemplares jovens de *Notechis scutatus*, ausentes nos exemplares adultos. Furtado et al. (1991) também relataram esta característica em venenos de jovens de algumas espécies de *Bothrops* e Kamiguti (1988) em venenos de recém-nascidos de *B. jararaca*. Por outro lado, López-Lozano et al. (2002) evidenciaram a expressão pronunciada de uma banda de cerca de 23 kDa em venenos de exemplares adultos de *B. atrox*.

Em nossas análises uma característica interessante, evidenciada na eletroforese sob condições redutoras e comum a todas as amostras de veneno analisadas, foi o aumento ontogenético da expressão de uma banda protéica na

faixa de 24 kDa, característica confirmada também através de análise densitométrica.

Nos venenos botrópicos, de uma forma geral, essa faixa de massa molecular compreende serinoproteases e, principalmente, metaloproteases da classe P-I (Serrano e Maroun, 2005; Serrano et al. 2005). Modesto et al. (2005) purificaram e seqüenciaram do veneno de *B. insularis* uma metaloprotease da classe P-I de 22,6 kDa, chamada Insularinase A, que, conforme análise do cDNA correspondente, é resultante do processamento pós-traducional de uma metaloprotease da classe P-II.

A atividade proteolítica sobre a caseína foi mais expressiva para o veneno do Macho e, de uma forma geral, apresentou um decréscimo na idade adulta (41 meses). Contudo, observamos um outro perfil de atividade através da técnica de zimografia em gel de poliacrilamida. A presença de íons cálcio (um importante co-fator para a atividade enzimática de muitas proteases) no ensaio de zimografia (e a ausência deste íon no ensaio de atividade proteolítica sobre a caseína) pode estar relacionada com a ligeira diferença de resultados observada nos dois experimentos. Mediante os perfis obtidos por zimografia, é possível sugerir uma regulação ontogenética da expressão de proteases, sobretudo de metaloproteases, nos venenos analisados. De acordo com a região de massa molecular em que se verificou a atividade proteolítica sobre a gelatina, pode-se sugerir a presença de duas classes de metaloproteases no veneno de *B. insularis*: metaloproteases da classe P-III (região de 45 kDa nos géis de zimografia) e metaloproteases da classe P-I (região de 27 kDa). Outra característica interessante foi a presença de metaloproteases nas faixas de aproximadamente 90 kDa nos venenos da Mãe da ninhada e do Pool de *B. insularis*. Possivelmente estas bandas correspondem a precursores não processados de metaloproteases ou a metaloproteases diméricas da classe P-III (Fox e Serrano 2005; Menezes et al. 2006).

O aumento da atividade hemorrágica apresentada pelos venenos dos animais adultos pode ser uma consequência da maior expressão de metaloproteases durante a ontogênese de *B. insularis*, uma vez que estas

enzimas estão freqüentemente associadas a processos hemorrágicos (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez et al. 2005; Serrano e Fox, 2005). Nossos dados corroboram aqueles reportados por Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002) em análise da diversidade do transcriptoma da glândula de veneno de *B. insularis*, em que se verifica que metaloproteases são os transcritos majoritários (aproximadamente 42%) dentre as seqüências correspondentes a toxinas do veneno de *B. insularis*.

Proteases têm um importante papel na composição e atividades dos venenos de serpentes, estando relacionadas a diversos processos fisiológicos que têm, como propósito primordial auxiliar na digestão de uma presa “não triturada” pela ação mecânica de dentes (Gans e Elliot, 1968; Thomas e Pough, 1979; Mackessy, 1993, Mackessy, 2003).

Furtado et al. (1991) verificou uma expressiva variação ontogenética da atividade proteolítica nos venenos de algumas espécies de *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi paranaensis*, *B. n. pauloensis* e *B. n. urutu*), com um aumento pronunciado na fase adulta dos animais. Característica semelhante foi observada por Gutiérrez et al. (1990) em análise da variabilidade ontogenética do veneno de *Lachesis muta stenophrys*.

Mackessy (1993) observou um aumento da atividade proteolítica no veneno de exemplares adultos em relação a juvenis da cascavel norte-americana *Crotalus viridis oreganus*. O aumento da atividade proteolítica nos venenos dos adultos favoreceria, segundo o autor, o processo de digestão de presas maiores. Em *B. insularis*, um recrutamento maior de proteases na fase adulta pode estar associado a um processo de digestão de presas maiores. Esta característica é de extrema importância para a espécie, que apresenta uma mudança ontogenética de dieta, alimentando-se de presas maiores na fase adulta (Martins et al. 2002).

Todavia, os efeitos do envenenamento e, conseqüentemente, a sua complexidade, é atribuída à sinergia de diversas atividades (Kochva et al. 1983; Mackessy, 1993; Mebs, 1999). Neste contexto a atividade hialuronidásica exerce uma função importante no envenenamento por facilitar a dispersão do veneno por entre os tecidos da presa, a partir da hidrólise do ácido hialurônico (um

mucopolissacarídeo presente na matriz extracelular, que confere adesão e coesão entre as células na formação dos tecidos) (Pukrittayakamee et al.1988). Girish et al. (2002), observou a presença de diversas isoformas de hialuronidases em venenos de algumas serpentes pertencentes às famílias Elapidae e Viperidae, distribuídas em um amplo espectro de massa molecular (77 a 14 kDa) nas diferentes espécies.

Nossos resultados apontam para uma maior atividade hialuronidásica nos venenos dos jovens (10 meses de idade). A acentuada atividade hialuronidásica do veneno nas fases iniciais do desenvolvimento pode compensar o menor tamanho dos animais (menor produção de veneno) e a menor quantidade de veneno inoculada numa eventual investida contra uma presa. Desta forma, embora apresentem uma baixa atividade proteolítica (se comparado ao veneno na fase adulta) o veneno dos filhotes conta com uma maior atividade de “fatores de dispersão” (hialuronidases) que, atuando juntamente com outros componentes do veneno, auxiliam na subjugação da presa.

Processos hemostáticos são geralmente alvos comuns de toxinas de venenos de viperídeos, sobretudo de venenos botrópicos (Nahas et al.1979; Kamiguti e Cardoso, 1989; Ouyang, et al.1992; Sano-Martins e Santoro, 2003; Swenson e Markland, 2005) e estão intrinsecamente atrelados a atividade de proteases. Os venenos de viperídeos apresentam componentes que atuam sobre diversos fatores da cascata da coagulação sanguínea (Nahas et al. 1979; Kamiguti et al. 1986; Kamiguti et al. 1989; Ouyang et al. 1992; Swenson e Markland, 2005). O quadro de incoagulabilidade sanguínea ou alterações no tempo de coagulação, característico de acidentes botrópicos de uma forma geral, advém da atividade de componentes (em sua maioria proteases) em etapas cruciais das vias da cascata de coagulação, como na ativação do fator X ou da protrombina, por exemplo, (Kamiguti et al.1989; Ouyang et al.1992; Kini, 2005).

Diversos trabalhos relatam implicações da variabilidade ontogenética na atividade coagulante dos venenos. Kamiguti (1988) evidenciou diferenças significativas na atividade coagulante de venenos de exemplares recém-nascidos e adultos de *B. jararaca*. Furtado et al. (1991) também verificaram diferenças

acentuadas em relação a ação coagulante dos venenos de filhotes de algumas espécies brasileiras do gênero *Bothrops* sobre o plasma humano, bem como a acentuada ativação dos fatores X e II da cascata de coagulação sanguínea. Saldarriaga et al. (2003) relataram maior atividade coagulante nos venenos de exemplares jovens (de 6 meses a um ano de vida) de *B. asper* e *B. atrox* da Colômbia. Resultados semelhantes foram verificados por López-Lozano et al. (2002) em análise da atividade coagulante de venenos de jovens e adultos de *B. atrox* da Amazônia.

Nahas et al. (1979) já haviam relatado a atividade tipo-trombina e ativadora de fator X no veneno de *B. insularis*, bem como de outras espécies do mesmo gênero. Em nossos resultados os valores obtidos no ensaio de Dose Mínima Coagulante sobre o plasma apontam para uma atividade coagulante mais intensa no veneno dos animais jovens (15 meses). O mesmo padrão foi verificado em relação à capacidade dos venenos de promoverem a ativação do fator X da cascata de coagulação sanguínea. Já em relação à ativação do fator II e atividade tipo-trombina, não verificamos variabilidade ontogenética.

Embora os ensaios referentes à coagulação sanguínea utilizados neste projeto caracterizem a intensa ação coagulante dos venenos dos animais jovens, as proteínas-alvo (fatores de coagulação) podem ser múltiplas e melhor elucidadas quando estudadas utilizando toxinas isoladas dos venenos. Contudo, a ativação do fator X é um passo importante na cascata de coagulação sanguínea e esta atividade, sendo mais elevada nos venenos dos jovens, possivelmente pode estar associada à intensa atividade coagulante sobre o plasma verificada em nossos resultados. Kamiguti (1988) em análise das atividades coagulante e ativadora dos fatores X e II (todas mais exacerbadas nos venenos de exemplares recém-nascidos de *B. jararaca* em relação aos adultos) sugere tanto diferenças quantitativas (consequência de uma maior expressão de ativadores de fatores X e II nos venenos dos jovens) quanto qualitativas (como a possibilidade de ocorrerem isoformas nos venenos dos jovens, que atuariam com maior eficácia na ativação dos fatores X e II da cascata de coagulação sanguínea).

A atividade fibrin(ogen)olítica é uma característica comum aos venenos da maioria das espécies de viperídeos, estando freqüentemente associada a atividade de metalo e serinoproteases (Swenson e Markland, 2005; Serrano e Maroun, 2005). Em nossos resultados verificamos que os venenos clivaram tanto a cadeia A α quanto a B β do fibrinogênio. Esta ação parece estar intimamente associada a atividade de metaloproteases, uma vez que observamos a inibição desta atividade quando as amostras foram incubadas previamente com inibidores destas enzimas (EDTA e ortofenantrolina). Da mesma forma, a atividade fibrinolítica, avaliada em placa de fibrina, mostrou uma relação com a atividade de metaloproteases, sendo drasticamente afetada quando os venenos foram incubados previamente com ortofenantrolina.

A Insularinase A, uma metaloprotease da classe P-I, purificada por Modesto et al. (2005) do veneno de *B. insularis*, além de promover a ativação dos fatores X e II da cascata de coagulação sanguínea, cliva as cadeias A α e B β do fibrinogênio. Por outro lado, Selistre e Giglio (1987) isolaram e caracterizaram uma serino protease de 45 kDa, com atividade tipo-trombina do veneno de *B. insularis*, que também cliva as cadeias A α e B β do fibrinogênio.

Não foi possível estabelecer uma relação direta entre a idade analisada e a atividade fibrinogenolítica dos venenos, uma vez que o padrão de atividade foi semelhante entre as amostras independente da idade analisada. Entretanto, em relação a atividade fibrinolítica, foi possível observar um aumento relativo de atividade na fase adulta dos animais (41 meses).

A miotoxicidade verificada no envenenamento botrópico é freqüentemente atribuída a atividade de fosfolipases A₂ (PLA₂) (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Gutiérrez e Lomonte, 1995; Kini, 1997; Lomonte et al. 2003). Em nossos resultados verificamos uma maior atividade miotóxica para os venenos dos jovens (15 meses). Por outro lado, a atividade fosfolipásica apresentou um aumento na fase de 24 meses de idade dos animais.

Esta diferença pode ser uma consequência da especificidade dos ensaios utilizados: miotoxicidade (detecção dos níveis séricos da enzima creatina-quinase)

e atividade fosfolipásica sobre um substrato sintético (o substrato cromogênico ácido 4-nitro-3 octanoiloxi-benzóico).

A miotoxicidade no envenenamento botrópico tem uma forte correlação com atividade de hidrolases com estrutura “PLA₂-like” (tipo-PLA₂); enzimas cujo resíduo de aspartato na posição 49 é substituído por uma lisina, ou seja, as PLA₂ K-49 (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Gutiérrez e Lomonte, 1995; Kini, 1997; Lomonte et al. 2003). Entretanto, a miotoxicidade pode ser resultado da interação de outras toxinas do veneno com células do tecido muscular. Segundo Gutiérrez e Lomonte (1989), esta atividade pode também ser atribuída indiretamente à atividade de componentes hemorrágicos dos venenos, como proteases, resultando em um processo de isquemia, em que o suprimento de sangue ao tecido muscular estaria comprometido em função de alterações vasculares, como ruptura do endotélio, necrose arterial ou trombose. Moreira et al. (1994), evidenciaram alterações histológicas em vasos capilares do músculo esquelético (gastrocnêmio) de camundongos injetados com uma metaloprotease hemorrágica isolada do veneno de *Bothrops asper* (BaH1). Sendo assim, a análise dos níveis séricos da enzima creatina-quinase não representa uma evidência direta da ação de fosfolipases A₂.

Outro fator que deve ser considerado é a especificidade do ensaio que utilizamos para detectar a atividade fosfolipásica nos venenos, que consiste na atividade hidrolítica de um substrato cromogênico (o ácido 4-nitro-3 octanoiloxi-benzóico). Este ensaio é utilizado para detectar a atividade de fosfolipases cataliticamente ativas, como é o caso das PLA₂ D-49, por exemplo. Isso poderia explicar a não correlação entre os ensaios de atividade fosfolipásica e atividade miotóxica.

Segundo Gutiérrez e Lomonte (1995) a presença de isoformas de fosfolipases A₂ no veneno de uma espécie, ou até de um mesmo indivíduo, é uma característica comumente observada. Junqueira-de-Azevedo (2003) em análise dos transcritos expressos na glândula de *B. insularis*, identificou uma seqüência de cDNA correspondente a uma PLA₂ D-49 com estrutura similar (87%) a uma PLA₂ isolada de *B. jararaca* (BJ-PLA₂) (Serrano et al. 1999). Selistre et al. (1990)

isolaram uma PLA₂ dimérica de 29 kDa do veneno de *B. insularis* com atividade mionecrótica.

Lomonte e Carmona (1992) reportaram uma regulação ontogenética da expressão de isoformas de miotoxinas no veneno de *Bothrops asper*, sugerindo a presença de PLA₂ K-49 predominantemente nos venenos dos animais adultos. Contudo, uma análise mais refinada destas enzimas no veneno de *B. insularis* é necessária para se avaliar a presença de isoformas e, até mesmo, de uma expressão diferenciada de isoformas no veneno.

5.2 Dimorfismo sexual no veneno de *B. insularis*?

Optamos por analisar separadamente os venenos dos animais (Intersexo 1, Intersexo 2 e Macho) com o intuito de preservar e evidenciar possíveis diferenças individuais e sexuais na composição do veneno. Recentemente, Menezes et al. (2006) demonstrou diferenças no perfil proteômico e em algumas atividades bioquímicas de venenos de machos e fêmeas de uma mesma ninhada de *Bothrops jararaca*.

A divergência de dieta entre os sexos tem importantes implicações ecológicas, como por exemplo, a ocupação de diferentes nichos alimentares por machos e fêmeas, ou ainda, pode refletir o dimorfismo sexual verificado em diversas espécies de serpentes (Camilleri e Shine, 1990; Shine, 1994; Pearson et al. 2002).

Nogueira et al. (2003) relataram um expressivo dimorfismo sexual de tamanho em *Bothrops moojeni*, refletido também nos tipos de presas consumidas por machos e fêmeas adultas desta espécie. Alphonse Hoge et al. (1959) foram os primeiros a relatar o dimorfismo sexual de *B. insularis*. Nesse estudo, os exemplares intersexos e fêmeas apresentaram um maior tamanho da cabeça e da cauda, bem como maior comprimento total em relação aos exemplares machos. Além destes caracteres, Wüster et al. (2005) reportaram uma diferenciação em relação à posição do coração em exemplares machos e fêmeas (intersexos e fêmeas verdadeiras) de *B. insularis*: nas fêmeas o coração encontra-se disposto

numa posição mais anterior em relação aos machos. A posição mais anterior do coração em serpentes arborícolas (em relação a serpentes terrícolas) representa uma adaptação fisiológica para o suprimento de sangue a órgãos vitais presentes na cabeça do animal (Lillywhite, 1987). Neste contexto e, pelas características morfológicas de machos e fêmeas de *B.insularis*, é possível sugerir uma maior permanência dos machos no solo em relação às fêmeas. Este fato pode ter uma outra importante implicação: a composição da dieta entre os sexos. Uma divergência de dieta entre os sexos, isto é, a não sobreposição de nichos alimentares, pode evitar interações ecológicas desarmônicas como a competição intra-específica por um recurso (neste caso, o alimento). Este fato poderia ser um dos fatores relacionados com a elevada densidade desta serpente na Ilha da Queimada Grande.

Todavia, como forma de reforçar esta hipótese, seria importante uma análise do conteúdo estomacal de machos e fêmeas (intersexos e fêmeas verdadeiras), o que possibilitaria uma noção dos itens alimentares consumidos pelos dois sexos. Neste trabalho, as diferenças em relação a algumas atividades bioquímicas e biológicas verificadas para o veneno do macho e dos intersexos forneceram indícios do que pode vir a ser verificado se analisado um número maior de indivíduos, contudo a baixa amostragem não permite a extrapolação dos dados para a população como um todo.

5.3 Relação Adaptação x Dieta

Darwin (1859) em sua viagem ao arquipélago de Galápagos já notara a importância das adaptações para a sobrevivência e conseqüente sucesso evolutivo das espécies, como quando relatou em “A origem das espécies” as diferenças dos bicos dos tentilhões das diversas ilhas do arquipélago, possivelmente uma característica associada ao tipo de alimento consumido pelas diferentes espécies.

Na população de *B. insularis* diversas foram as alterações que conferiram a espécie seu sucesso evolutivo: as alterações morfológicas como o coração em posição mais anterior e a cauda semipreênsil, características de serpentes

arborícolas; a coloração pardo-amarelada que possibilita uma camuflagem do animal em meio a vegetação; o tamanho maior da cabeça, característica comum em espécies ornitófas e o veneno com uma eficácia para os itens alimentares disponíveis na Ilha. Entretanto, a extrema toxicidade do veneno de *B. insularis* em relação ao de *B. jararaca* pode ter sido erroneamente atribuída por Afrânio do Amaral em seus prévios estudos, uma vez que o modelo experimental utilizado na época era o pombo e a via de inoculação era intravenosa. As aves constituem o principal item alimentar de indivíduos adultos de *B. insularis*, desta forma, o resultado de ensaios apenas com aves não se torna tão significativo se realizado isoladamente. Por outro lado, esses resultados foram de grande importância na avaliação da seletividade deste veneno em relação a sua principal presa.

A dieta tem um importante papel na composição dos venenos de serpentes, atuando não como um fator diretamente modificador, mas selecionador de algumas características (Fry et al.2003a; Fry et al.2003b; Li et al.2005a; Li et al.2005b).

Como produtos biológicos as toxinas presentes nos venenos estão submetidas a sistemas de controle da expressão gênica que sofrem regulação e modificações que podem afetar o produto final deste conjunto de processos, isto é, a(s) toxina(s) expressa(s) (Neurath, 1984). A duplicação e divergência de genes são apontadas como uma das principais causas das substituições de nucleotídeos, sobretudo de substituições não-sinônimas, que levam ao aparecimento de isoformas de toxinas como as isoformas das enzimas fosfolipases A₂, por exemplo (Moura-da-Silva et al.1997; Ohno et al.2003; Li et al.2005a). Este processo chamado de evolução acelerada é um dos principais fatores norteadores da diversificação do potencial biológico e do espectro de ação das toxinas frente a diferentes alvos/presas (Moura-da-Silva et al.1997; Ohno et al.2003; Li et al. 2005a).

Segundo Futuyma (2002) “a oportunidade para a seleção [natural] existe quando, em média, diferenças em alguma característica fenotípica resultam em diferenças consistentes em taxas de sobrevivência ou reprodução”. Após o isolamento geográfico da Ilha da Queimada Grande, a população ancestral de *B. insularis* enfrentou importantes modificações ecológicas, e a adaptação ao

ambiente insular (e a todas as suas implicações) foi o fator crucial para a sobrevivência da espécie. Contudo, é importante salientar que o veneno não se tornou “adaptado” em consequência das “novas condições” enfrentadas pelo animal (uma dieta diferenciada, por exemplo), isto porque a seleção natural, não tendo um caráter providencial (que não atuaria “dotando” um indivíduo de características adaptativas), possivelmente atuou selecionando caracteres importantes para a espécie, e estes provavelmente surgiram aleatoriamente na população.

Nas serpentes venenosas, não apenas modificações nos venenos são responsáveis pela diversidade de formas de subjugação das presas. Estruturas relacionadas a alimentação são também alvos de intensa pressão seletiva, uma vez que respondem pela apreensão e sucesso na subjugação de presas. Aubret et al. (2004), demonstrou a variabilidade de tamanho do maxilar e do crânio de grupos experimentais da serpente *Notechis scutatus* (Elapidae) submetidos, desde o nascimento, a alimentação com presas de diferentes tamanhos. Com base nos resultados obtidos neste experimento, os autores propuseram uma explicação para a plasticidade desses caracteres morfológicos verificados em populações insulares e continentais de *Notechis scutatus* que, na natureza, alimentam-se de presas de diferentes tamanhos (as continentais de presas de menor tamanho em relação às insulares, apresentando, portanto, um menor tamanho de mandíbula e crânio). Contudo, atribuir a atividade da seleção natural a apenas a alguns caracteres é, de certa forma, uma visão simplista deste processo, pois como mencionado anteriormente, o sucesso evolutivo da espécie deve-se a uma série de fatores, entre eles, a composição do veneno.

A atividade letal do veneno (avaliada nos ensaios de Dose Letal média) variou expressivamente conforme o modelo experimental analisado. Aves e artrópodes, foram utilizados com intuito de representar presas consumidas por *B. insularis* na fase jovem e adulta, respectivamente. O veneno de *B. jararaca* (espécie generalista e que não apresenta variação ontogenética de dieta) não apresentou variabilidade ontogenética na Dose Letal média. Embora não tenhamos verificado, uma nítida variabilidade ontogenética nos experimento de Dose Letal média,

nossos resultados, independente da idade analisada, demonstram uma seletividade do veneno para presas locais (artrópodes e aves) em detrimento a animais que não existem na ilha (roedores, neste estudo representado por camundongos), mas que são freqüentemente itens alimentares da maioria das serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (Martins et al. 2002). Desta forma, é possível sugerir que a letalidade para presas locais é uma característica presente no veneno desde as fases iniciais de vida, não sendo, portanto uma característica exclusiva da fase adulta. A seletividade do veneno de *B. insularis* para o principal tipo de presa consumida por esta espécie na fase adulta (aves) já tinha sido anteriormente explorada no trabalho de Afrânio do Amaral na descrição da espécie (Amaral, 1921; Amaral, 1927) e em trabalhos subseqüentes (Campos e Mello-Filho 1966; Cogo et al.1993; Cogo et al.1998; Rodrigues-Simioni et al. 2004). Contudo, um enfoque ontogenético da variabilidade do veneno de *B. insularis* e suas correlações com a divergência de dieta observada nesta espécie não são reportados na literatura.

Andrade et al. (1996) apresentaram correlações entre a atividade letal do veneno e o tipo de presa consumida por *Bothrops moojeni* durante sua ontogênese. Neste estudo, os autores demonstraram a especificidade do veneno de animais jovens para o principal tipo de presa consumido nesta fase de vida: anfíbios.

Em um trabalho subseqüente, os mesmos autores (Andrade e Abe, 1999) mostraram correlações entre a divergência de dieta durante a ontogênese e a atividade letal dos venenos de duas espécies de hábitos alimentares significativamente distintos: *Bothrops jararaca* (uma espécie generalista, mas que se alimenta preferencialmente de endotérmicos na fase adulta) e *B. alternatus* (uma espécie extremamente especialista, que tem sua alimentação exclusivamente composta de mamíferos). Uma característica importante neste trabalho é o fato de que na espécie que não apresenta uma alteração ontogenética de dieta (*B. alternatus*) não foi verificada uma diferença significativa dos valores de dose letal entre jovens e adultos, fato não evidenciado na espécie generalista (*B. jararaca*) que, por outro lado, apresentou maior letalidade na fase

adulta. Da mesma forma, Mackessy et al. ,(2006), utilizando diferentes modelos experimentais, evidenciou a variabilidade ontogenética no veneno da serpente *Boiga irregularis* (Colubridae). Os resultados apresentados nestes trabalhos apontam para especializações dos venenos que conferem uma maior eficácia na alimentação de diferentes presas.

Nossos resultados ilustram a complexidade intra-específica presente em venenos de serpentes, neste caso, representado pela variabilidade ontogenética e possível dimorfismo sexual no veneno de *Bothrops insularis*. Os dados aqui apresentados apontam para uma especialização do veneno frente a uma dieta especializada

6. CONCLUSÕES

1. O desenvolvimento biométrico (massa e comprimento) de *B.insularis* durante sua ontogênese apresentou expressivo dimorfismo sexual, que também se reflete na quantidade de veneno produzido.
2. Os venenos apresentaram proteínas majoritárias nas faixas de 50, 37, 24 e 14 kDa.
3. Proteínas na faixa de 24 kDa parecem ter sua intensidade aumentada durante a ontogênese dos animais analisados.
4. Metaloproteases têm expressiva concentração nos venenos, estando presentes principalmente nas faixas de 27 e 45 kDa.
5. Os resultados obtidos sugerem uma regulação da expressão de proteases, dado o aumento desta atividade durante a ontogênese dos animais analisados.
6. Os resultados experimentais sugerem que fosfolipases A₂, diferente de hialuronidases, não têm expressão pronunciada na fase adulta dos animais (41 meses).
7. Os venenos de exemplares jovens (15 meses) de *B. insularis* apresentaram uma atividade miotóxica mais intensa em relação aos adultos (41 meses).
8. Os venenos dos animais jovens (15 meses) têm maior eficácia na ativação dos fatores X e II da coagulação sanguínea, contribuindo para a acentuada atividade coagulante em relação aos venenos dos animais adultos.

9. Os resultados de Dose Letal média (DL_{50}) sugerem que os venenos dos animais adultos tendem a apresentar uma maior atividade letal.
10. Aves e artrópodes apresentam uma maior sensibilidade para o veneno de *B. insularis*.
11. A variabilidade ontogenética no veneno de *B. insularis* pode estar associada com a divergência de dieta verificada para esta espécie que, na fase adulta, se alimenta de presas relativamente maiores.
12. Nossos resultados sugerem uma especificidade do veneno de *B. insularis* para presas locais.

7. REFERÊNCIAS

Amaral, A. Contribuição ao conhecimento dos ophidios do Brasil. IV - Lista remissiva dos ophidios do Brasil. Mem. Inst. Butantan 4: 114, 1929.

Amaral, A. Excursão à Ilha da Queimada Grande. Col. Trab. Inst. Butantan II, 49-55. 1927.

Amaral, A. Contribuição ao conhecimento dos ophidios do Brasil. Parte I. Biologia de uma nova espécie, *Lachesis insularis*. Anexos Mem. Inst. Butantan, 1(1), 18-37, 1921.

Andrade, DV, Abe, A. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. Herpetologica 55(2): 200-204, 1999.

Andrade, DV, Abe, A, Santos, MC. Is the venom related to diet and tail color during *Bothrops moojeni* ontogeny? J. Herpetol. 30(2): 285-288, 1996.

Arni, RK, Ward, RJ. Phospholipase A2- structural review. /34: 827-841, 1996.

Aubret, F, Shine, R, Bonnet, X. Adaptive developmental plasticity in snakes. Nature 431: 261-262, 2004.

Barret, AJ, Rawlings, ND. Families and clans of serine peptidases. Arch. Biochem. Biophys. 318: 247-250, 1995.

Beçak, ML, Rabello-Gay, MN, Beçak, W, Soma, M, Batistic, RF, Trajtengertz, I. The W chromosome during the evolution and in sex abnormalities of snakes. DNA content, C-banding. In: Olmo, E (Editor). Cytogenetics of amphibians and reptiles, Birkhauser Verlag, Basel, pp 221-240, 1990.

Begon, M, Harper, JL, Townsend, CR. Chapter 23: Islands, areas and colonization. In: Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. (Editores) Ecology: Individuals, populations and communities. Blackweel Science, third edition, pp 861-883, 1996.

Bennett, MR, Glasser, NF. Chapter 2 The history of ice on Earth. In Bennett, MR, Glasser, NF (Editores) Glacial geology - Ice sheets and landforms. England: John Wiley & Sons, pp. 7-28, 1996.

Biasi, P, Belluomini, HE, Hoge, AR, Puerto, G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. Mem. Inst. Butantan 40/41: 167-172, 1976/77.

- Bjarnason, JB, Fox, JW. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. Meth.Enzymol. 248,1995.
- Calvete,JJ, Marcinkiewickz, C, Monléon, D, Esteve, V, Celda, B, Juarez, P, Sanz, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function.Toxicon 45:1063-1074, 2005.
- Camilleri, C, Shine, R. Sexual dimorphism and dietary divergence: differences in trophic morphology between male and female snakes. Copeia 5:649-658, 1990.
- Campos, JS, Mello-Filho, L E. Observações biológicas sobre a ilha da Queimada Grande. A Folha Médica 52 (5): 343-366,1966.
- Chaves, F, Gutiérrez, 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 30 (9), 1099-1109,1992.
- Chippaux, JP, Williams, V, White, J. Snake venoms variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon 29 (11), 1279-1303,1991.
- Cho, W, Kézdy, FJ. Chromogenic subtrates and assay of phspholipases A₂. Meth.Enzymol. 197:75-79, 1991.
- Cintra, ACO, Vieira, CA, Giglio, JR. Primary structure and biological activity of bradikinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. J. Protein. Chem.9 (2), 221-227,1990.
- Clemetson, KJ, Navdev, A, Dörman, D, Du, XY, Clemetson, JM. Multifunctional snake C-type lectins affecting platelets. Haemostasis 31:148-154, 2001.
- Cogo, JC, Prado-Franceschi, J, Cruz-Höfling, MA, Corrado, AP, Rodrigues-Simioni, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on mouse and chick nerve-muscle preparation. Toxicon 31 (10), 1237-1247, 1993.
- Cogo, JC, Prado-Franceschi, J, Giglio, JR, Corrado, AP, Cruz-Höfling, MA, Donato, JL, Leite,GB, Rodrigues-Simioni, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. Toxicon 36 (10), 1323-1332,1998.
- Daltry, JC, Wüster, W, Thorpe, RS. Diet and snake venom evolution. Nature 379 (8), 537-540,1996.
- Daltry, JC, Wüster, W, Thorpe, RS. The role of ecology in determining venom variation in the Malayan pitviper, *Calloselasma rhodostoma*. Symp. zool. Soc. Lond. 70, 155-171,1997.

Darwin, C. On the origin of species. A facsimile of the first edition (published in 1859). Cambridge : Harvard University Press, 1964.

Della-Casa, MS, Junqueira-de-Azevedo, ILM, Ho, PL, Tanjoni, I, Butera, D, Pimenta, DC, Valente, RH, Neves-ferreira, AG, Serrano, SMT, Moura-da-Silva, AM. Structural and functional characterization of insularin, a new *Bothrops insularis* venom disintegrin. Mem.Inst.Butantan 61:45, 2005.

Drickamer, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. J. Biol. Chem., v. 263, n. 20, p. 9557-9560, 1988.

Duarte, MR. Microhabitat e relações térmicas da jararaca ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes, Viperidae). [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, Rio Claro; 1999.

Duarte, MR, Puerto, G, Franco, FL. A biological survey of the pitviper *Bothrops insularis* Amaral (Serpentes: Viperidae): an endemic and threatened offshore island snake of Southeastern Brazil. Studies on Neotropical Fauna and Environment 30 (1), 1-13, 1995.

Ferrante, N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. J. Biol. Chem. 220:303-306, 1956.

Finney, P.J. Probit analysis. 3 ed. Cambridge, Cambridge University Press. 333p.

Fry, B.G, 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 439, 584-588, 2005.

Fry, BG, Wüster, 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. 57:110-129, 2003a.

Fry, BG, Lumsden, NG, Wüster, W, Wicramaratna, JC, Hodgson, WC, Kini, RM. Isolation of a neurotoxin (α -colubritoxin) from a nonvenomous colubrid: evidence for early origin of venom in snakes. J. Mol. Evol. 57: 446-452, 2003b.

Furtado, MFD, Maruyama, M., Kamiguti, AS, Antonio, LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. Toxicon 29 (2), 219-226, 1991.

Furtado, MFD, Colletto, GMDD, Dias da Silva, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I-Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. Mem. Inst. Butantan 53(2):149-159, 1991.

- Futuyma, DJ . Biologia evolutiva, 2° edição. 631p. Ribeirão preto: FUNPEC-RP,2002.
- Gans, C, Elliot ,WB. Snake venoms: production, injection, action. Adv.Oral.Biol.3: 45-81,1968.
- Girish, KS, Jagadeesha, DK, Rajeev, KB, Kemparaju, K. Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. Mol.Cell. Biochem. 240: 105-110, 2002.
- Grazziotin,F.G. Estudo filogeográfico de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) baseado no DNA mitocondrial (Squamata: Serpentes: Viperidae) [Dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2004.
- Guimarães-Gomes, V, Oliveira-Carvalho, AL, Junqueira-de-Azevedo, ILM, Dutra, DLS, Pujol-Luz, M, Castro, HC, Ho, PL, Zingali, RB. Cloning, characterization and structural analysis of a C-type lectin (BiL) from *Bothrops insularis* venom. Arch.Biochem.Biophys. 432, 1-11, 2004.
- Gutiérrez, JM, Rucavado, A, Escalante, T, Díaz, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon 45 (8): 997-1011, 2005.
- Gutiérrez, JM, Rucavado, A. Snake venom metalloproteases: Their role in pathogenesis of local tissue damage. Biochimie 82, 841-850, 2000.
- Gutiérrez, JM, Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon 33(11): 1405-1424, 1995.
- Gutiérrez, JM., Santos, MC., Furtado, MFD., Rojas, G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. Toxicon 20 (10), 1273-1277,1991.
- Gutiérrez, JM, Ávila, C, Camacho, Z, Lomonte, B. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (Bushmaster) from Costa Rica. Toxicon 28(4), 419-426, 1990.
- Gutiérrez, JM, Lomonte, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. Mem.Inst.Butantan 51(4): 211-223, 1989.
- Gutiérrez, JM, Gené, JA, Rojas, G, Cerdas, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. Toxicon 23: 887-893,1985.

Gutiérrez, JM, Arroyo, O, Bolaños, R. Myonecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18: 603-610, 1980.

Heussen, C, Dowdle, EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102: 196-202, 1980

Hite, LA, Jia, LG, Bjarnason, J, Fox, JW. cDNA Sequences for four snake venom metalloproteinases: Structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1): 182-191, 1994.

Hoge, AR, Belluomini, E, Schreiber, G, Penha, AM. Sexual abnormalities in *Bothrops insularis* (Amaral) 1921 (SERPENTES). *Mem. Inst. Butantan* 29, 17-88, 1959.

Hoge, AR. Um novo lagarto da Ilha da Queimada Grande. *Mem. Inst. Butantan* 19: 241-248, 1946.

Holzer, M, Mackessy, SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34(10):1149-1155, 1996.

Jespersen, J, Astrup, TA. A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents. *Haemostasis* 13: 301-315, 1983.

Junqueira-de-Azevedo, ILM. Análise da diversidade do transcriptoma da glândula de veneno da serpente *Bothrops insularis*: identificação e caracterização de novas proteínas através da geração de *Expressed Sequence Tags* (ESTs). [Tese]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2003.

Junqueira-de-Azevedo, ILM, Ho, PL. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene* 299, 279-291, 2002.

Junqueira-de-Azevedo, ILM, Farsky, SHP, Oliveira, MLS, Ho, PL. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. *J. Biol. Chem* 276 (43), 39836-39842, 2001.

Kamiguti, AS, Cardoso, JLC. Haemostatic changes caused by the venoms of south american snakes. *Toxicon* 27(9): 955-963, 1989.

Kamiguti, AS. Atividades coagulante, inflamatória e proteolítica dos venenos de *Bothrops jararaca* recém nascida e adulta. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1988.

- Kamiguti, AS, Silva, MV., Cardoso, JLC. Desfibrinação do sangue no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. Rev.Soc.Bras.Med.Trop. São Paulo 31: 84-90,1986.
- Kini, RM. The intriguing world of prothrombin activators from snake venoms. Toxicon 45: 1133-1145, 2005.
- Kini, RM . Chapter 1:Phospholipase A₂ - A complex multifunctional protein puzzle In: Kini, RM (Editor). Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism. England: Wiley, pp.1-28, 1997.
- Kochva, E. The origin of snake and evolution of the venom apparatus. Toxicon 25 (1): 65-106, 1987.
- Kochva, E, Nakar, O, Ovadia, M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. Amer. Zool. 23:427-430,1983.
- Kochva, E. evolution and secretion of venom and its antidotes in snakes. Period. Biol. 80(1):11-23, 1978.
- Kondo, H, Kondo, S, Kezawa, H, Murata, R, Ohsaka, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of the habu venom. Jpn.J. Med. Sci.Biol. 13: 43-51, 1960.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227,680-685, 1970.
- Leloup, P. Observations sur la reproduction de *Bothrops moojeni* Hoge en captivité. Acta Zool. Path. Antverpiensia 62, 173-201, 1975.
- Li, M, Fry, BG, Kini, RM. Putting the brakes on snake venom evolution: the unique molecular evolutionary patterns of *Aipysurus eydouxii* (marbled sea snake) phospholipase A₂ toxins. Mol.Biol.Evol. 22(4): 934-941, 2005a.
- Li, M, Fry, BG, Kini, RM. Eggs-only diet: its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). J. Mol.Evol. 60: 81-89, 2005b.
- Lillywhite, HB. Circulatory adaptations of snakes to gravity. Am.Zool. 27:81-95, 1987.
- Lomonte, B, Angulo, Y, Calderón, L. Na overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Toxicon 42: 885-901, 2003.

- Lomonte, B, Carmona, E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. Comp. Biochem. Physiol 102B (2), 325-329, 1992.
- Lomonte, B, Gutiérrez, JM La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. Rev. Biol. Trop. 31(1): 37-40, 1983.
- López-Lozano, JL, Sousa, MV, Ricart, CAO, Chávez-Olortegui, C, Sanchez, E F, Muniz, EG, Bührnheim, PF, Morhy, L. Ontogenetic variation of metalloproteases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonia rain forest. Toxicon 40, 997-1006, 2002.
- Lowry, OH, Rosenbrough, NJ, Farr, IL, Randall, RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.
- Luderwaldt, H, Fonseca, JP. A Ilha dos alcatrazes. Rev. Mus. Paulista 13: 441-512, 1923.
- Mackessy, SP, Sixberry, NM, Heyborne, WH, Fritts, T. Venom of the brown treesnake, *Boiga irregularis*: ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity. Toxicon 47: 537-548, 2006.
- Mackessy, SP, Williams, K, Ashton, KG. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganos concolor*. A case of Venom Paedomorphosis? Copeia 4, 769-782, 2003.
- Mackessy, SP. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). Comp. Biochem. Physiol. 106 B (1), 181-189, 1993.
- Manzoli-Palma, MF, Gobbi, N, Palma, MS. Insects as a biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. J. Venom. Anim. Toxins 9(2):174-185, 2003.
- Markwell, M, Hass, SM, Bieber, LL, Tolbert, NE. A modification of the lowry procedures to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87:206-210, 1978.
- Marques, OAV, Martins, M, Sazima, I. 2004. *Bothrops insularis*. In: IUCN 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 20 de Fevereiro, 2006.
- Marques, OAV, Martins, M, Sazima, I. A new insular pitviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). Herpetologica 58(3): 303-312, 2002.

- Martins, M, Araújo, 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., Lond. 254: 529-538, 2001.
- Martins, M, Marques, OAV, Sazima, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: Biology of the vipers. Schuett, GW, Höggren, M, Douglas, ME, Greene, HW (Editores). Eagle Mountain Publishing, L.C, pp. 307-328., 2002.
- Mebs, D. Snake venom composition and evolution of Viperidae. Kaupia 8: 145-148, 1999.
- 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 47: 304-312, 2006.
- Minton, SA, Weinstein, SA. Geographic and ontogenetic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). Toxicon 24 (1), 71-80, 1986.
- Modesto, JCA, Junqueira-de-Azevedo, ILM, Neves-Ferreira, AGC, Fritzen, M, Ho, PL, Perales, J, Chudzinski-Tavassi, AM. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a class P-I metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. Biol. Chem. 386(6), 589-600, 2005.
- Moreira, L, Borkow, G, Ovadia, M, Gutiérrez, JM. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. Toxicon 32(8):977-987, 1994.
- Moura-da-Silva, AM, Theakston, RDG, Crampton, JM. Molecular evolution of phospholipase A₂ and metalloproteinase/disintegrins from venoms of vipers. Symp. zool. Soc.Lond. 70: 173-187, 1997.
- Nahas, L, Kamiguti, AS, Barros, MA. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. Thrombos. Haemostas. 41 (2), 314-328, 1979.
- Neurath, H. Evolution of proteolytic enzymes. Science 224: 350-357, 1984.
- Nogueira, C, Sawaya, RJ, Martins, M. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. J. Herpetol. 37(4): 653-659, 2003.
- Ohno, M, Chijiwa, T, Oda-Ueda, N, Ogawa, T, Hattori, S. Molecular evolution of myotoxic Phospholipases A₂ from snake venom. Toxicon 42: 841-854, 2003.

- Okuda, D, Koike, H, Morita, T. A new gene structure of disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. *Biochemistry* 41:14248-14254, 2002.
- Ouyang, C, Teng, CM, Huang, TF. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* 30(9): 945-966, 1992.
- Pearson, D, Shine, R, How, R. Sex-specific niche partitioning and sexual size dimorphism in australian pythons (*Morelia spilota imbricata*). *Biol. J. Lin. Soc.* 77: 113-125, 2002.
- Pough, FH, Andrews, RM, Cadle, JE, Crump, ML, Savitzky, AH, Wells, KD. Chapter 7: Reproduction and life history. In: Pough, F.H., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitzky, A.H., Wells, K.D. (Editores). *Herpetology*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 204-234 pp, 1998.
- Pukrittayakamee, S, Warrel, DA, Desakorn, V, McMichael, AJ, White, NJ, Bunnag, D. The hialuronidase activities of some southeast asian snake venoms. *Toxicon* 26(7):629-637, 1988.
- Rael, ED, Lieb, CS, Maddux, N, Varela-Ramirez, A, Perez, J. Hemorrhagic and mojave toxins in the venoms of the offspring of two mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Comp.Biochem.Physiol.* 106B (3): 595-600, 1993.
- Rafael, A. Variação intraespecífica do veneno de *Bothrops jararacussu*: análises eletroforéticas, imunológicas e biológicas. [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2005.
- Raynaud, A, Pieau, C. Chapter 4: Embryonic development of genital system. In: Gans, C., Billet, F.(Editores). *Biology of Reptilia*. Vol. 15 Development B. John Wiley & Sons, Inc. pp.151-300., 1985.
- Ribeiro, LA, Jorge, MT. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adulto e filhote. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med S. Paulo* 44,143-145,1989.
- Rodrigues-Simioni, L, Zamuner, SR, Cogo, JC, Borja-Oliveira, C, Prado-Franceschi, J, Cruz-Höfling, MA, Corrado, AP. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon* 43, 633-638, 2004.
- Saldarriaga, MM, Otero, R, Núñez, V, Toro, MF, Díaz, A, Gutiérrez, JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42, 405-411, 2003.
- Salomão, MG, Wüster, W, Thorpe, RS. MtDNA Phylogeny of neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae) *Kaupia* 8, 127-134, 1999.

Sano-Martins, IS, Santoro, ML. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso, JLC, França, FOS, Wen, FH, Málaque, CMS, Junior, VH. (Eds), Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, pp. 289-309, 2003.

São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Divisão de Reservas e Parques Estaduais/Universidade de São Paulo. Ilhas do Litoral paulista. Sueli Ângelo (coordenadora.). São Paulo, 52p., 1989.

Saravia, P, Rojas, E, Arce, V, Guevara, C, López, JC, Chaves, E, Velásquez, R, Rojas, G, Gutiérrez, JM. Geographic and ontogenetic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. Rev.Biol.Trop 50 (1), 337-346,2002.

Serrano, SMT, Fox, JW. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. Toxicon 45(8), 969-985, 2005.

Serrano,SMT, Maroun, RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon 45(8): 1115-1132,2005.

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 5: 501-510, 2005.

Serrano, SMT, Reichl, AP, Mentale, R, Auerswald, EA, Santoro, ML, Sampaio, CA., Camargo, AC, Assakura, MT. A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. Arch. Biochem. Biophys. 367(1): 26-32, 1999.

Selistre, HS, Giglio, JR. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa). Toxicon 25(11): 1135-1144, 1987.

Selistre, HS, Queiroz, LS, Cunha, OAB, Souza, GEP, Giglio, JR. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. Toxicon 28(3): 261-273, 1990.

Shine,R. Sexual size dimorphism in snakes revisited. Copeia 2:326-346, 1994.

Silles Villarroel, M, Zelante, F, Rolim Rosa, R, Furlanetto, RS. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. Mem. Inst. Butantan 42/43:311-323, 1978/79.

- Suguio, K, Sallun, AEM. Capítulo 27: Geologia do Quaternário e geologia ambiental. In: Neto, VM, Bartorelli, A, Carneiro, CDR, Neves, BBB (Organizadores.). São Paulo: Beca, pp 461-465, 2004.
- Suguio, K, Martin, L, Bittencourt, ACSP, Dominguez, JML, Flexor, JM, Azevedo, AEG. Flutuações do nível relativo do mar durante o quaternário superior do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. Rev.Bras.Geocien.15(4): 273-286, 1985.
- Swenson, S, Markland Jr., FS. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon 45: 1021-1039, 2005.
- Tan, NH, Ponnudurai, G, Mirtschin, PJ. A comparative study on the biological properties of venoms from juvenile and adult common tiger snake (*Notechis scutatus*) venoms. Comp. Biochem. Physiol. 106B(3): 651-654, 1993.
- Theakston, RDG, Reid, HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull. World Hlth. Org., 61:949-956, 1983.
- Thomas, RG, Pough, FH. The effects of rattlesnake venom on the digestion of prey. Toxicon 17, 221-228, 1979.
- Travaglia-Cardoso, S. Estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2000.
- Vanzolini, PE. Distribution and differentiation of animals along the coast and continental island of the state of S.Paulo, Brasil I. Introduction to the area and problems. Pap. Avulsos Zool. 16: 281-294, 1973.
- Zingali, RB, Bianconi, ML, Monteiro, RQ. Interaction of Bothrojaracin with prothrombin. Haemostasis 31:273-278, 2001.
- Warrell, DA. Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes. Symp.Zool.Soc.Lond 70:189-203, 1997.
- Williams V, White, J, Schwaner, TD, Sparrow, A. variation in venom proteins from isolated populations of tiger snakes (*Notechis ater niger*, *N. scutatus*) in south australia. Toxicon 26(11): 1067-1075, 1988.
- Wüster, W, Duarte, MR, Salomão, MG. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. J. Zool. Lond. 266: 1-10, 2005.

Yamanoue, N, Britto, LR, Carneiro, SM, Markus, RP. Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake *Bothrops jararaca*. J.Exp.Biol. 200: 2547-2556, 1997.**Anexos**

I. Análise estatística -Tabelas de comparações (Teste de Tukey)

Variabilidade individual

Dosagem Protéica

Teste: Animal	T-Value	P-Value
Inter 2 - Inter 1	10,210	0,0000
Macho - Inter 1	9,467	0,0000
Macho - Inter 2	-0,7425	0,7394

Atividade Proteolítica - Caseína

Teste: Animal	T-Value	P-Value
Inter 2 - Inter 1	11,190	0,0000
Macho - Inter 1	19,610	0,0000
Macho - Inter 2	8,427	0,0000

Atividade Fosfolipásica

Teste: Animal	T-Value	P-Value
Inter 2 - Inter 1	12,20	0,0000
Macho - Inter 1	17,30	0,0000
Macho - Inter 2	5,104	0,0000

Atividade Hialuronidásica

Teste: Animal	T-Value	P-Value
Inter 2 - Inter 1	5,202	0,0002
Macho - Inter 1	-9,295	0,0000
Macho - Inter 2	-14,500	0,0000

Miotoxicidade

Teste: Individual	T-Value	P-Value
Inter 2 - Inter 1	3,337	0,0127
Macho - Inter 1	4,133	0,0027
Macho - Inter 2	0,7962	0,7113

Dose Mínima Hemorrágica

Teste: Individual	T-Value	P-Value
Inter 2 - Inter 1	1,095	0,5347
Macho - Inter 1	-4,382	0,0024
Macho - Inter 2	-5,477	0,0004

Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma

Teste: Individual	T-Value	P-Value
Inter 2 - Inter 1	4,9433	0,0062
Macho - Inter 1	0,8362	0,6962
Macho - Inter 2	-4,107	0,0149

Atividade Tipo-Trombina

Teste: Individual	T-Value	P-Value
Inter 2 - Inter 1	-0,058	0,9982
Macho - Inter 1	-1,119	0,5382
Macho - Inter 2	-1,061	0,5695

Variabilidade ontogenética**Dosagem Protéica**

Teste: Idade	T-Value	P-Value
15m - 10m	1,8480	0,4445
20m - 10m	1,9840	0,3648
24m - 10m	5,2910	0,0000
33m - 10m	-2,2220	0,2451
41m - 10m	-0,3600	0,9992
20m - 15m	0,1360	1,0000
24m - 15m	3,4430	0,0136
33m - 15m	-4,0700	0,0021
41m - 15m	-2,2080	0,2510
24m - 20m	3,3070	0,0198
33m - 20m	-4,2060	0,0013
41m - 20m	-2,3440	0,1949
33m - 24m	-7,5130	0,0000
41m - 24m	-5,6510	0,0000
41m - 33m	1,8620	0,4364

m=meses

Atividade Proteolítica - Caseína

Teste: Idade	T-Value	P-Value
15m - 10m	-2,2820	0,2193
20m - 10m	-1,7240	0,5223
24m - 10m	-0,7610	0,9729
33m - 10m	-0,1010	1,0000
41m - 10m	-6,8460	0,0000
20m - 15m	0,5580	0,9933
24m - 15m	1,5210	0,6523
33m - 15m	2,1810	0,2637
41m - 15m	-4,5640	0,0004
24m - 20m	0,9640	0,9274
33m - 20m	1,6230	0,5875
41m - 20m	-5,1220	0,0001
33m - 24m	0,6590	0,9856
41m - 24m	-6,0850	0,0000
41m - 33m	-6,7450	0,0000

Atividade Hialuronidásica

Teste: Idade	T-Value	P-Value
15m - 10m	-3,740	0,016
20m - 10m	-8,300	0,000
24m - 10m	-5,630	0,000
33m - 10m	-10,150	0,000
41m - 10m	-6,810	0,000
20m - 15m	-4,556	0,003
24m - 15m	-1,883	0,443
33m - 15m	-6,404	0,000
41m - 15m	-3,068	0,062
24m - 20m	2,673	0,130
33m - 20m	-1,848	0,462
41m - 20m	1,488	0,676
33m - 24m	-4,521	0,003
41m - 24m	-1,185	0,838
41m - 33m	3,336	0,037

Atividade Fosfolipásica

Teste: Idade	T-Value	P-Value
15m - 10m	-1,1830	0,8421
20m - 10m	-1,8350	0,4571
24m - 10m	6,6470	0,0000
33m - 10m	2,2840	0,2271
41m - 10m	2,1610	0,2805
20m - 15m	-0,6525	0,9859
24m - 15m	7,8297	0,0000
33m - 15m	3,4663	0,0161
41m - 15m	3,3439	0,0220
24m - 20m	8,4820	0,0000
33m - 20m	4,1190	0,0027
41m - 20m	3,9960	0,0038
33m - 24m	-4,3630	0,0014
41m - 24m	-4,4860	0,0010
41m - 33m	-0,1223	1,0000

Mitotoxicidade

Teste: Idade	T-Value	P-Value
41m - 15m	-3,169	0,0068

Dose Mínima Hemorrágica

Teste: Idade	T-Value	P-Value
41m - 15m	-5,590	0,0001

A

Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma

Teste: Idade	T-Value	P-Value
41m - 15m	2,932	0,0262

Atividade Tipo-Trombina

Teste: Idade	T-Value	P-Value
41m - 15m	0,4897	0,6417

B

Dose Letal média (DL₅₀) (μg de veneno/g de animal) dos venenos de *B.insularis* em diferentes modelos experimentais e em duas fases de vida (15 meses - jovens e 41 meses - adultos). **A e B** - camundongos; **C e D** abelhas; **E e F** Aves. As linhas horizontais nos gráficos representam os valores de DL₅₀ com os respectivos limites de confiança 95% (superior- à direita e inferior- à esquerda).